

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



RODRIGO HOHL

**“PADRONIZAÇÃO DE UM MODELO DE INDUÇÃO DE  
OVERREACHING EM RATOS: DESENVOLVIMENTO E  
PERSPECTIVAS DE INVESTIGAÇÃO EM NATAÇÃO E  
ESTEIRA”**

|                                                                                                                                                                           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Este exemplar corresponde à redação final<br>da tese defendida pelo(a) candidato (a)<br><u>RODRIGO HOHL</u><br><u>[assinatura]</u><br>e aprovada pela Comissão Julgadora. |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Tese apresentada ao Instituto  
de Biologia para obtenção do  
Título de Doutor em  
Biologia Funcional e  
Molecular., na área de  
Fisiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Denise Vaz de Macedo

Campinas, 2007

**H685p**

Hohl, Rodrigo

Padronização de um modelo de indução de overreaching em ratos: desenvolvimento e perspectivas de investigação em natação e esteira / Rodigo Hohl. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientadora: Denise Vaz de Macedo.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Overtraining. 2. Overreaching. 3. Rato-Fisiologia. 4. Rato -Exercício. I. Macedo, Denise Vaz de. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

**Título em inglês:** Standardization of overreaching model for rats detected by performance decrement: development and perspectives in swimming and treadmill research.

**Palavras-chave em inglês:** Overtraining; Overreaching; Rats - Physiology; Rats – Exercise.

**Área de concentração:** Fisiologia.

**Titulação:** Doutor em Biologia Funcional e Molecular.

**Banca examinadora:** Denise Vaz de Macedo, Bayardo Baptista Torres, Tânia Cristina Pithon-Curi, Everardo Magalhães Carneiro, Cláudio Alexandre Gobatto.

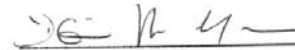
**Data da defesa:** 06/06/2007.

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 6 de junho de 2007

**BANCA EXAMINADORA**

Profa. Dra . Denise Vaz de Macedo (Orientadora)

  
Assinatura

Profa. Dra. Tânia Cristina Pithon-Curi

  
Assinatura

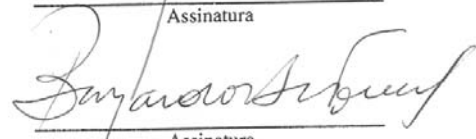
Prof. Dr . Everardo Magalhães Carneiro

  
Assinatura

Prof. Dr . Cláudio Alexandre Gobatto

  
Assinatura

Prof. Dr Bayardo Baptista Torres.

  
Assinatura

“O vento é o nosso bom amigo, seja lá como for”, pensou.

“Às vezes”, acrescentou em seguida.

“E o grande mar, com os nossos amigos e inimigos. E a cama”, acrescentou em pensamento.

“A cama é a minha amiga. De cama é que eu preciso. Espero por ela com sua grande impaciência. É fácil quando se está vencido”, pensou o velho pescador.

“Eu nunca tinha sido derrotado e não sabia como era fácil. E o que me venceu?” pensou ele.

- Nada! - disse em voz alta. Fui longe demais, foi o que foi.

O velho sonhava com leões.

*O velho e o mar* – Ernest Hemingway

*Este trabalho é meu, do Roberto e da Cristina.  
Meus pais.  
Este trabalho é nosso,  
Fruto da educação amorosa e solidária,  
Do trabalho honesto e do alimento diário.  
Meus amores.  
Seremos amigos para sempre.*

## Agradecimentos

Denise, querida amiga.  
Junto dela os caminhos se cruzam e as portas estão sempre abertas.

René, o rigor do frio europeu com a curiosidade calorosa dos trópicos.  
Imprescindível.

Renato, trabalhador incansável e grande amigo.  
Não fique chateado se as palavras não saíam.  
Elas habitam o meu coração.

Rejane, gostaria de ter sido com você tão dedicado quanto você foi comigo.  
Garantiu a este trabalho competência e resultados confiáveis.

Rubinho, observador criterioso e criativo.  
Sua imaginação ainda se prende à minha.  
Paciência! Em breve estará pronto e livre.

Os amigos do LABEX.  
Tantos, que não quero discriminar.  
Certeza de um ambiente de trabalho tranquilo em harmonia.  
Um desejo de sair de casa.

Aos amigos por aí,  
Obrigado por me acompanharem na cerveja, churrasco, pizzada, futebol, discotecagens,  
caipirinhas, praia, sítio, piscina, viagens, gamão, saraus, festas e afins.  
O que seria a vida sem tudo isto?

O Rock and Roll,  
Alta dose de energia.  
Uma certa raiva.  
Veneno posto no som.  
Uma coisa não intelectual.  
É isso, rock só é rock se não for seguro.

Aos animais, os ratos que eu utilizei.  
Não agradeço, peço perdão;  
Pois eu tenho consciência e vocês não.  
A mosca e a aranha,  
Morre um, sobrevive o outro.  
Os ratos e eu,  
Morre um, sobrevive o outro.  
Seria esta a nossa relação?

Renata,  
Nunca se importa com o que eu faço.  
Releva e me ergue.  
Ela, como ninguém, sabe como eu sou.

## ÍNDICE

|                                      |                |
|--------------------------------------|----------------|
| <b>RESUMO GERAL.....</b>             | <b>11</b>      |
| <b>ABSTRACT.....</b>                 | <b>12</b>      |
| <b>INTRODUÇÃO GERAL.....</b>         | <b>13</b>      |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>              | <b>16</b>      |
| <br><b>CAPÍTULO I.....</b>           | <br><b>19</b>  |
| ABSTRACT.....                        | 20             |
| INTRODUCTION.....                    | 23             |
| MATERIAL AND METHODS.....            | 21             |
| RESULTS.....                         | 30             |
| DISCUSSION.....                      | 35             |
| REFERENCES.....                      | 37             |
| <br><b>CAPÍTULO II.....</b>          | <br><b>41</b>  |
| RESUMO.....                          | 42             |
| INTRODUÇÃO.....                      | 43             |
| MATERIAIS E MÉTODOS.....             | 45             |
| RESULTADOS.....                      | 48             |
| DISCUSSÃO.....                       | 51             |
| REFERÊNCIAS.....                     | 55             |
| <br><b>CAPÍTULO III.....</b>         | <br><b>59</b>  |
| RESUMO.....                          | 60             |
| INTRODUÇÃO.....                      | 61             |
| MATERIAIS E MÉTODOS.....             | 63             |
| RESULTADOS.....                      | 68             |
| DISCUSSÃO.....                       | 74             |
| PERSPECTIVAS.....                    | 78             |
| REFERÊNCIAS.....                     | 78             |
| <br><b>CAPÍTULO IV.....</b>          | <br><b>83</b>  |
| RESUMO.....                          | 84             |
| INTRODUÇÃO.....                      | 85             |
| MATERIAIS E MÉTODOS.....             | 87             |
| RESULTADOS.....                      | 91             |
| DISCUSSÃO.....                       | 94             |
| PERSPECTIVAS.....                    | 99             |
| REFERÊNCIAS.....                     | 99             |
| <br><b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b> | <br><b>105</b> |

## RESUMO GERAL

O empirismo do treinamento pode levar a um desequilíbrio entre estímulo da atividade motora e tempo de recuperação do esforço. Como consequência o atleta pode experimentar um estado agudo de fadiga e queda de desempenho denominado de *overreaching*, revertido em poucos dias. A persistência desta situação de desequilíbrio pode levar a um quadro crônico de sensação de fadiga acompanhado de queda de desempenho denominado de síndrome do *overtraining* (OTS), que pode durar semanas ou meses. O objetivo deste trabalho foi padronizar um protocolo controlado e reprodutível de treinamento em ratos que contivesse um período de desequilíbrio entre o estímulo do exercício e o tempo de recuperação que gerasse queda de desempenho. Há duas formas de exercício em ratos amplamente utilizadas na literatura: a natação e a corrida em esteira. Os primeiros dois capítulos deste trabalho descrevem a padronização de um teste de desempenho em natação, reprodutível ao longo do crescimento animal, para ser utilizado em estudos longitudinais. Para isso, precisávamos considerar o empuxo sofrido pelo animal no meio líquido e validamos (Capítulo I) um aparato de medição de volume para animais vivos e conscientes (AMV). No capítulo II apresentamos os dados da comparação da reprodutibilidade de dois testes de desempenho até a exaustão na natação durante os cinco primeiros meses de vida dos ratos. Um teste com adição de cargas ajustadas de acordo com o percentual da massa corporal (MC) e outro com cargas constantes (CC). Utilizando o AMV constatamos que a densidade dos animais não variava e, como consequência, o teste MC diminuía o tempo de exaustão conforme os ratos aumentavam a massa durante o crescimento, enquanto o teste CC mantinha o tempo de exaustão ao longo do tempo. Paralelamente, iniciamos os estudos com exercício em esteira. No Capítulo III apresentamos um protocolo de 11 semanas, onde o desequilíbrio entre exercício e recuperação foi determinado pelo aumento das sessões diárias nas três últimas semanas em 2, 3 e 4 vezes, com diminuição no tempo de recuperação entre elas. Selecionamos no final desse treinamento dois grupos de ratos, aqueles que apresentaram baixo desempenho (BD) e aqueles que apresentaram aumento ou manutenção do desempenho (AD). Embora ambos os grupos tenham apresentado uma diminuição da massa corporal durante o aumento da frequência de treinamento, o grupo BD precisou de uma semana a mais de repouso para voltar a aumentar a massa, sem modificar o desempenho. No Capítulo IV comparamos quatro grupos de ratos obtidos desse protocolo (Controle (CO), Treinados (T), BD e AD) em análises no sangue (glutamina, glutamato, alanina e hemograma) e músculo (citrato sintase (CS), lactato desidrogenase e glicogênio). Comparando BD com T e AD observamos: (1) diminuição da concentração plasmática de glutamina e aumento na de glutamato, com valores semelhantes aos do grupo CO; (2) diminuição da capacidade oxidativa (CS) e manutenção dos estoques de glicogênio; (3) leucocitose. Em vista das diferenças encontrada entre os grupos BD e AD, concluímos que o protocolo de treinamento de indução de *overreaching* representa uma ferramenta metodológica importante, que pode auxiliar no desvendamento dos mecanismos causadores da queda de desempenho nos estados de *overreaching*/OTS.

## ABSTRACT

The empirical training can lead to an imbalance between the motor activity stress and recovery. As consequence, the athlete can try an acute state of fatigue and performance decrement called *overreaching*, reverted in a few days. This continuous unbalance can lead to a chronic fatigue state called as *overtraining* syndrome (OTS), that may last weeks or months. Our goal was to standardize a controlled and reproducible training protocol in rats that contained an unbalance period between exercise stress and recovery with performance decrement. Two forms of exercise is widely used for rats training in literature: swimming and treadmill running. Chapters I and II describe an adequate standardization for workload in swimming tests when applied to longitudinal studies with sedentary rats. Therefore, considering the rats' buoyance, we validate (Chapter I) an apparatus for measuring conscientious living rat body volume (AMV). In chapter II, we evaluated two types of swimming tests with overload in sedentary rats: one with the load adjusted according to percentage of body weight (BW) and another one with constant load (CL) over time. Through the AMV, we found that the rats' density did not vary significantly, as consequence, MC test showed performance decrement as the rats had their mass increased, while CC test maintained performance along rats growth. In time, we initiate the studies with treadmill exercise. In Chapter III, we present an eleven weeks training protocol where the unbalance between exercise stress and recovery was determined by the increase of the daily sessions in 2, 3 and 4 times in the last three weeks, reducing the recovery time between sessions. We selected two groups of rats in the end of the training protocol, those that presented low performance (BD) and those that presented performance increase or maintenance (AD). Although both groups (AD and BD) showed corporal mass reduction during the increase of the daily frequency, BD group return to increase the mass one week later than AD group, without modifying the performance. In Chapter IV, we compare four groups of rats after the eleven weeks training protocol (Control (CO), Trained (T), AD and BD) in blood (glutamine, glutamate, alanine and hematological variables) and muscle analyses (citrate synthase (CS), lactate dehydrogenase and glycogen). Comparing BD with AD and T groups, we observe: (1) reduction of the glutamine plasma concentration and increase of glutamate, with similar CO values; (2) reduction of the oxidative capacity (CS) and maintenance of the glycogen stores; (3) leucocytosis. We conclude that the training protocol induces the rats to *overreaching* and it represents a relevant methodological tool in *overreaching* / OTS metabolic mechanisms research involved in performance decrement.

## INTRODUÇÃO GERAL

A síndrome do overtraining (OTS) representa uma das complicações mais temidas por atletas de competição e é um assunto de relevante interesse investigativo da ciência relacionada ao esporte (14). Embora nos últimos anos o conhecimento sobre os mecanismos geradores do OTS tenha aumentado (2, 7, 10, 14), ainda há uma forte demanda por informações e procedimentos que possam definir e diagnosticar o OTS com precisão (14). O OTS é hoje definido como um quadro crônico de sensação de fadiga e queda de desempenho que pode persistir por semanas ou meses (1, 10) apresentando diversas alterações, entre eles distúrbios de comportamento (14). Tal ocorrência é considerada rara (14), mas o chamado *overtraining* de curta duração ou *overreaching* (6, 12) ocorre com certa frequência, e é definido quando o atleta experimenta um estado agudo de fadiga e queda de desempenho que pode ser revertido em poucos dias ou algumas semanas (1, 10).

A falta de uma terminologia consistente de consenso geral é apenas um dos problemas associados com a pesquisa desta área (7). Denominações como *underperformance syndrome*, *staleness*, *overwork*, *stagnation*, *chronic fatigue*, *overfatigue*, *overstrain*, *burnout* e *overtraining syndrome* (3, 5, 9) são frequentemente encontrados na literatura. Halson e Jenkendrup (7) apontaram sete vieses na investigação do *overreaching*/OTS que dificultam a comparação entre os estudos. Basicamente estes autores resumiram a falta de controle ou não descrição adequada das cargas de treinamento e testes de desempenho como as principais dificuldades.

A queda de desempenho parece ser o único parâmetro de consenso na literatura que deve estar obrigatoriamente associado tanto ao *overreaching* quanto ao OTS (1). Portanto, qualquer modelo de treinamento que tenha o objetivo de investigar o *overreaching*/OTS requer um controle sensível do desempenho. O maior problema é que modelos de indução intencional do estado de

OTS em atletas de alto nível seriam contraditórios (1), pois levariam a redução da capacidade funcional do indivíduo.

Neste panorama, a padronização de modelos de treinamento em animais pode auxiliar na compreensão dos mecanismos envolvidos na manifestação do *overreaching* ou OTS, e contribuir na interpretação dos dados referentes aos seres humanos. O objetivo do presente trabalho continha esse desafio, padronizar um modelo de indução de *overreaching*/OTS em ratos, diagnosticado através de um teste de desempenho reprodutível que pudesse discriminar as possíveis adaptações positivas e negativas que porventura ocorressem durante o protocolo de treinamento. Também procuramos cercar alguns biomarcadores no sangue e músculo após a aplicação do protocolo, a fim de delimitar perspectivas para futuras investigações e averiguar o potencial do modelo no entendimento dos mecanismos envolvidos no *overreaching*/OTS.

## *DESENVOLVIMENTO DO PROJETO*

O presente trabalho está dividido em quatro capítulos escritos na forma de artigo científico no padrão usual. Cada capítulo contém o seu próprio resumo, introdução, materiais e métodos, resultados e discussão no intuito de serem compreendidos de forma independente.

### *Capítulos I e II: Natação*

Os capítulos I e II contemplam os experimentos realizados com ratos utilizando a natação como forma de exercício. Esta foi nossa primeira opção na tentativa de padronização do protocolo de treinamento. A natação possui uma série de vantagens, pois requer um equipamento mais simples e barato, os ratos são nadadores naturais e ficam altamente motivados a evitar o

afofamento o que garante alto nível de desempenho (4). Esses dados também fazem parte do projeto de IC do aluno Renato Buscariolli de Oliveira, bolsista Fapesp.

Antes de elaborarmos o protocolo de treinamento de natação havia a necessidade de padronizar um teste de desempenho confiável, e que não sofresse alterações com o crescimento animal, visto que o treino poderia durar várias semanas. Nesse sentido, podemos agrupar as propostas de testes de desempenho para ratos na natação em quatro grandes categorias: testes de velocidade, testes em labirintos, testes de endurance até a exaustão (4) e testes até a exaustão em sistema de turbilhão (8).

Escolhemos o teste até a exaustão com adição de chumbo atado ao animal a fim de reduzir o tempo do teste. No entanto, a flutuabilidade precisava ser quantificada, visto que no meio líquido ela poderia influenciar significativamente o resultado dos testes (11). Assim, no Capítulo I mostramos a validação de um aparato de medição de volume (AMV) dimensionado para aferições em ratos vivos e conscientes. Estes resultados já estão publicados (Hohl, R.; Oliveira, R. B. DE; Macedo, D. V.; Brenzikofer, R. (2007). Apparatus for measuring rat body volume: a methodological proposition. *Journal of Applied Physiology* 102: 1229-1234, 2007).

No capítulo II apresentamos a investigação de dois tipos de teste até a exaustão durante 4 meses de crescimento dos animais: 1- ajuste de cargas através da porcentagem da massa corporal (MC) e 2- com cargas constantes (CC). O objetivo foi selecionar o teste de desempenho que não sofresse interferência durante o crescimento dos ratos, visto que não encontramos na literatura trabalhos com este enfoque. Esses resultados estão submetidos para publicação na mesma revista do trabalho anterior.

### *Capítulos III e IV: Corrida em esteira*

Paralelamente buscamos validar um protocolo de treinamento já utilizado no Labex (15), o que demandou como na natação a padronização de um teste de desempenho em esteira que não sofresse influência da maturação/crescimento durante o tempo em que os animais fossem submetidos ao treinamento.

No capítulo III mostramos a padronização e a validação de um protocolo de indução de *overreaching* diagnosticado através da queda de desempenho aferido por um teste reprodutível e sensível às adaptações do treinamento. Estes dados também fazem parte do projeto de IC do aluno Rodrigo Luiz Ferraresso, bolsista Fapesp.

No Capítulo IV analisamos os 4 grupos resultantes do protocolo descrito no Capítulo 3 em relação a alguns biomarcadores no sangue (glutamina, glutamato, alanina e hemograma) e músculo (citrato sintase (CS), lactato desidrogenase e glicogênio). Estes dados também fazem parte do projeto de IC da aluna Rejane Cristina Lucco, bolsista PIBIC/CNPq. Neste capítulo discutimos perspectivas da utilização do modelo desenvolvido neste trabalho baseado nos dados dos biomarcadores quantificados.

## **REFERÊNCIAS**

- 1. Armstrong LE, VanHeest JL.** The Unknown mechanism of the overtraining syndrome. *Sports Med* 32(3):185-209,2002.
- 2. Barron JL, Noakes TD, Levy W.** Hypothalamic dysfunction in overtrained athletes. *J Clin. Endocrinol. Metab.* 60:803-806, 1985.

3. **Budgett R, Newsholme E, Lehmann M, Sharp C, Jones D, Peto T, Collins D, Nerurkar L, White P.** Redefining the overtraining syndrome as the unexplained underperformance syndrome. *Br J Sports Med* 34: 67-68, 2000.
4. **Dawson CA and Horvath SM.** Swimming in small laboratory animals. *Med Sci Sports* 2: 51-78, 1970.
5. **Eicher ER.** Overtraining: consequences and prevention. *J Sports Sci* 13: 41-48, 1995.
6. **Fry AC, Kraemer WJ.** Resistance exercise overtraining and overreaching. *Sports Med* 23:106-129,1997.
7. **Halsen LH, Jenkendrup AE.** Does overtraining exist? An analysis of overreaching and overtraining research. *Sports Med* 34: 967-981, 2004.
8. **Kramer K, Dijkstra H, Bast A.** Control of Physical Exercise of Rats in a Swimming Basin. *Physiol Behav* 53: 271-276, 1993.
9. **Kreider R, Fry AC, O'Toole M.** *Overtraining in sports: terms, definitions and prevalence.* In: Overtraining in sports. Champaign, IL, Human Kinetics, pp. vii-ix, 1998.
10. **Lehmann M, Foster C, Keul J.** Overtraining in endurance athletes: a brief review. *Med. Sci. Sports Exerc* 25(7):854-862, 1993.
11. **Mcardle WD and Montoye HJ.** Reliability of exhaustive swimming in the laboratory rat. *J Appl Physiol* 21 (4): 1431-1434, 1966.
12. **Smith DJ, Norris SR.** Changes in glutamine and glutamate concentrations for tracking training tolerance. *Med. Sci. Sports Exerc* 32(3):684-689, 2000.
13. **Snyder AC.** Overtraining and glycogen hypothesis. *Med Sci Sports Exerc* 30:1146-1150, 1998.
14. **Urhausen A, Kindermann W.** Diagnosis of overtraining: what tools do we have?. *Sports Med* 32(2):95-102, 2002.

- 15. Zoppi CC, Macedo DV.** Overreaching-induced oxidative stress, enhanced HSP72 expression, antioxidant and oxidative enzymes downregulation. *Scand J Med Sci Sports*, 2007 (*In Press*).

# **CAPÍTULO I**

## **APPARATUS FOR MEASURING RAT BODY VOLUME: A METHODOLOGICAL PROPOSITION**

Rodrigo Hohl; Renato Buscariolli de Oliveira; Denise Vaz de Macedo; René Brenzikofer

## ABSTRACT

We propose a communicating vessels system to measure body volume in live rats through water level detection by hydrostatic weighing. The reproducibility, accuracy, linearity and reliability of this apparatus were evaluated in two tests using either previously weighed water or six aluminum cylinders of known volume after proper system calibration. The applicability of this apparatus to measure live animals (*Wistar* rats) was tested in a transversal experiment with five rats, anesthetized and non-anesthetized. We took 18 measurements of the volume under each condition (anesthetized and non-anesthetized) totaling 90 measurements. The addition of water volumes (50–700ml) produced a regression equation with a slope of  $1.0006 \pm 0.0017$ , intercept of  $0.75 \pm 0.81$  ( $R^2=0.99999$  and  $SEE=0.58\text{ml}$ ) and a bias of about 1ml. The differences between cylinders of known volumes and volumes calculated by the system were lower than 0.4ml. Mean volume errors were found between 0.01% and 0.07%. Regarding the live models, the mean  $\pm$  SD difference between the volumes obtained for anesthetized and non-anesthetized rats was  $0.31\text{ml} \pm 2.34\text{ml}$  ( $n=90$ ). These data showed that animal movement does not interfere with the volume measured by the apparatus proposed, and neither anesthesia nor fur shaving is needed for this procedure. Nevertheless, some effort should be taken to eliminate air bubbles trapped in the apparatus or the fur. The proposed apparatus for measuring rat body volume (AMV) is cheap and may be useful for a range of scientific purposes.

## INTRODUCTION

The density or specific gravity of the body is a biological parameter determined by the body-volume to weight ratio. Density determination is important for evaluating morphological changes provoked by age (19), use of drugs (24, 28), different diets (6, 16, 25) or training (28) because it is inversely related to the percentage of body fat in humans (1) and animals (6). Moreover, the determination of density may play a major role in the application of exhaustion tests in rats subjected to swimming effort (5, 11, 18, 20, 25) since the volume and mass of the animals accounts for their buoyancy in water. Indeed, in 1947, Scheer et al.(25) showed that the reproducibility of performance tests was significantly increased when the animals had their densities homogenized prior to tests. However, the standardization of effort intensity in rats subjected to exhaustion swimming tests are still performed by the addition of a load equivalent to a percentage of body mass rather than animal volume (i.e. density) (4, 10, 21, 29).

Other studies on development and the validation of procedures for measuring volume in humans and small animals date from the beginning of the 20<sup>th</sup> century and comprise methods including air displacement, helium dilution and hydrostatic weighing (1, 3, 6, 9, 13, 14, 16, 22, 23, 27, 30, 31).

The air-displacement procedure consists of a partial evacuation of a standard chamber connected to another chamber of known volume that contains the body to be measured. After connecting the two chambers, pressure equilibrates and the body volume is calculated from the temperature and pressure obtained in both chambers (9, 12, 15). According to Hix et al. (12), possible sources of error in this procedure are changes in temperature, air humidity and insufficient precision of pressure sensors. More recently, an air displacement plethysmograph (BOD POD), without the need to conduct measurements under isothermal conditions - since the

air in the chambers is allowed to compress and to expand adiabatically -was commercially available for measuring human body volume (7, 8, 17).

The helium dilution method is performed in a chamber of known volume with a fixed volume of helium (9, 12, 26, 30). The unknown volume of a body is determined by a conductance cell used for analyzing helium concentration (12) or by the principle for dilution of gases (30). In the first case, determination of the volume by the conductance cell is affected by air humidity and CO<sub>2</sub>, since the cell is sensitive to both of these variables (12). Temperature, helium absorption by the body and incomplete mixture of the gas interfere with the volume determination in the other method (30).

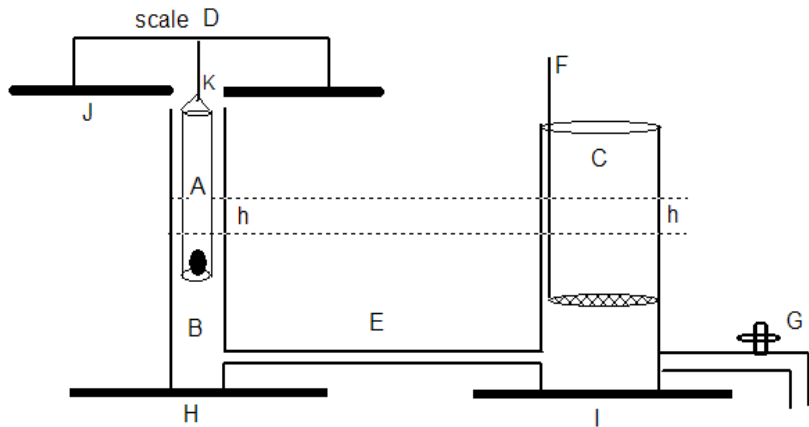
Hydrostatic weighing has been the main procedure used for determining the volume of animals. This technique, based on Archimedes' principle, compares weight in the air to the apparent weight in a liquid medium of known density. The main difficulty in using this procedure is the movement of the animal during measurement. To address this issue, most studies have used either anesthetized (14, 28) or dead (6, 22, 23, 24) animals. Fur shaving is also performed to decrease bubbles trapped among the hairs (6, 16, 22, 23). However, these procedures are not feasible in a longitudinal study evaluating the individual body density of live animals subjected to a specific condition of training or nutrition for several weeks.

This study presents an easily manufactured apparatus for measuring body volume in small animals, which can accurately and reproducibly measure body volume in live rats without anesthesia or fur shaving.

## MATERIAL AND METHODS

### *APPARATUS FOR MEASURING RAT BODY VOLUME (AMV)*

The apparatus for measuring rat body volume (AMV) is shown in Figure 1. It consists of two communicating-cylindrical vessels linked through a flexible hose. The rat is placed in one vessel [C] while water level changes are measured by hydrostatic weighing of a cylindrical test tube with a lead ballast [A] performed in the other vessel [B]. The connecting flexible hose is sized to attenuate the transmission of disturbances caused by animal movements and the reinforced walls prevent the internal volume from being altered by pressure. The AMV is simple and dismountable. Caution should be taken so that supports [H, I, J] are tight and the scale is protected against circulation of air. Glass or other transparent material should be used for the vessel [C] so that the animal can be viewed and observation facilitated. To maximize the linearity of the system, those parts that are susceptible to becoming wet when the water level rises must be cylindrical. The characteristics of the main components of AMV are described in Table 1.



**Figure 1.** APPARATUS FOR MEASURING RAT BODY VOLUME (AMV). [A] Test tube with lead ballast; [B] Measurement vessel; [C] Glass vessel for submerging the animals; [D] Digital scale; [E] Flexible hose connecting the vessels; [F] Screen for feces retention; [G] Faucet; [K] Iron rod; [H, I, J] Iron supports to fix the system; [h] Variation in water height before and after animal was introduced in the system.

**Table 1.** Functions, dimensions and specification of the main components of AMV

| <b>Component Description</b> | <b>Function</b>                                | <b>Length(mm)</b> | <b>Diameter(mm)</b> |
|------------------------------|------------------------------------------------|-------------------|---------------------|
| A – Ballasted test-tube      | Measures water level                           | 230               | 29.7                |
| B - Vessel 2                 | Communicating vessel which holds the test tube | 510               | 47.5                |
| C - Vessel 3                 | Communicating vessel which holds the animal    | 330               | 68                  |
| D - Scale                    | Hydrostatic weighing                           | *                 | -                   |
| E - Flexible hose            | Connects the communicating vessels             | 1250              | 8                   |
| F - Retention Screen         | Supports animal / feces retention              | -                 | -                   |
| K - Iron Rod                 | Connects the test tube to the scale plate      | 200               | -                   |

\*Scale features: minimum capacity = 0.50g, maximum capacity = 1010g, sensitivity = 0.01g, hydrostatic weighing function.

#### *AMV setup protocol*

1. Connection between both vessels [B and C] through the flexible hose [E];
2. Addition of water (1.7 L) in the communicating vessels system; removal of air bubbles from inside the flexible hose [E] and vessels [B and C] by vigorous shaking (lifting and tilting) of the system and water flow by the faucet [G];
3. Hang the ballasted test tube [A] to the scale [D] by a rod [K] and centralize it inside the vessel [B];
4. Addition of water in vessel [C] until the bottom of the test tube [A] is reached inside the vessel [B]; this is signaled by the scale [D];
5. Addition of water (150 ml) in the vessel [C] until water level goes over the rounded base of the test tube and reaches its cylindrical portion;
6. Tare of the scale [D] before initiating calibration.

### *VOLUME DETERMINATION*

The introduction of the animal inside the vessel [C] increases water level [h] in the system. Simulations in which the volume measured was related to the dimension of the components optimized the sensitivity of the apparatus. The rat volume ( $V_{\text{rat}}$ ) is related to the variations in volume “ $\Delta V_B$ ” and “ $\Delta V_C$ ” from vessels [B] and [C], respectively:

$$V_{\text{rat}} = \Delta V_C + \Delta V_B - \Delta V_A - \Delta V_F$$

where “ $\Delta V_A$ ” and “ $\Delta V_F$ ” are the variations in volume occupied by the test tube [A] and by the supporting rod of the retention screen [F], respectively.

The increase in the water level [h] around the test tube [A] of diameter “ $d_A$ ”, causes variation in the scale reading ( $M_{\text{scale}}$ ) of:

$$M_{\text{scale}} = D_{\text{water}} \times \pi \times (d_A)^2 \times h/4$$

where  $D_{\text{water}}$  indicates water specific mass (1g/ml).

Hence, rat volume is directly proportional to the variation indicated in the scale:

$$V_{\text{rat}} = M_{\text{scale}} \times [(d_C)^2 + (d_B)^2 - (d_A)^2 - (d_F)^2] / (d_A)^2$$

In this equation, “ $d_B$ ” and “ $d_C$ ” are the inner diameters of vessels [B] and [C], “ $d_A$ ” is the outer diameter of the test tube [A] and “ $d_F$ ” is the diameter of the supporting rod of the retention screen [F].

Thus,  $M_{\text{scale}}$  varies according to the volume of the object inserted into the system. If the components [A, B, C and F] are cylindrical in the range of water level variation,  $V_{\text{rat}}$  does not depend on the initial water level at tare time. In practice, the volume measure depends only on the value read in the scale ( $M_{\text{scale}}$ ) and the calibration equation quantified after setting up.

### *AMV CALIBRATION*

The purpose of the calibration procedure is to quantify the equation, which relates the volume of the submersed body to the value displayed by the scale. A fast and precise method of calibration was developed using six cylindrical aluminum machined parts (about 5cm diameter x 5cm height) measured for a precise determination of individual volume. Calibration consisted of consecutive introduction of the parts into the vessel [C] with caution to eliminate eventual air bubbles. After each part was introduced, the scale reading was registered after stabilization (about 20s). This procedure was repeated until the last part was added. The values measured by the scale were related to the summation of the part volumes, and a linear least squares fit was applied to this data to determine the calibration equation. Thirteen of these calibrations were carried out over five months.

A methodological remark is that the calibration must be determined with the test tube wetted. Thus, we suggest metallic parts to be inserted together in the system before calibration begins.

### *AMV TESTS WITH WEIGHED WATER AND INANIMATE OBJECTS*

The AMV and its calibration were tested for agreement, linearity and accuracy. As there are no animals with accurately known volume, standard volumes of water measured by weighing ( $50.00 \pm 0.05$ ml) were consecutively introduced into the vessel [C]. The values obtained on the scale were registered and the calibration equation (obtained with the aluminum cylinders) was applied to evaluate the measured volumes of water.

We also evaluated the ability of the AMV to determine with accuracy and reproducibility the known volume of inanimate objects. We used the 13 calibration lines to determine the volumes of six aluminum cylinders throughout 5 months.

#### *TRANSVERSAL EVALUATION OF THE VOLUME OF ANESTHETIZED AND NON-ANESTHETIZED ANIMALS*

The experimental protocols using animals were previously approved by the Animal Experimentation Ethics Committee (638-1). To test the reproducibility of volume measurement in live animals, five male *Wistar* rats of different sizes and ages (Table 2) were used in a transversal study. Each animal was introduced six times into the system, either anesthetized or not. The experiments were carried out on different days, always at the same time. One rat was used per day and the system was previously calibrated with the aluminum cylinders.

**Table 2.** Age and mass of the rats used in the transversal analysis.

| <b>Rat</b> | <b>Age (days)</b> | <b>Mass (g)</b> |
|------------|-------------------|-----------------|
| 1          | 58                | 297.87          |
| 2          | 84                | 343.59          |
| 3          | 120               | 420.07          |
| 4          | 105               | 373.59          |
| 5          | 107               | 375.02          |

A non-anesthetized rat was first introduced in the vessel [C]. Measurements were taken only after the animal was calm and acclimated to the water ( $35 \pm 1^\circ\text{C}$ ) and container conditions. The rat was kept almost submerged by a screen - similar to that used for feces retention [F] – only its muzzle was not under water to allow breathing (Figure 2). Three volume determinations were measured every time an animal was introduced in the system. Each volume determination resulted

from the mean of 20 measurements taken over 30s and calculated automatically by the scale software. Because rats were introduced into the system six times, 18 measurements were taken for each animal. A total of 90 volume measures were made. Each apparent weight measurement lasted about 3 min. After each weighing session, the animal was dried with towel and dryer. Before another trial, the volume of water trapped in the fur of the rats and removed from the system was replaced. The scale was then tared.



**Figure 2.** Rat being measured by AMV.

The same procedure was repeated when the animals were anesthetized by intraperitoneal sodium thiopental (40 mg/kg body weight). Each rat was introduced into the system by a stick. Dental floss was tied in the incisive teeth of the rat to keep its muzzle above water and thus assure

breathing during weighing. The animals were agitated with a stick introduced in the water that passed between the walls of the vessel and the rat, so that the air bubbles trapped in the fur were released.

To evaluate the effect of air bubbles trapped in the fur of the anesthetized animals on the volume, complementary volume measurements were taken from one rat (Rat 1). Six weight sessions were conducted, each one with three measures taken before and three after the rat was agitated with a stick, resulting in 18 weight measures in each condition. The volume of the animal was obtained in all the cases, applying the value read on the scale to the calibration equation obtained in the same experimental trial.

#### *STATISTICAL ANALYSIS*

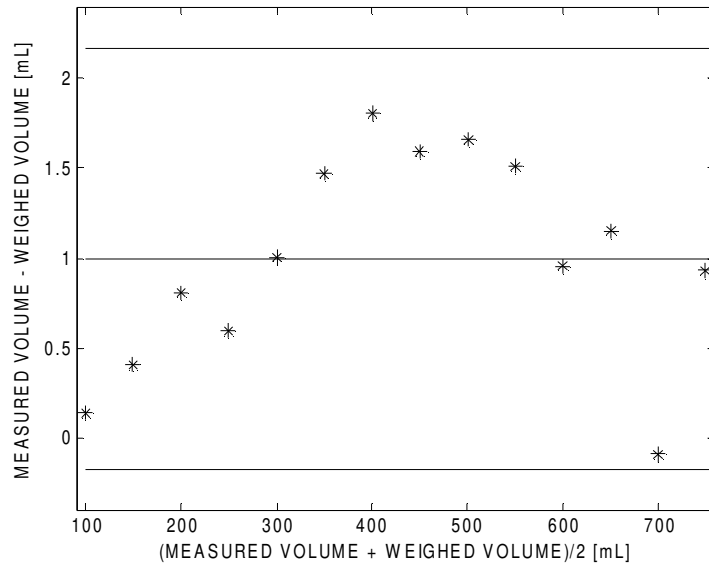
To compare the measured volumes with the standard ones, two types of analysis were performed. A linear regression between the two variables related the line of identity to the test of the agreement of the results. To show the bias across the range of measured inanimate volumes, a Bland-Altman (1986) analysis was performed, which also permits the evaluation of the precision and accuracy of the methodology. A parametric ANOVA for independent groups was used to evaluate rat 1 anesthetized or not, with or without agitation. The significance level was set at  $p < 0.05$ .

## RESULTS

### *BEHAVIOR OF AMV MEASURING PREVIOUS WEIGHTED WATER AND INANIMATE OBJECTS*

A typical linear regression between the volumes of the aluminum cylinders and the scale displays resulted in a calibration line with slope of  $6.87 \pm 0.04 \text{ ml/g}$  and an intercept of  $1.70 \pm 2.1 \text{ ml}$  ( $R^2 = 0.99998$  and  $\text{SEE} = 0.22 \text{ ml}$ ). This calibration was performed 13 times over 5 months, and a specific equation for adjustment was calculated for each calibration.

The comparison between the water volume measurements by AMV (using a previous aluminum cylinders calibration) and by weighing shows linearity and agreement. The linear regression indicates a  $1.0006 \pm 0.0017$  slope, intercept of  $0.75 \pm 0.81$ ,  $R^2 = 0.99999$  and  $\text{SEE} = 0.58 \text{ ml}$ . The difference between these variables as a function of the volume is shown in the Bland-Altman Plot (Figure 3). The differences between the volumes show a mean of  $0.996 \text{ ml}$  and a standard deviation of  $0.584 \text{ ml}$  with a bias of about  $1 \text{ ml}$ . In addition to the line for mean difference, Figure 3 includes the experimentally observed  $\pm 2\text{SD}$  limit of the differences between volumes. Expressed in percent of the measured volume, the values for the mean  $\pm 2\text{SD}$  are  $0.262\% \pm 0.266\%$ .



**Figure 3.** Difference between water volume measured by AMV and weighed water volume (standard) compared with the mean for both measurements. The lines are the mean difference  $\pm 2SD$ .

Table 3 shows the actual volumes of six cylinders and the mean  $\pm 2SD$  of the 13 volumes of each respective cylinder measured in the AMV throughout 5 months. The differences between the actual volume and the volume measured by AMV is less than 0.4ml. The mean volumes errors, expressed as a percentage, varied between 0.01% and 0.07% except for the first cylinder (0.36%), showing good accuracy of the system.

The reliability of the measurements was also good. The coefficient of variation ( $2SD \text{ AMV Volume} / \text{Actual Volume}$ ) gave a mean  $\pm SD$  of  $0.16\% \pm 0.14\%$ .

**Table 3.** Actual volume and mean volume of six aluminum cylinders calculated in the AMV system after 13 calibration procedures over 5 months.

| Actual Volume (ml) | AMV Volume $\pm$ 2SD (ml) | Diff. (ml) | Mean Error | CV2SD  |
|--------------------|---------------------------|------------|------------|--------|
| 107.76             | 108.148 $\pm$ 0.461       | 0.388      | 0.0036     | 0.0043 |
| 215.56             | 215.620 $\pm$ 0.456       | 0.0602     | 0.0003     | 0.0021 |
| 323.26             | 323.198 $\pm$ 0.321       | -0.0619    | -0.0002    | 0.001  |
| 430.56             | 430.273 $\pm$ 0.326       | -0.2872    | -0.0007    | 0.0008 |
| 538.15             | 538.230 $\pm$ 0.465       | 0.0795     | 0.0001     | 0.0009 |
| 645.81             | 645.881 $\pm$ 0.326       | 0.0705     | 0.0001     | 0.0005 |

Diff = AMV Volume – Actual Volume;

Mean Error = (AMV Volume – Actual Volume)/Actual Volume;

CV2SD = 2SD/Actual Volume

#### *BEHAVIOR OF AMV MEASURING LIVE MODELS*

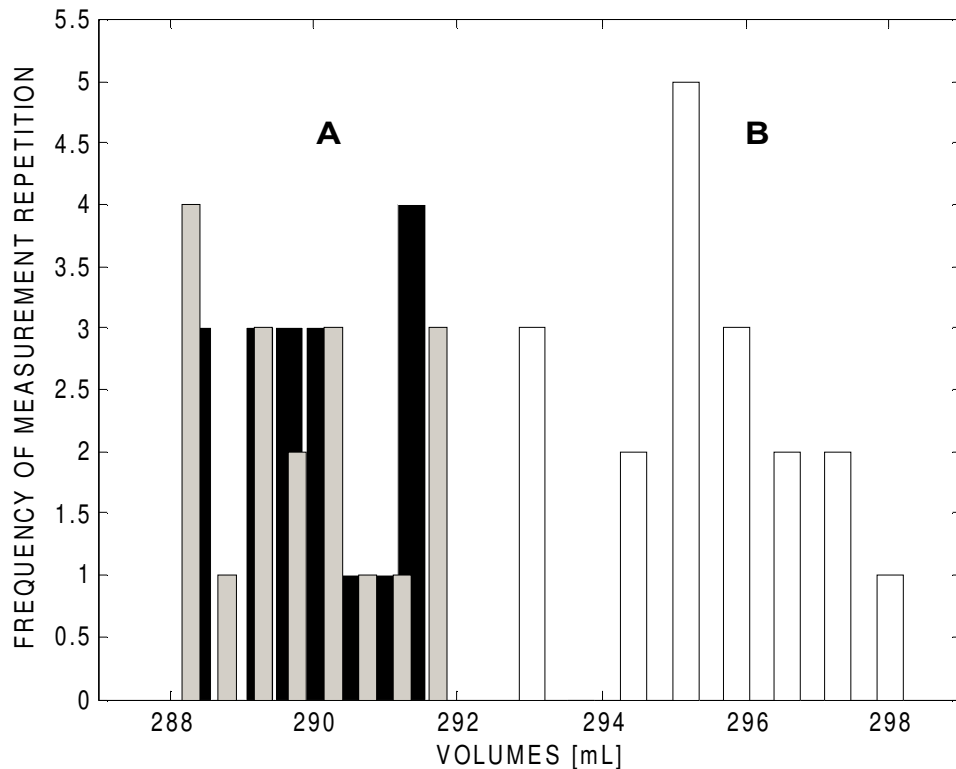
##### *Transversal evaluation of body volume of anesthetized and non-anesthetized animals*

Table 4 shows the mean $\pm$ SD of the volume and density of the rats, either anesthetized or non-anesthetized. The volume variation of rat 1 in the three experimental conditions (18 measurements each) is shown in a histogram in Figure 4. The mean $\pm$ 2SD volume differences between the anesthetized rat 1 that was not agitated for air bubble removal and the non-anesthetized rat 1 was 5.54ml $\pm$ 3.92ml, and between the agitated anesthetized rat 1 and the non-anesthetized rat 1 was 0.07ml $\pm$ 3.06ml. Consequently, the apparent density of the anesthetized not agitated rat 1 (1.008 $\pm$ 0.005g/ml) was significantly lower compared to the agitated one (1.028 $\pm$ 0.004g/ml). In addition, the volume variability in the anesthetized rat 1 was higher before agitation ( $\pm$ 3ml) compared to this measurement after agitation ( $\pm$ 2ml).

**Table 4.** Volume and density of the animals used in the transversal analysis.

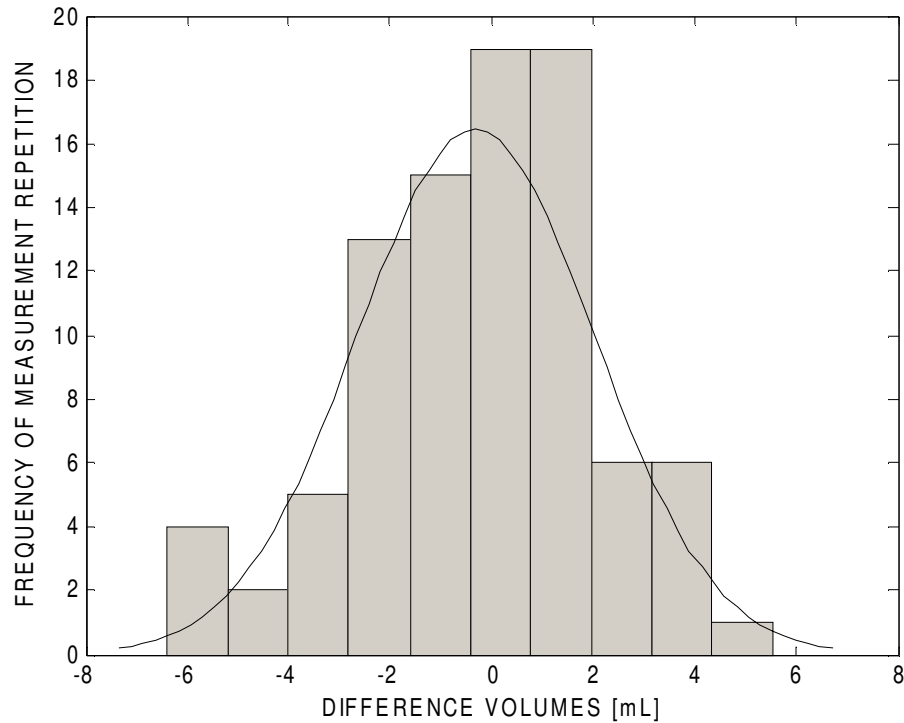
| <b>Rats</b> | <b>volume<br/>non-anesthetized<br/>(ml)</b> | <b>volume<br/>anesthetized<br/>(ml)</b> | <b>density<br/>non-anesthetized<br/>(g/ml)</b> | <b>density<br/>anesthetized<br/>(g/ml)</b> |
|-------------|---------------------------------------------|-----------------------------------------|------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| 1           | 289.9±1.0                                   | 289.9±1.2                               | 1.027±0.004                                    | 1.028±0.004                                |
| 2           | 334.3±1.3                                   | 334.0±1.5                               | 1.028±0.004                                    | 1.029±0.004                                |
| 3           | 409.5±1.7                                   | 410.4±1.5                               | 1.026±0.004                                    | 1.024±0.004                                |
| 4           | 367.1±1.5                                   | 365.5±2.5                               | 1.018±0.004                                    | 1.022±0.007                                |
| 5           | 367.0±1.2                                   | 366.7±1.2                               | 1.022±0.003                                    | 1.023±0.003                                |

Mean±SD of the volumes (ml) and densities (g/ml) of rats (n=5) either anesthetized or not (18 measurements per rat in each condition).



**Figure 4.** Histogram of the volume values calculated from a previous calibration of rat 1. A – Non-anesthetized (black) and anesthetized (gray) after agitation. B – Anesthetized rat before agitation (white).

Figure 5 presents a histogram of the differences between the 90 anesthetized and non-anesthetized volumes of the five rats evaluated in the transversal study. A nearly normal distribution is observed and the mean  $\pm$  SD was 0.31ml  $\pm$  2.34ml.



**Figure 5.** Histogram of volume differences between anesthetized and non-anesthetized rats (n=5). Mean  $\pm$  SD 0.31ml  $\pm$  2.34ml. Total of 90 measurements.

The coefficient of variation, expressed as a percentage (CV%) of the volumes of the anesthetized and non-anesthetized rats was (mean  $\pm$  SD) 0.45%  $\pm$  0.13% and 0.38%  $\pm$  0.04%, respectively. The values of CV% and the small standard deviations (Table 4) indicate a good reliability over repeated measurements of the anesthetized and non-anesthetized rats.

## DISCUSSION

In the present study, we propose a new apparatus for measuring the volume of rats that does not require animal sacrifice, anesthesia or fur shaving. This introduces important advantages relative to current alternative methods. The reproducibility, accuracy and sensitivity of this method are shown in this study. Because this apparatus is easy to construct, it can be used for several scientific purposes.

The movements of the non-anesthetized animal have been reported to impair the determination of body volume by hydrostatic weighing (30). However, the results obtained by the AMV do not support this fact. The density values of the rats, anesthetized or not, were similar to those found in other animals (Table 5), which corroborates the fact that an animal does not need to be anesthetized to be measured by AMV since its movements do not interfere with the process. In contrast, animal movements helped release air bubbles from the fur. Moreover, irrespective of the volume of the animals (small= $289.9 \pm 1.0$ ml; large= $410.4 \pm 1.5$ ml), the  $\square$ SD was low, which confirms the fact that AMV measurements are repeatable. With respect to live animals, considering the standard deviation of  $\square 2.34$ ml (Figure 5), we suggest that one measures each animal two times in the AMV using the mean if the two measurements agree within 2ml. If they disagree by more than 2ml, then a third measurement must be made.

**Table 5.** Referential mammals density

| References | Animal Model                      | Methodology               | $\Delta$ Density (g/mL)               | Age           |
|------------|-----------------------------------|---------------------------|---------------------------------------|---------------|
| 23         | Guinea Pig (n=50)                 | H.W. Dead Animals         | 1.021 to 1.093                        | -             |
| 25         | Rats                              | Live Animals              | $1.015 \pm *$                         | 12 weeks      |
| 16         | Cattle (n=30)                     | H.W. Dead Animals         | 1.017 to 1.070                        | -             |
| 30         | Cats (n=10)                       | H.D. Live Animals         | 1.023 to 1.087                        | -             |
| 14         | Hamster (n=34)                    | A.D. Anesthetized Animals | $1.049 \pm 0.010$                     | 3 months      |
| 28         | <i>Sprague Dawley</i> Rats (n=14) | H.W. Anesthetized Animals | $1.047 \pm 0.01$ to $1.058 \pm 0.009$ | 3 to 6 weeks  |
| 6          | <i>Wistar</i> Rats                | H.W. Dead Animals         | 1.04 to 1.08                          | 28 to 49 days |

H.W. Hydrostatic Weighing; A.D. Air Displacement; H.D. Helium Dilution.

\*  $\pm$ SD not informed.

It seems that the volume of non-anesthetized live animals has been measured solely by a model proposed by Scheer et al. (25). This model worked similarly to AMV, i.e., measuring water displacement after the introduction of a non-anesthetized live animal. In this study (25), the densities of the animals were obtained by the ratio between body weight and the weight of the water volume displaced by the animal and was performed through three transferences of water. However, no comments were made by the authors concerning residual water in the containers, which could lead to measurement error. In addition, the animal in this system was kept completely submerged and isolated during volume measurement (filling the container completely, operating valve closure, opening the emergency exit and finally emptying water content). This study (25) did not report calibration efforts when determining accuracy and/or care in handling air bubble interference; its reproducibility (1%) was mentioned without further specifications. We have shown that AMV has some advantages over this system. Our data (Table 3) show that the maximal relative error in AMV was 0.4% when measuring volumes from 100 to 700ml.

The densities of the 5 rats presented in this work (Table 4) are lower than the minimum values found by others in *Sprague-Dawley* and *Wistar* rats (Table 5). This could be attributed to the fact that the present work, as well as work by Scheer et al (25), calculates the density of conscious living animals, where imprisoned air in the lungs, superior aerial ways and gastrointestinal tract can interfere with density, presenting lower values compared to the carcass of dead animals with fur shaving (6). Thus, it is not possible to use the same relation that exists for dead animals to indirectly define the percentage of body fat of conscious living animals through the density. To define the equation that relates the density of living animals and percentage of body fat was not the objective of this work.

In conclusion, our data show that AMV is reliable, accurate, reproducible and sensitive. The principle for volume measurement can be applied to any animal as long as the system has physical dimensions. AMV is cheap and can be used with live animals allowing for the evaluation of individual body volumes over time in longitudinal experiments that may last many months.

## REFERENCES

1. Behnke AR, Feen BG, Welham WC. The specific gravity of health men. *J Am Med Ass* 118: 495-498, 1942.
2. Bland JM and Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1(8476):307-310, 1986.
3. Bohnenkamp H and Schmäh J. Untersuchungen zu den Grundlagen des Energie-und Stoffwechsels. IV. Mitteilung. Das Reinvolumem sowie die spezifische Dichte des Menschen und die Bestimmungsweise dieser Grossen. *Arch Ges Physiol* 228: 100-124, 1931.

4. **Braga LR, Mello MAR, Gobatto CA.** Exercício contínuo e intermitente: efeitos do treinamento e do destreinamento sobre a gordura corporal de ratos obesos. *Arch Lat Nutr* 54 (1): 58-65, 2004.
5. **Dawson CA and Horvath SM.** Swimming in small laboratory animals. *Med Sci Sports* 2: 51-78, 1970.
6. **Dahms WT and Glass AR.** Correlation of percent body fat with body specific gravity in rats. *J Nutr* 112: 398-400, 1982.
7. **Dempster, P., and S. Aitkens.** A new air displacement method for the determination of human body composition. *Med Sci Sports Exerc* 27: 1692–1697, 1995.
8. **Fields AD, Goran MI, McCrory MA.** Body-composition assessment via air-displacement plethysmography in adults and children: a review. *Am J Clin Nutr* 75: 453-467, 2002.
9. **Gnaedinger RH.** Estimation of density of live pigs by air displacement and helium dilution techniques. (Ph.D. Thesis) – East Lansing: Michigan State Univ., 1962.
10. **Gobatto CA, Mello MAR, Sibuya CY, Azevedo JRM, Santos LA, Kokubum E.** Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comp Biochem Physiol A* 130: 21-27, 2001.
11. **Hardin D.** Reliability of selected swimming endurance tests for laboratory rats. *Res Quart* 39 (2): 405-407, 1968.
12. **Hix VM, Pearson AM, Reineke EP.** Specific gravity of human subjects by air displacement and helium dilution. *J Appl Physiol* 19 (5): 955-958, 1964.

13. **Jongbloed J and Noyons AKM.** Die Bestimmung des wahren Volumens und des spezifischen. *Arch Ges Physiol* 240: 197-201, 1938.
14. **Kodama AM.** In vivo and in vitro determinations of body fat and body water in the hamster. *J Appl Physiol* 31 (2): 218-222, 1971.
15. **Kodama AM and Pace N.** A simple decompression method for *in vivo* body fat in small animals. *J Appl Physiol* 18: 1272-1276, 1963.
16. **Kraybill HF, Bitter HL, Hankins OG.** Body composition of cattle. II. Determination of fat and water content from measurement of body specific gravity. *J Appl Physiol* 4 (7): 575-583, 1952.
17. **McCrory MA, Gomez TD, Bernauer EM, Mole PA.** Evaluation of a new air displacement plethysmograph for measuring human body composition. *Med Sci Sports Exerc* 27:1686–1691, 1995.
18. **Mcardle WD and Montoye HJ.** Reliability of exhaustive swimming in the laboratory rat. *J Appl Physiol* 21 (4): 1431-1434, 1966.
19. **Myhre LG and Kessler WV.** Body density and potassium 40 measurements of body composition as related to age. *J Appl Physiol* 21 (4): 1251-1255, 1966.
20. **Naito HK and Griffith DR.** Interaction of thyroxine, energy metabolism and swimming performance of rats. *Life Sci* 20: 1121-130, 1977.
21. **Raja G, Brau L, Palmer TN, Fournier PA.** Repeated bouts of high-intensity exercise and muscle glycogen sparing in the rat. *The J Exp Biol* 206: 2159-2166, 2003.

- 22. Rathbun EN and Pace N.** The body water and chemically combined nitrogen content in relation to fat content. *J Biol Chem* 158: 685-691, 1945.
- 23. Rathbun EN and Pace N.** The determination of total body fat by means of the body specific gravity. *J Biol Chem* 158: 667-676, 1945.
- 24. Rogers P and Webb GP.** Estimation of body fat in normal and obese mice. *Br J Nutr* 43: 83-86, 1980.
- 25. Scheer BT, Dorst S, Codie, JF, Soule, DF.** Physical capacity of rats in relation to energy and fat content of the diet. *Am J Physiol* 149: 194-203, 1947.
- 26. Siri WE.** Apparatus for measuring human body volume. *Rev Sci Instr* 27: 729-738, 1955.
- 27. Stern H.** Investigations on corporeal specific gravity and on the value of this factor in physical diagnosis. *Med Rec* 59: 204-207, 1901.
- 28. 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.
- 29. Terada S, Yokozeki T, Kawanaka K, Ogawa K, Higuchi M, Ezaki O, Tabata I.** Effects of high-intensity swimming training on glut-4 and glucose transport activity in rat skeletal muscle. *J Appl Physiol* 90: 2019-2024, 2001.
- 30. Walser M and 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.
- 31. Wedgewood RJ, Breckenridge JR, Newman RW.** Measurement of body volume by air displacement. *Fed Proc* 12: 151, 1953.

## **CAPÍTULO II**

# **PADRONIZAÇÃO DE CARGAS EM TESTE DE NATAÇÃO ATÉ A EXAUSTÃO APLICADO EM ESTUDOS LONGITUDINAIS DE RATOS SEDENTÁRIOS**

Rodrigo Hohl; Renato Buscariolli de Oliveira; Denise Vaz de Macedo; René Brenzikofer

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi definir qual a melhor padronização de cargas para ratos sedentários em testes de desempenho na natação para ser aplicada em estudos longitudinais. Para isso, comparamos dois tipos de testes com sobrecarga: um com ajuste das cargas em porcentagens relativas à massa corporal (MC) e outro com carga constante (CC). Os animais (N=30) foram subdivididos em três grupos, cada qual submetido mensalmente, da 8ª até a 20ª semana de vida, a duas cargas diferenciadas (7g e 4%, 11g e 6%, 15g e 8%). Utilizamos como parâmetro de desempenho o tempo para atingir a exaustão. A densidade de nove animais também foi determinada. Nossos resultados mostraram que independente do nível de sobrecarga utilizado no teste MC, todos os grupos apresentaram uma queda significativa no tempo para a exaustão, paralelo a um ganho significativo de massa, principalmente da 8ª para a 12ª semana, confirmando observações antigas, que o ganho de massa corporal não é diretamente proporcional ao aumento de desempenho. Não encontramos diferenças significativas em nenhum grupo e em nenhum momento no teste com CC, indicando uma atenuação da interferência do crescimento animal nesse teste. A gravidade específica também não se alterou significativamente ao longo dos meses. Baseados nestes resultados, propomos que o teste com cargas constantes é o mais adequado para a avaliação do desempenho na natação em estudos longitudinais, pois não aumenta nem diminui a força relativa que o rato deve suportar caso a gravidade específica não se altere significativamente.

## INTRODUÇÃO

A natação é um modelo de exercício amplamente empregado para o estudo da fisiologia, metabolismo celular, psicologia e cognição em animais de pequeno porte (4). A natação apresenta uma série de vantagens frente ao uso da esteira rolante, entre elas o baixo custo do equipamento; a habilidade natural dos pequenos roedores para essa prática - não sendo necessário a seleção de animais - a possibilidade de se trabalhar em intensidades mais elevadas e a alta motivação em evitar o afogamento quando próximos da exaustão, assegurando um alto nível de desempenho (3, 4, 14). Outra diferença importante em relação à esteira rolante é a não necessidade de submeter os animais a outros estímulos que, por si só, poderiam causar estresse (3, 14).

Um dos usos mais recorrentes da natação com roedores tem sido sua utilização para avaliação do desempenho após tratamentos com drogas, dietas, protocolos de treinamentos e suplementações (3, 4, 17, 18). Podemos agrupar as propostas de testes de desempenho em quatro grandes categorias: testes de velocidade, testes em labirintos, testes de endurance até a exaustão (4) e testes até a exaustão em sistema de turbilhão (14, 15, 17).

Ratos sem incremento de carga podem nadar em água isotérmica por até 60 horas antes de atingirem a exaustão, tornando inviável a realização de estudos com testes de desempenho sem a utilização de sobrecarga para diminuir o tempo de nado (13, 22). Dentre as propostas de utilização de sobrecarga, a carga relativa ajustada pela massa corporal é a metodologia mais empregada para determinar adaptação dos animais aos mais variados tipos de exercícios e tratamentos (3, 4, 7, 12, 18, 19, 21, 26). Neste teste, o animal é introduzido num tanque contendo água e deve nadar com pesos ligados ao rabo ou ao peito até que fique impossibilitado de se manter na superfície. Vários parâmetros de exaustão já foram utilizados, sendo o tempo de 10 segundos sob a superfície um

critério já validado e bastante utilizado (21, 26). Este parâmetro possui alta correlação com a exaustão completa e sua utilização diminui o risco de afogamento (18). Como tentativa de diminuir a variabilidade do tempo de esforço em ratos de tamanhos e pesos distintos foi proposto que as cargas sejam definidas através de um mesmo percentual de massa corporal dos animais, (4, 7, 17).

Essa proposta parte do pressuposto de que quanto maior a massa do animal, maior a capacidade de exercício em estudos longitudinais, pois utilizando um percentual da massa corporal fica difícil pré-estabelecer uma carga que leve a repetibilidade dos tempos de exaustão dos animais, o de sustentação de cargas na natação. No entanto, parece que o ganho de massa corporal não é proporcional ao aumento na capacidade de manutenção de cargas (18, 21), sendo esse dado inerente também aos humanos (13). Isto porque animais de maior massa acabam nadando com uma carga absoluta maior, reduzindo o tempo para atingir a exaustão quando comparados com os animais de menor massa (18, 21). Esse fato se constitui num agravante quando usamos a natação como modelo que inviabiliza avaliar os efeitos de diferentes protocolos de treinamento sobre o desempenho (7, 17), sugerindo uma reavaliação desta metodologia. Uma contribuição significativa seria demonstrar uma metodologia de ajuste de cargas que mantivesse o tempo de nado até a exaustão durante meses de experimento em ratos sedentários.

Outras duas metodologias de tentativa de se padronizar as cargas entre os animais já foram utilizadas no passado: cargas relativas à densidade dos ratos, que inclui a flutuabilidade na padronização do esforço (8, 23) e cargas constantes, que propõe a mesma massa de chumbo independente do peso ou tamanho dos animais (5, 10, 20). Em uma extensa revisão Dawson & Horvath (4) discutiram que tais metodologias levam a uma grande variabilidade de resposta entre os animais, principalmente em ratos de tamanhos variados.

Neste estudo, avaliaram-se dois tipos de testes de natação com sobrecarga em ratos: um com ajuste das cargas relativas à porcentagem da massa corporal (MC) e outro com carga constante (CC). Nosso objetivo foi definir qual o melhor teste para ser aplicado como parâmetro de desempenho em estudos longitudinais.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### *ANIMAIS*

Trinta ratos machos, albinos, da linhagem *Wistar*, com 30 dias de idade no início do experimento, foram acomodados em biotério climatizado a 25°C ( $\pm$  1°C), com controle de ciclo invertido de luz claro/escuro de 12 horas e alimentação *ad libitum*. Todos os animais foram adaptados à água e à natação antes do início dos testes. A adaptação utilizada consistiu em colocá-los para nadar a 35°C ( $\pm$  1°C) durante 10 minutos, três vezes por semana, com o intuito de evitar interferências causadas pelo estresse, mas sem provocar adaptações de treinamento (12). Os experimentos foram previamente autorizados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (638-1).

### *PROTOCOLO EXPERIMENTAL*

A partir de 60 dias de idade todos os ratos foram submetidos mensalmente a dois testes de exaustão distintos: um com carga ajustada segundo porcentagem da massa corporal (MC) e outro de carga constante (CC), com intervalo de 3 dias entre cada teste. Os animais foram divididos em 3 grupos G1, G2 e G3, com inicialmente 10 animais cada, submetidos a três níveis de sobrecarga. Os testes de desempenho foram realizados durante a 8<sup>a</sup>, 12<sup>a</sup>, 16<sup>a</sup> e 20<sup>a</sup> semana de vida seguindo a

logística da Tabela 1. Assim, a cada semana de teste, o grupo G1 realizou um teste com carga constante de 7 gramas e outro com 4% da massa corporal; enquanto o grupo G2 realizou um teste com carga constante de 11 gramas e outro com 6% da massa corporal e o G3 realizou um teste com carga constante de 15 gramas e outro com 8% da massa corporal. Os grupos e suas respectivas cargas foram mantidos do início ao fim do experimento.

**Tabela 1** – Organização logística da aplicação dos testes de desempenho.

|               | <b>Segunda</b>  | <b>Terça</b>     | <b>Quarta</b>    | <b>Quinta</b>   | <b>Sexta</b>     | <b>Sábado</b>   |
|---------------|-----------------|------------------|------------------|-----------------|------------------|-----------------|
| <b>Manhã</b>  | -               | -                | -                | -               | Medida de Volume | -               |
| <b>Tarde</b>  | Teste CC-<br>7g | Teste CC-<br>11g | Teste CC-<br>15g | Teste MC-<br>4% | Teste MC-<br>6%  | Teste MC-<br>8% |
| <b>Grupos</b> | G1              | G2               | G3               | G1              | G2               | G3              |

Nas semanas que não foram realizados os testes de desempenho os ratos eram colocados para nadar a  $35^{\circ}\text{C}(\pm 1^{\circ}\text{C})$  durante 10 minutos, três vezes por semana (12), para que se mantivessem familiarizados ao meio aquático e ao manejo, não influenciando os resultados dos testes de exaustão (18).

### *TESTES DE DESEMPENHO*

Para a realização dos testes, foi utilizado um tanque de dimensões 85 cm x 60 cm x 55 cm. A água foi sempre mantida em condição termoneutra ( $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ ). A massa dos animais foi medida através de balança digital (Gehaka; modelo BG 1000). As cargas foram adicionadas através de massas de chumbo introduzidas no interior de mochilinhas individuais especificamente

confeccionadas e colocadas no tronco dos animais. Os animais eram colocados sempre em duplas no tanque, independente do teste ou da carga utilizada. O parâmetro de desempenho utilizado foi o tempo para se atingir a exaustão. O teste foi encerrado quando os animais permaneceram por 10 segundos sob a superfície da água (18). Para aferição do tempo de exaustão e do critério de 10 segundos, foram utilizados dois cronômetros. Os testes foram realizados pelos mesmos dois avaliadores ao longo dos meses, sempre no período da tarde (14 – 18 horas). No teste de MC, a pesagem dos animais e das respectivas mochilinhas carregadas era feita minutos antes do início do teste. No Teste de CC, a pesagem das mochilinhas foi realizada na 8ª semana. Nos testes seguintes, foram utilizadas as mesmas mochilinhas, garantindo que o animal estivesse nadando exatamente com a mesma carga.

### *DENSIDADE*

Com o intuito de acompanharmos o comportamento da densidade dos ratos, medimos mensalmente (Tabela 1) desde a 4ª semana de vida até a 20ª semana, o volume dos animais pertencentes ao Grupo G2. Para tanto, utilizamos o aparato proposto por Hohl et al. (11) e seguimos as recomendações sugeridas em relação à calibração e aos procedimentos no processo de aferição com os animais.

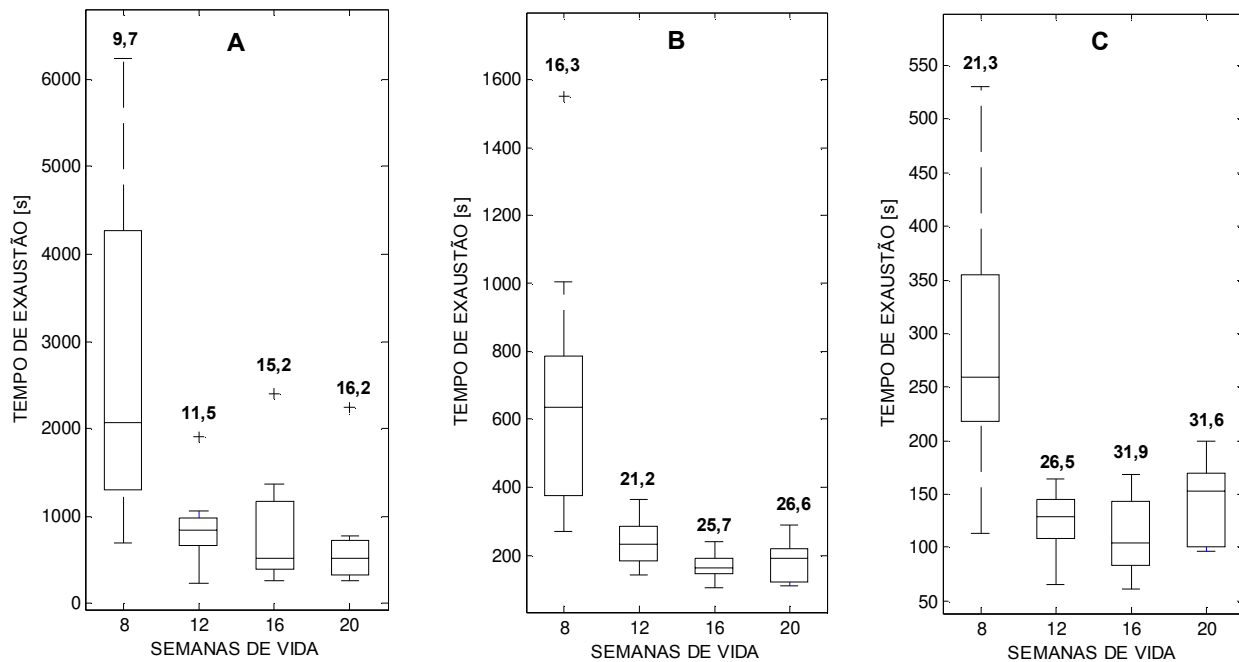
### *ANÁLISE ESTATÍSTICA*

O boxplot mostra de forma descritiva os resultados dos testes de desempenho ao longo do tempo. O teste ANOVA paramétrico e pareado foi utilizados para comparação entre as semanas que foram realizados os teste MC e CC. O nível de significância foi ajustado em  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

### TESTE DE DESEMPENHO COM CARGAS AJUSTADAS PELA MASSA CORPORAL (MC)

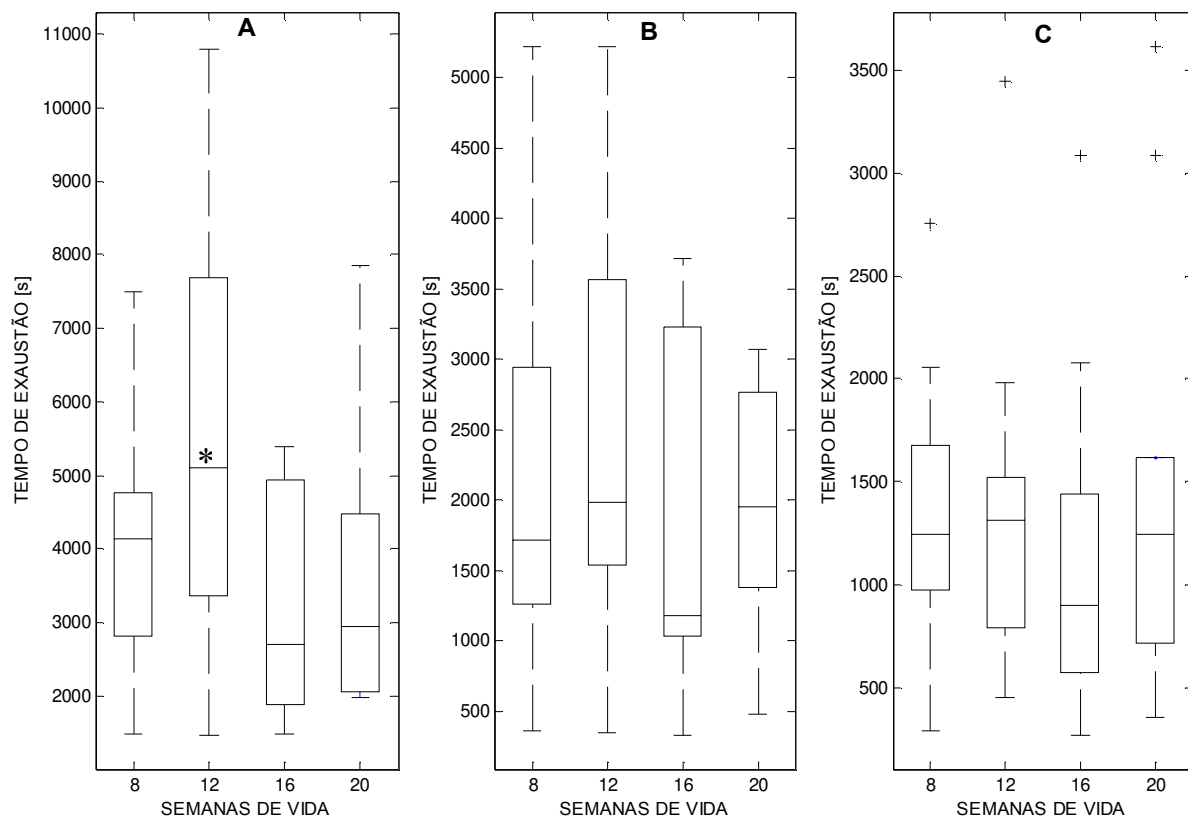
O tempo para a exaustão no teste MC nos grupos G1, G2 e G3 está apresentado na forma de boxplot na Figura 1. Acima de cada boxplot estão apresentadas as médias das cargas utilizadas ao longo dos meses. Nota-se que independente do nível de sobrecarga utilizado, todos os grupos apresentaram uma queda significativa no tempo para a exaustão da 8<sup>a</sup> para a 12<sup>a</sup> semana – quando os animais encontravam-se na transição de adultos jovens para adultos - e uma tendência de queda menos acentuada nas semanas seguintes (12<sup>a</sup> a 16<sup>a</sup>), seguida por uma manutenção a partir da 16<sup>a</sup> semana.



**Figura 1.** Tempo de exaustão no teste de porcentagem da massa corporal (MC). A: Grupo G1 (carga = 4%; N=7). B: Grupo G2 (carga = 6%; N=9). C: Grupo G3 (carga = 8%; N=10). \* Diferença significativa (ANOVA,  $p < 0,001$ ) para 12<sup>a</sup>, 16<sup>a</sup> e 20<sup>a</sup> semana.

### TESTE DE DESEMPENHO COM CARGA CONSTANTE (CC)

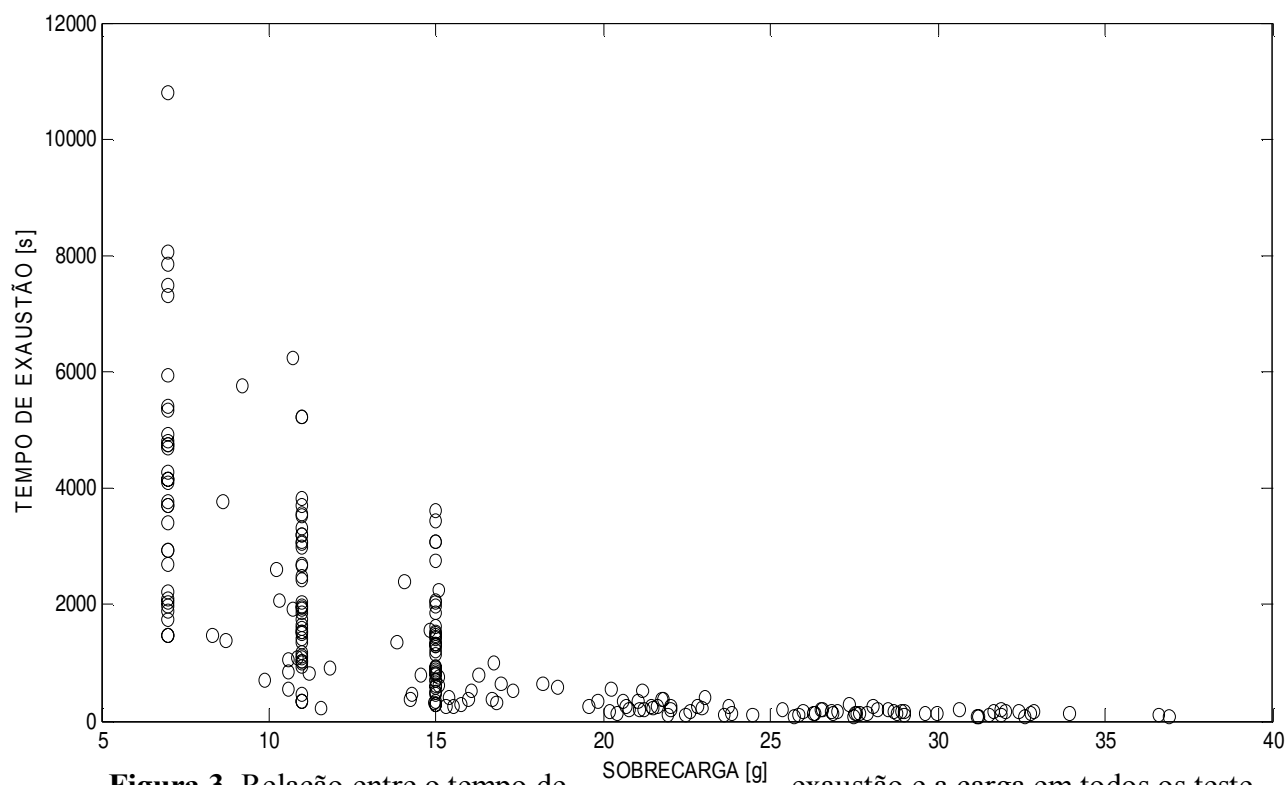
O tempo para a exaustão no teste CC nos grupos G1, G2 e G3 está apresentado na forma de boxplot na Figura 2. Nota-se que, da mesma forma que o observado no teste anterior, as diferentes sobrecargas produziram diferentes escalas de tempo de exaustão. No entanto, não houve diferença significativa nos tempos de exaustão nas cargas do teste CC (7g, 11g, 15g) ao longo do tempo, exceto entre os testes da 12<sup>a</sup> e 16<sup>a</sup> semana na carga de 7g onde o decréscimo foi significativo ( $p<0,05$ ). Além disso, as medianas dos dados do teste CC não apresentaram queda na desempenho da 8<sup>a</sup> para a 12<sup>a</sup> semana.



**Figura 2.** Tempo de exaustão no teste de carga constante- (CC). A: Grupo G1 (carga =7g;N=7). B: Grupo G2 (carga = 11g; N=9). C: Grupo G3 (carga = 15g; N=10). \* diferença significativa para a 16<sup>a</sup> semana de vida ( $p<0,05$ ).

### *RELAÇÃO ENTRE NÍVEL DE SOBRECARGA VERSUS TEMPO DE EXAUSTÃO*

A Figura 3 traz a relação entre o tempo de exaustão e o nível de sobrecarga em todos os testes realizados ao longo dos meses com todos os ratos. Observa-se uma maior variabilidade dos dados com cargas abaixo de 20g. Já com cargas iguais ou superiores a 20g os tempos de exaustão diminuíram muito, resultando numa resposta mais homogênea, na qual a variabilidade inter-ratos não é mais verificada.



**Figura 3.** Relação entre o tempo de exaustão e a carga em todos os teste realizados (MC e CC). Total de 208 testes.

## DENSIDADE

A Tabela 2 apresenta os dados de massa, volume e densidade dos animais do Grupo G2 (N=9) desde a 4ª até a 20ª semana de vida. Percebe-se que houve uma manutenção da densidade dos ratos ao longo de todo o experimento. Com relação à massa e volume nota-se que ambos aumentaram em média 145% no período da 4ª para a 8ª semana, sendo que após este período os ganhos foram sempre menores: próximos de 30% da 8ª para a 12ª semana; 20% da 12ª para a 16ª, chegando a 4% da 16ª para a 20ª.

**Tabela 2.** Acompanhamento longitudinal da massa, volume e densidade dos animais.

|                         | 4ª semana     | 8ª semana     | 12ª semana    | 16ª semana    | 20ª semana    |
|-------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| <b>Massa (g)</b>        | 109,05±13,80* | 270,03±17,59* | 352,67±15,09* | 427,72±30,69◇ | 442,92±29,39◇ |
| <b>Volume (mL)</b>      | 105,87±14,23* | 263,11±14,13* | 341,97±17,23* | 415,06±30,91◇ | 433,18±29,93◇ |
| <b>Densidade (g/mL)</b> | 1,031±0,026   | 1,026±0,014   | 1,032±0,010   | 1,031±0,011   | 1,023 ±0,005  |

Média±SD das massas (g), volumes (mL) e densidades (g/mL) dos ratos (N=9) ao longo das semanas. \* Diferença Significativa (ANOVA,  $p<0,001$ ) entre todas as semanas. ◇ Diferença Significativa entre todas as semanas (ANOVA,  $p<0,001$ ) exceto entre a 16ª e 20ª semanas.

## DISCUSSÃO

Até onde apuramos, nenhum trabalho apresentou um estudo específico comparando teste de natação com cargas constantes e cargas baseadas na porcentagem da massa corporal ao longo do tempo em ratos sedentários numa faixa etária muito utilizada nos trabalhos apresentados na literatura (3, 6, 26, 27, 28).

Nossos dados mostraram que no ajuste de cargas através de um determinado percentual do peso corporal os animais não foram capazes de manter o tempo de exaustão ao longo dos meses (Figura 1). Houve uma queda significativa no tempo de exaustão nos testes da 8ª semana quando comparados aos da 12ª semana, sendo que os ratos aumentaram a massa corporal de forma

significativa (cerca de 30%) nesse período. Como a densidade dos animais não variou ao longo dos meses (Tabela 2), a carga absoluta de cada animal durante o teste da 12ª semana foi maior do que a da 8ª semana, causando uma redução significativa dos tempos de exaustão. Nas semanas seguintes (12ª, 16ª e 20ª), quando o ganho de massa corporal foi menos acentuado, a tendência de queda foi menor.

Os dados confirmam que não há uma relação direta entre ganho de massa corporal e aumento de desempenho, conforme já proposto anteriormente por McArdle & Montoye (18). Estes autores mostraram uma correlação negativa entre massa corporal e tempo de nado até a exaustão em ratos num teste com sobrecarga de 7% do peso corporal. Key (13) também encontrou resultados semelhantes com soldados do exército nadando com porcentagens de peso corporal variando de 0 a 30%, afirmando que indivíduos de maior massa corporal se encontravam em desvantagem em comparação a indivíduos mais leves em testes que se utilizavam da porcentagem da massa corporal como parâmetro de relativização do esforço. Ainda, Naito e Griffith (21) utilizaram um teste de natação com 4% da massa corporal, num estudo que buscava relacionar a atividade da glândula tireóide e tempo de nado. Foram realizados testes de desempenho na 10ª, 15ª e 20ª semana de vida dos ratos, sendo observada queda significativa no tempo de exaustão em todos os tratamentos realizados, inclusive nos animais do grupo controle.

Os resultados apresentados aqui reforçam a discussão iniciada por esses autores. Estabelecer a relação direta entre aumento de massa e capacidade de se suportar cargas adicionadas ao animal subestima a complexidade das relações fisiológicas e metabólicas que estão atuando em conjunto durante uma ação motora vigorosa, questionando a capacidade do teste com cargas ajustadas de acordo com o percentual da massa corporal aferir o desempenho de uma forma padronizada em estudos longitudinais (3, 7, 12, 21, 26). Já o teste com cargas constantes mostrou

que independente do ganho da massa corporal houve uma manutenção dos tempos de exaustão no teste ao longo dos meses.

É importante considerar que a densidade não se alterou significativamente do primeiro ao quinto mês após o nascimento (Table 2), conforme Stone et al. (24) encontraram na linhagem *Sprague-Dawley*. Em relação à maturação da linhagem *Wistar*, sabe-se que a maior taxa de crescimento é atingida na idade de 42 – 56 dias. Neste processo, os animais aumentam gradualmente a gordura corporal durante o crescimento (2), mas também mantém a ossificação continua (25). Ratos mais velhos possuem ossos e junções epifisiais maiores (25). Portanto, apesar das alterações nos tecidos adiposo e ósseo, que interferem consideravelmente na densidade(1, 16), nossos resultados indicam que a razão entre o volume e a massa é mantida durante o tempo de crescimento em ratos sedentários. Isto implica que os ratos nadando sem carga estão quase em equilíbrio hidrostático a despeito do aumento de massa ou da idade o que provavelmente explica a manutenção dos tempos de exaustão no teste com CC, uma vez que os animais sempre carregavam a mesma carga absoluta, diferentemente do que ocorreu com o teste de MC.

É importante considerar que nenhum dos dois tipos de testes (MC e CC) foi capaz de diminuir a variabilidade do tempo até a exaustão entre os diferentes animais em um mesmo teste. Conforme mostrado na Figura 3, quando os ratos carregavam cargas menores do que aproximadamente 20 g, os tempos de exaustão apresentaram grande variabilidade nos dois tipos de ajuste de cargas. A variabilidade diminuiu somente com cargas maiores do que 20 g, sendo que esta magnitude de carga ocorreu apenas nos testes MC de 6% e 8% (Figura 2). Esses dados indicam que cargas maiores que 20 g homogeneízam a resposta somente por diminuir muito o tempo de exaustão, não sendo mais possível a diferenciação entre os animais, representando um limite que supera a capacidade máxima individual de cada rato resistir aos processos que levam a

fadiga. Por outro lado, a capacidade de cada animal em resistir aos processos que levam à fadiga abaixo de 20 g se manifesta individualmente, de acordo com cada condição experimental. De acordo com Hardin (9), a carga que deve ser utilizada em teste de natação deve ter uma magnitude que faça o rato cessar o exercício por causa da fadiga, não por causa da carga ser maior do que ele possa suportar na natação.

Ou seja, nem cargas constantes (CC), nem o ajuste pela porcentagem de massa corporal (MC) são capazes de padronizar o esforço entre os ratos de mesma idade, visto que ambos apresentam alta variabilidade do tempo para exaustão na faixa de cargas que permitem a diferenciação dos animais. Acreditamos que um ajuste mais apropriado da intensidade de esforço, importante para a aplicação de protocolos de treinamento, só pode ser feito através de testes que avaliem a capacidade funcional fisiológica e metabólica de cada animal como VO<sub>2</sub> máx ou limiar anaeróbico.

Baseados nos resultados apresentados neste estudo, concluímos que para se avaliar o desempenho de cada animal em estudos longitudinais é indicado que se utilize testes com cargas constantes, que não aumentam nem diminuem a força relativa que o rato deve suportar caso a gravidade específica não se altere significativamente. Este procedimento atenua a interferência do crescimento animal no teste de desempenho, reproduzindo o tempo de exaustão individual no período de 60 à 150 dias de vida de ratos sedentários. Sugerimos para isso testes com cargas constantes entre 11 g e 15 g devido a sua duração média razoável e boa reprodutibilidade.

## REFERÊNCIAS

1. **Behnke AR, Feen BG, Welham WC.** The specific gravity of health men. *J Am Med Ass* 118: 495-498, 1942.
2. **Boullu-Ciocca S, Dutour A, Guillaume V, Achard V, Oliver C, Grino M.** Postnatal diet-induced obesity in rats upregulates systemic and adipose tissue glucocorticoid metabolism during development and in adulthood: its relationship with the metabolic syndrome. *Diabetes* 54 (1): 197-203, 2005.
3. **Committee to develop an APS Resource book for the design of animal exercise protocols.** Resource book for the design of animal exercise protocols. *Am. Physiol. Soc.* February, 2006, chapt 3, pt. II C, p. 35-41.
4. **Dawson CA and Horvath SM.** Swimming in small laboratory animals. *Med Sci Sports* 2: 51-78, 1970.
5. **Escobar FR, Escobar GM.** Studies on the peripheral disappearance of thyroid hormone. II The effect of swimming for 2hrs. on the  $I^{131}$  distribution in thyroidectomized L-thyroxine maintained rats after the injection of  $I^{131}$  labeled l-thyroxine. *Acta Endocrinol* 23: 393-399, 1956.
6. **Flaim SF, Minter WJ, Cark DP, Zelis R.** Cardiovascular response to acute aquatic and treadmill exercise in the untrained rat. *J Appl Physiol* 46 (2): 302-308, 1979.
7. **Gobatto CA, De Mello MAR, Sibuya CY, De Azevedo JRM, Dos Santos LA, Kokubum E.** Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comp Biochem Physiol Part A* 130: 21-27, 2001.

- 8. Hardin DH.** Reliability of selected swimming endurance tests for laboratory rats. *Res Quart* 39 (2): 405-407, 1968.
- 9. Hardin DH.** The use of the laboratory rat in exercise experimentation. *Res Quart* 36: 370-374, 1965.
- 10. Harris RE, Ingle DJ.** The capacity for vigorous muscular activity of normal rats and of rats after removal of the adrenal medula. *Am J Physiol* 130: 151-154, 1940.
- 11. Hohl R, Buscariolli R, Denise VM, Brenzikofer R.** Apparatus for measuring rat body volume: a methodological proposition. *J App Physiol* 102: 1229-1234, 2007.
- 12. Jung K, Kim IH, Han D.** Effect of medicinal plant extracts on forced swimming capacity in mice. *J Ethnopharmacol* 93(1): 75-81, 2004.
- 13. Key J.** Relationship between load and swimming endurance in humans. *Res Quart* 33: 559-565, 1962.
- 14. Kramer K, Dijkstra H, Bast A.** Control of Physical Exercise of Rats in a Swimming Basin. *Physiol Behav* 53: 271-276, 1993.
- 15. Kramer K, Grimbergen JA, Gracht L, Iperen DJ, Jonker RJ, Bast A.** The use of Telemetry to Record Eletrocardiogram and Heart Rate in Freely Swimming Rats. *Meth Find Exp CCin Pharmacol*, 17(2): 107-112, 1995.
- 16. Kraybill HF, Bitter HL, Hankins OG.** Body composition of cattle. II. Determination of fat and water content from measurement of body specific gravity. *J Appl Physiol* 4 (7): 575-583, 1952.

17. **Matsumoto K, Ishihara K, Tanaka K, Inoue K, Fushiki T.** An adjustable-current swimming pool for the evaluation of endurance capacity of mice. *J Appl Physiol* 81 (4): 1843-1849, 1996.
18. **Mcardle WD and Montoye HJ.** Reliability of exhaustive swimming in the laboratory rat. *J Appl Physiol* 21 (4): 1431-1434, 1966.
19. **Mcardle WD.** Metabolic stress of endurance swimming in the laboratory rat. *J. Appl. Physiol.* 22 (1): 50-54, 1967.
20. **Miller HC, Darrow DC.** Relation of serum and muscle electrolyte, particularly potassium, to voluntary exercise. *Am J Physiol* 132: 801-809, 1941.
21. **Naito HK, Griffith DR.** Interaction of thyroxine, energy metabolism and swimming desempenho of rats. *Life Sci* 20: 1121-130, 1977.
22. **Richter CP.** On the phenomenon of sudden death in animals and man. *Psychosom Med* 19: 191-98, 1957.
23. **Scheer BT, Dorst S, Codie JF, Soule DF.** Physical capacity of rats in relation to energy and fat content of the diet. *Am J Physiol* 149: 194-203, 1947.
24. **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.
25. **Strong RM.** The order, time and rate of ossification of the albino rat (*mus norvegicus albinus*) skeleton. *Am J Anat* 36: 313-355, 1926.
26. **Tanaka M, Nakamura F, Mizokawa S, Matsumura A, Nozaki S, Watanabe Y.** Establishment and assessment of a rat model of fatigue. *Neurosci Letters* 352: 159-162, 2003.

**27. Terada S, Yokozeki T, Kawanaka K, Ogawa K, Higuchi M, Ezaki O, Tabata I.** Effects of high-intensity swimming training on Glut-4 and glucose transport activity in rat skeletal muscle. *J Appl Physiol* 90: 2019-2024, 2001.

**28. Voltarelli FA, Gobatto CA, De Mello MAR.** Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. *Br J Med Biol Res* 35 (11): 1389-1394, 2002.

## **CAPÍTULO III**

# **PADRONIZAÇÃO DE UM MODELO DE INDUÇÃO DE OVERREACHING EM RATOS SELECIONADOS ATRAVÉS DA QUEDA DE DESEMPENHO**

Rodrigo Hohl; Rodrigo Luiz Ferraresso, Rejane Lucco, Renato Buscariolli de Oliveira; René Brenzikofer ;Denise Vaz de Macedo

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi aplicar um protocolo padronizado e reprodutível de treinamento em ratos contendo um período de desequilíbrio entre o estímulo do exercício e a recuperação que gerasse queda de desempenho. O protocolo de treinamento durou 11 semanas. Até a 8ª semana os exercícios tiveram cargas crescentes e foram realizados uma vez ao dia. Na sequência, a intensidade e o volume atingidos na 8ª semana foram mantidos, sendo aumentada a frequência diária de exercícios em 2, 3 e 4 vezes, com a diminuição do tempo de recuperação entre as sessões (4, 3 e 2 h). Os testes de desempenho foram realizados antes do início do treino (0) e após a 4ª semana (1), 8ª (2), 9ª (3), 10ª (4) e 11ª (5) semanas. Dois testes adicionais (6 e 7) foram realizados após o término do treinamento. Os animais foram então divididos em 3 grupos: Treinados (T2x), Baixo Desempenho (BD) e Alto Desempenho (AD). Quando comparados ao teste 3, o grupo BD apresentou desempenho significativamente menor nos testes 4 à 7 enquanto o grupo AD não mostrou diferença em nenhum dos testes. Ambos os grupos (AD e BD) apresentaram valores de massa significativamente menores que o grupo controle (CO) até o teste 6. No teste 7 somente o grupo BD ainda apresentava valores significativamente menores na massa. A razão glutamina/glutamato foi significativamente maior nos grupos T2x e AD ( $4.5 \pm 1.7$  e  $4.5 \pm 0.9$ ) em comparação aos grupos CO e BD ( $2.8 \pm 0.5$  e  $3.1 \pm 0.2$ ). Baseado nesses resultados o protocolo de treinamento mostra-se um método reprodutível e controlado de indução ao *overtraining* de curta duração, diagnosticado através da queda de desempenho.

## INTRODUÇÃO

O modelo usual de treinamento está baseado na idéia de que o exercício físico leva a um distúrbio da homeostasia celular (41), que dispara as respostas fisiológicas restabelecendo o equilíbrio interno. Assume-se que os processos adaptativos que levam ao restabelecimento da homeostase não cessam quando ela é atingida, mas supera o estado anterior, num processo denominado de supercompensação (41). O melhor momento para o aumento de cargas de treinamento está no auge da supercompensação (19), que é atingida somente quando o equilíbrio entre o estímulo e o tempo de recuperação estiver individualmente adequado.

Identificar e individualizar para cada atleta o momento da supercompensação na rotina de treinamento é ainda pouco aplicável, e nem sempre este momento pode ser identificado em testes de avaliação física simples de serem executados (19). Dessa forma, o empirismo do treinamento pode levar a um desequilíbrio entre o estímulo da atividade motora e a recuperação adequada, num processo normalmente gerado pelo aumento da intensidade e/ou volume de esforço físico a fim de se aumentar o desempenho.

Como consequência, o atleta pode experimentar um estado agudo de fadiga e queda de desempenho denominado de *overreaching* ou *overtraining* de curta duração (11, 13, 32), que pode ser revertido em poucos dias ou algumas semanas (2, 17, 20). Caso esta situação de desequilíbrio persistir, sugere-se que a continuidade do processo irá levar a um quadro crônico de sensação de fadiga e desempenho diminuído denominado de *overtraining*. O *overtraining* pode persistir por semanas ou meses (2, 17, 20) apresentando queda de desempenho e distúrbios de comportamento (38).

Noakes (28) reporta que a mais antiga referência científica identificando o *overtraining* foi de McKenzie (23), mas pesquisadores na atualidade ainda têm dificuldade em estabelecer uma

fronteira entre *overreaching* e *overtraining*, inclusive aparecendo várias denominações na literatura para, aparentemente, o mesmo fenômeno, como *underperformance syndrome*, *staleness*, *overwork*, *stagnation*, *chronic fatigue*, *overfatigue*, *overstrain*, *burnout* e *overtraining syndrome* (4, 7, 17). Trataremos de agora em diante o *overtraining* como os mecanismos fisiológicos e metabólicos relacionado às altas cargas de treinamento que liga, em processo dinâmico, o *overreaching* à síndrome do *overtraining* (OTS) (2, 13).

A busca de mecanismos biológicos presentes no *overtraining* passa pelas pesquisas nas áreas de fisiologia, bioquímica, nutrição e psicologia, com ênfase no sistema nervoso autônomo e controle hormonal (3, 8, 12, 18, 26, 39), sistema imune (9, 24, 27), processo inflamatório (33), depleção de glicogênio (6, 34) estresse oxidativo (35) e o estresse não causado pelo exercício como desencadeador de alterações no comportamento (10, 25, 36). Recentemente, foi sugerido que alterações na razão glutamina/glutamato (Gm/Ga) podem ser usadas para classificar o estado de *overreaching* (14) ou *overtraining/underperformance* (32). O diagnóstico só poderá ser feito com precisão quando estes ou outros possíveis mecanismos forem compreendidos e associados.

A queda de desempenho parece ser o único parâmetro de consenso na literatura que deve estar obrigatoriamente associado tanto ao *overreaching* quando ao OTS (2). Alguns estudos têm demonstrado modificações em diversos parâmetros fisiológicos e bioquímicos, mas nem todos estão associados com a queda de desempenho (15, 29, 36, 42). É essencial que todos os possíveis indicadores sugeridos estejam relacionados ao desempenho. Por exemplo, alterações que podem ocorrer no *overtraining* como a diminuição da frequência cardíaca e a diminuição do lactato sanguíneo também podem estar associadas às adaptações positivas do treinamento (13).

Embora existam muitas teorias na atualidade, os mecanismos do *overtraining* permanecem desconhecidos (2, 20). Isso se deve aos poucos resultados de estudos controlados devido

principalmente à contradição de se aplicar um treinamento que vise uma diminuição da capacidade fisiológica funcional (2), e a falta de atletas voluntários que estejam dispostos a correr o risco de perder uma temporada de treinos/competições (20, 28). Isto implica que muitos dos sujeitos disponíveis aparecem casualmente entre equipes de atletas que são diagnosticados como *overtraining* numa situação retroativa que gera informações imprecisas (13), indicando que o *overtraining* é um processo que ainda precisa ser esclarecido. As dificuldades de se estudar esse fenômeno em seres humanos justifica o desenvolvimento de modelos em ratos que induzam ao estado de *overreaching*/OTS.

O objetivo deste trabalho foi aplicar um protocolo padronizado e reprodutível de treinamento em ratos contendo um período de desequilíbrio entre o estímulo do exercício e a recuperação que gerasse queda de desempenho aferida em testes até a exaustão. Também analisamos a razão Gm/Ga no sangue e a massa corporal.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### *ANIMAIS.*

Utilizamos inicialmente 80 ratos da raça Wistar com 60 dias de vida, pesando entre 200 – 250g, alimentados com ração e água *ad libitum*. Durante o período de experimento os animais foram mantidos em ambiente com a temperatura controlada entre 18 e 22°C e fotoperíodo de 12 horas com ciclo de luz claro-escuro invertido. Todos os ratos foram adaptados à esteira rolante durante duas semanas antes do início dos experimentos. A fase de adaptação consistiu em colocá-los na esteira 5 dias/semana durante 10 minutos com velocidade em 12 m/min. Essas semanas

iniciais tiveram como finalidade separar os animais que corriam voluntariamente daqueles que se recusavam a correr, para que apenas realizassem os testes os animais que corressem voluntariamente. Os ratos que realizaram o teste inicial com um tempo de exaustão entre 20 e 30 minutos foram selecionados para o estudo (N=49). O protocolo experimental aplicado nos animais foi previamente aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (638-1).

### *TESTE DE DESEMPENHO*

Todos os testes iniciaram-se com os animais correndo em esteira, sem inclinação, na velocidade inicial de 12 m/min. A cada 2 min incrementou-se a velocidade em 1 m/min até que fosse atingido 20 m/min. A partir dessa velocidade o incremento da esteira passou a ser de 2 m/min a cada 3 minutos até que o animal atingisse a exaustão. A exaustão foi definida no momento que os animais tocaram a grade eletrificada da esteira cinco vezes em um minuto (21). Os testes de desempenho realizados nos ratos sedentários (controle) foram feitos nas semanas correspondentes aos testes realizados durante o período de treinamento, e no mesmo tempo de vida dos ratos treinados.

### *QUANTIFICAÇÃO DO DESEMPENHO*

Para avaliar longitudinalmente o efeito do treinamento nos ratos é necessário que o teste quantifique o desempenho do animal de maneira independente da variação de massa. Segundo Alexander (1) toda força é proporcional ao peso do corpo durante o movimento e a velocidade é proporcional à rapidez da corrida do animal. Portanto, a potência mecânica é o produto entre massa e velocidade e o trabalho mecânico realizado é o produto entre potência e tempo. Como a

distância total “D” percorrida nos estágios  $i = 1, 2, 3, 4...$  na velocidade “ $V_i$ ” durante tempos “ $T_i$ ” é  $D = \sum D_i = \sum V_i T_i$  podemos calcular uma grandeza relacionada ao trabalho mecânico realizado durante o teste multi-estágio (equação 1)

$$W = \sum W = m D \quad \text{equação 1}$$

onde: (W) representa o trabalho mecânico total realizado pelo rato; (m) = massa; (D) = distância total percorrida pelo rato ao longo do teste. W não é o trabalho mecânico definido pela física, mas uma quantificação proporcional ao trabalho. Ao envolver a massa do animal esta variável W permitiu comparar os desempenhos dos ratos longitudinalmente. Neste artigo W será expresso em kg.m.

#### *PROTOCOLO DE TREINAMENTO.*

Os animais do grupo CO (N = 16) foram submetidos a 10 minutos de esteira com velocidade de 12 m/min duas vezes na semana durante todo o período de análise, excetuando as semanas destinadas ao teste de desempenho. O restante dos ratos (N = 33) foi submetido a um protocolo de treinamento (Tabela I) que buscou estabelecer um continuum entre adaptação/overreaching/OTS. As quatro primeiras semanas foram dimensionadas para ser um treinamento adaptativo (TA1), onde velocidade e tempo de corrida foram aumentados progressivamente a cada semana. Nas quatro semanas posteriores (TA2) manteve-se a velocidade e o tempo de corrida atingidos ao final do TA1. Já nas 3 semanas seguintes procurou-se estabelecer um desequilíbrio entre estímulo e recuperação nos animais treinados, aplicando a mesma carga de TA2 mas aumentando-se o número de sessões diárias de treino para duas (T2x),

três (T3x) e quatro (T4x) vezes, com diminuição no tempo de recuperação entre as sessões (4, 3 e 2 h, respectivamente). Dois testes adicionais (PT1 e PT2) foram realizados nas duas semanas após o término do protocolo de treinamento, a fim de acompanhar a evolução do desempenho na ausência do exercício. A massa corporal também foi aferida nos momentos em que foram realizados os testes.

**Tabela I.** Protocolo de treinamento. No início do experimento os animais tinham 60 dias de vida.

| Semanas Experimentais           | Fases do Treino | Número dos Testes | Velocidade do Treino (m/min) | Duração do Treino (min) | Número de Sessões diárias | Recuperação entre as sessões (h) |
|---------------------------------|-----------------|-------------------|------------------------------|-------------------------|---------------------------|----------------------------------|
|                                 | Adaptação       | 0                 | --                           | --                      | --                        | --                               |
| 1 <sup>a</sup>                  | TA1             | semana sem testes | 15                           | 20                      | 1                         | --                               |
| 2 <sup>a</sup>                  | TA1             | semana sem testes | 20                           | 30                      | 1                         | --                               |
| 3 <sup>a</sup>                  | TA1             | semana sem testes | 22,5                         | 45                      | 1                         | --                               |
| 4 <sup>a</sup>                  | TA1             | 1                 | 25                           | 60                      | 1                         | --                               |
| 5 <sup>a</sup> a 7 <sup>a</sup> | TA2             | semana sem testes | 25                           | 60                      | 1                         | --                               |
| 8 <sup>a</sup>                  | TA2             | 2                 | 25                           | 60                      | 1                         | --                               |
| 9 <sup>a</sup>                  | T2x             | 3                 | 25                           | 60                      | 2                         | 4                                |
| 10 <sup>a</sup>                 | T3x             | 4                 | 25                           | 60                      | 3                         | 3                                |
| 11 <sup>a</sup>                 | T4x             | 5                 | 25                           | 60                      | 4                         | 2                                |
| 12 <sup>a</sup>                 | PT1             | 6                 | sem treinos                  | sem treinos             | --                        | --                               |
| 13 <sup>a</sup>                 | PT2             | 7                 | sem treinos                  | sem treinos             | --                        | --                               |

## GRUPOS DE ANIMAIS

Dezesseis ratos compuseram o grupo controle sedentário (CO), sendo que 8 deles foram submetidos aos testes de desempenho até o final do protocolo de treinamento, com o objetivo de verificar se o processo de crescimento influenciaria na quantificação do W realizado pelos animais. Os demais oito ratos CO foram sacrificados após T3x para a retirada do sangue. Os 33 ratos do grupo treinado foram divididos em três sub-grupos: Treinados (T2x), Baixo Desempenho (BD) e Alto Desempenho (AD), selecionados conforme descrito abaixo.

### *SELEÇÃO DOS ANIMAIS*

Os animais que compuseram o grupo T2x (N=8) foram selecionados, através de sorteio, entre os 33 ratos que terminaram a nona semana de treinamento com nível de desempenho acima da mediana no teste 3. Os grupos BD e AD foram selecionados após o teste 5. Todos os ratos que apresentaram desempenho abaixo do obtido no teste 2 foram selecionados para o grupo BD (N=12). Aqueles animais que apresentaram manutenção ou aumento de desempenho em relação ao teste 2 foram selecionados para o grupo AD (N=13). Desse total, oito ratos de cada grupo AD e BD foram sacrificados para a retirada do sangue. Quatro ratos do grupo BD e cinco do grupo AD foram avaliados nos dois testes de desempenho (PT1 e PT2) realizados após 1 e 2 semanas de repouso.

### *ANÁLISES SANGUÍNEAS*

O sangue foi extraído através de punção cardíaca após 60 horas da realização do teste de desempenho. Foram analisados quatro grupos: (1) Treinados (T2x) (N = 8) sacrificados após teste 3; (2) Controle (CO) sacrificado após teste 4 (N = 8); (3) BD (N = 8) e (4) AD (N = 8), sacrificados após teste 5. Os ratos foram anestesiados com hidrato de cloral 20% (0,3 mL por 100 g de massa) e o sangue extraído foi imediatamente desproteinado em ácido perclórico 10% e centrifugado à 3000g por 5 minutos (4°C). O sobrenadante foi neutralizado com KOH e recentrifugado nas mesmas condições. As amostras foram armazenadas á -80° C.

### *GLUTAMATO, GLUTAMINA E ALANINA*

A análise do glutamato foi realizada na presença da enzima glutamato desidrogenase (EC 1.4.1.3) e  $\text{NAD}^+$ , medindo-se em espectrofotômetro Beckman DU-640 a formação de NADH (339 nm). As amostras para a análise de glutamina ficaram incubadas à 37°C em solução contendo glutaminase (EC 3.5.1.2). O método de análise foi feito segundo Lund (22).

A análise da concentração de alanina foi feita segundo Williamson (41) em solução contendo alanina desidrogenase (EC 1.4.1.1) e  $\text{NAD}^+$ , sendo analisado em espectrofotômetro a formação do NADH (339 nm).

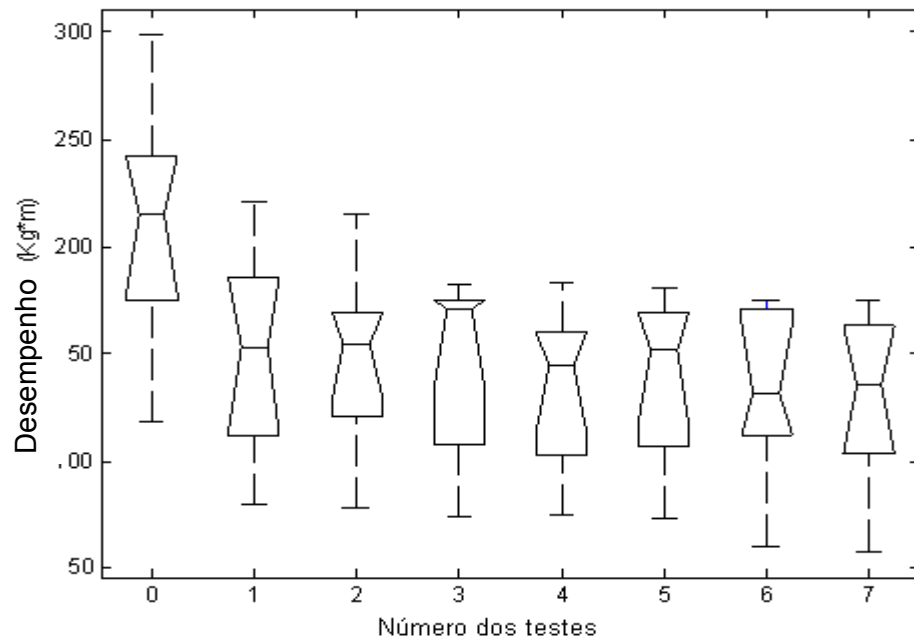
### *ANÁLISE ESTATÍSTICA*

Os dados de desempenho estão mostrados em boxplot para uma análise descritiva. As análises dos resultados e as estatísticas foram feitas através do programa MatLab® 7.0. Utilizamos o teste ANOVA para amostras pareadas e não pareadas com pós-teste de Tukey. Também utilizamos o teste t para comparação entre dois grupos. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

## **RESULTADOS**

### *REPRODUTIBILIDADE DO TESTE DE DESEMPENHO EM RATOS SEDENTÁRIOS*

A Figura 1 mostra os resultados dos testes de desempenho realizados em ratos sedentários (N=8). Observa-se um decréscimo significativo do desempenho do teste 0 para os demais testes (1-7) ( $p < 0.001$ ). A partir do teste 1 não encontramos mais diferença significativa no desempenho.

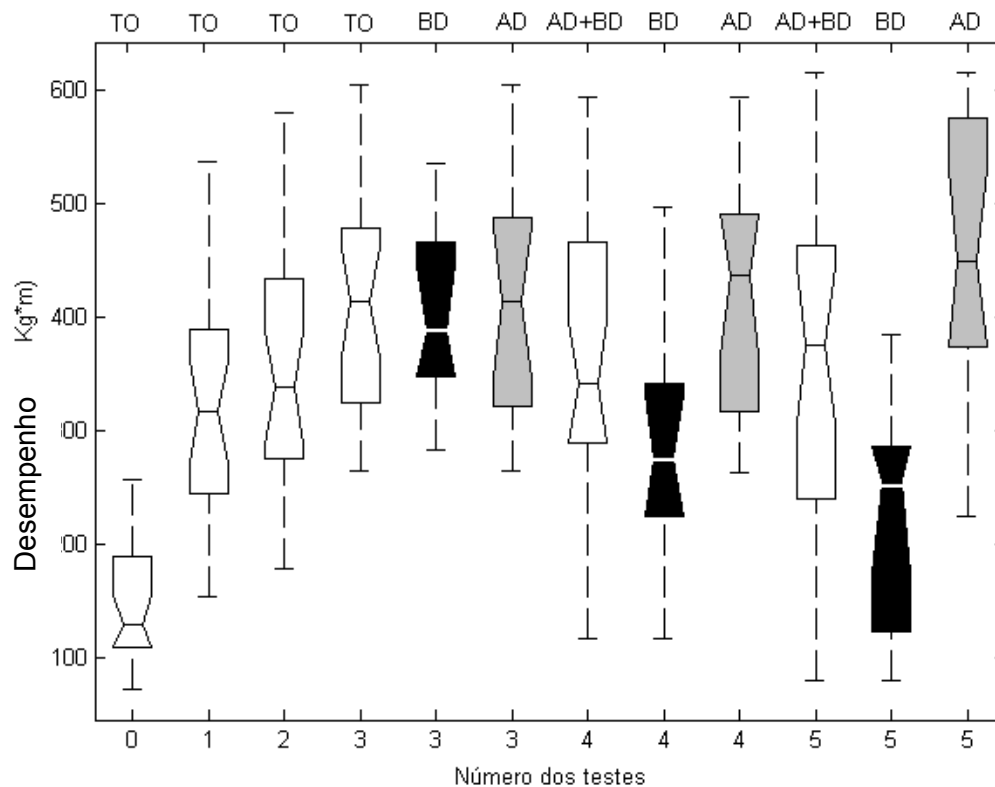


**Figura 1.** Quantificação da desempenho dos ratos sedentários (CO) (N=8) do teste 0 ao teste 7. Diferença significativa ( $p < 0.001$ ) do teste 0 para os demais testes.

### *EFEITO DO PROTOCOLO EXPERIMENTAL*

A Figura 2 mostra os resultados do teste de desempenho em todos os períodos do treinamento. O boxplot branco contém o desempenho de todos os grupos de ratos (TO = T2x + BD + AD) exceto a partir do teste 4 (AD+BD). Os dados analisados dessa forma apresentam um aumento significativo do desempenho após o teste 3 ( $p < 0.001$ ), não havendo mais diferença nesta variável até o teste 5. O boxplot preto (BD) e cinza (AD) mostram o desempenho dos grupos previamente selecionados. Podemos observar nos boxplots preto que o desempenho do grupo BD (N=12) foi significativamente menor após os testes 4 ( $p < 0.05$ ) e 5 ( $p < 0.01$ ) quando comparados

ao teste 3. Não houve diferença significativa no grupo AD após os testes 4 ou 5 quando comparados ao teste 3.

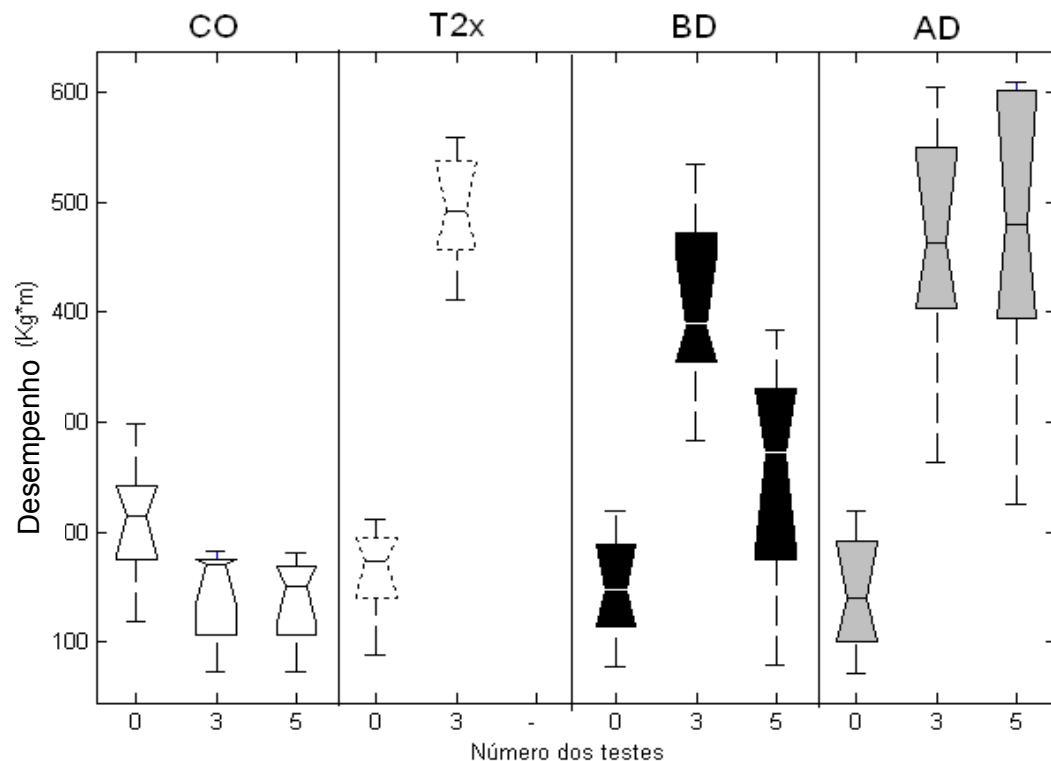


**Figura 2:** Desempenho dos ratos submetidos ao protocolo de treinamento nos testes 0-5. Segundo o critério de seleção os ratos foram subdivididos nos seguintes grupos: Caixa branca representa todos os ratos (TO=T2x+BD+AD) (N=33) exceto nos teste 4 e 5 (AD+BD) (N=25); Caixa preta representa o grupo baixo desempenho (BD) (N=12); e a caixa cinza representa o grupo alto desempenho (AD) (N=13).

#### *CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE ALANINA, RELAÇÃO Gm/Ga E DESEMPENHO*

A Figura 3 ilustra a evolução do desempenho ao longo do protocolo de treinamento dos ratos sacrificados para análise dos aminoácidos no sangue em três momentos: 1- antes do

treinamento (teste 0); 2- após teste 3; 3- após teste 5. O boxplot branco representa a desempenho dos ratos do grupo CO. O boxplot tracejado representa o grupo T2x de ratos sacrificados após teste 3; o boxplot preto o grupo BD e o cinza o grupo AD, ambos sacrificados após teste 5. Observa-se que no momento do sacrifício do grupo T2x os grupos BD e AD apresentavam valores similares no desempenho. O grupo BD, no momento da coleta de sangue (após teste 5), demonstrou uma queda significativa do desempenho em relação ao teste 3 ( $p<0.001$ ), mas ainda superior ao seu próprio teste inicial (teste 0) e ao controle na mesma semana ( $p<0.05$ ). Já o grupo AD se encontrava com o desempenho aumentado significativamente após o teste 5 quando comparada ao teste 0 ( $p<0.001$ ) e em relação ao grupo BD no mesmo momento (teste 5) ( $p<0.001$ ).



**Figura 3:** Gráfico comparativo do desempenho dos ratos com sangue coletado. Controle (CO) (N=8), T2x (N=8), Baixo Desempenho (BD) (N=8) e Alto Desempenho (AD) (N=8).

A Tabela 2 mostra as concentrações de alanina e a relação Gm/Ga no plasma dos três grupos de ratos. As concentrações de alanina plasmática não apresentaram variações significativas em nenhum dos grupos analisados. A relação Gm/Ga foi significativamente maior nos grupos T2x e AD em relação ao CO e BD ( $p < 0.01$ ).

**Tabela 2** . Média  $\pm$  SD das concentrações plasmáticas de alanina ( $\mu\text{M}$ ) e da razão glutamina/glutamato.

| Aminoácidos         | CO               | T2x               | AD               | BD               |
|---------------------|------------------|-------------------|------------------|------------------|
| Alanina             | 472,4 $\pm$ 69,1 | 534,0 $\pm$ 117,1 | 500,0 $\pm$ 68,6 | 499,1 $\pm$ 74,4 |
| Glutamina/Glutamato | 2,8 $\pm$ 0,5    | 4,5 $\pm$ 1,7*    | 4,5 $\pm$ 0,9*   | 3,1 $\pm$ 0,2    |

\* diferença significativa para CO e BD ( $p < 0,01$ )

#### *EVOLUÇÃO DA MASSA E DO DESEMPENHO DOS GRUPOS BD E AD APÓS O TÉRMINO DO PROTOCOLO DE TREINAMENTO*

Após o término do treinamento de 11 semanas, 4 ratos do grupo BD e 5 ratos do grupo AD foram selecionados aleatoriamente com o objetivo de se analisar a evolução da desempenho e da massa na 1ª semana pós-treino (PT1) e 2ª semana pós-treino (PT2). Os resultados da evolução das massas dos animais estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3:** Evolução da massa corporal(g) dos grupos CO (N=8), AD (N=5) e BD (N=4) nas três últimas semanas de treino e em PT1 e PT2.

| Fases do treino | Massa Corporal (g)         |                           |                        |
|-----------------|----------------------------|---------------------------|------------------------|
|                 | CO                         | AD                        | BD                     |
| <b>T2x</b>      | 422.2 ± 23.1 <sup>a</sup>  | 386.4 ± 17.2              | 370 ± 15.8             |
| <b>T3x</b>      | 425.3 ± 30.1 <sup>a</sup>  | 369.2 ± 9.6               | 360.5 ± 21.6           |
| <b>T4x</b>      | 432.9 ± 26.9 <sup>bc</sup> | 351.8 ± 8.1 <sup>c</sup>  | 342 ± 8.0 <sup>d</sup> |
| <b>PT1</b>      | 443.7 ± 25.3 <sup>be</sup> | 386.2 ± 19.0 <sup>f</sup> | 339 ± 7.0 <sup>c</sup> |
| <b>PT2</b>      | 445.2 ± 31.4 <sup>ge</sup> | 405 ± 29.0                | 374.5 ± 9.3            |

Os dados estão apresentados como média ± SD. <sup>a</sup> diferença significativa para AD e BD ( $p < 0.01$ ). <sup>b</sup> diferença significativa para AD e BD ( $p < 0.001$ ). <sup>c</sup>, <sup>d</sup>, <sup>e</sup> diferença significativa para teste 3 em comparação pareada intra-grupos ( $p < 0.05$ ,  $< 0.01$ ,  $< 0.001$ , respectivamente). <sup>f</sup> diferença significativa para BD ( $p < 0.05$ ). <sup>g</sup> diferença significativa para BD ( $p < 0.01$ ).

Na comparação entre os grupos podemos observar que o CO sempre aumentou a massa corporal ao longo das avaliações, com valores significativamente maiores que BD e AD até PT1 ( $p < 0.01$  e  $p < 0.001$ ). Em PT2 observamos diferença significativa somente entre o CO e BD ( $p < 0.01$ ). O grupo AD recuperou a massa em PT1, não havendo mais diferença significativa para T2x enquanto o mesmo não ocorreu com o grupo BD. Em PT1 o grupo AD apresentava massa significativamente aumentada em relação ao grupo BD ( $p < 0.05$ ), sendo que esta diferença deixou de ser significativa em PT2.

Na Tabela 4 estão apresentados os dados de desempenho após T2x até PT2 (N=9) dos grupos AD e BD. Não houve diferença significativa em nenhum dos momentos analisados no grupo AD, com uma tendência de diminuição no desempenho em PT1 e PT2. Houve diminuição significativa do desempenho no grupo BD após T4x, PT1 e PT2 em relação à T2x ( $p < 0.05$ ).

**Tabela 4.** Desempenho (Kg.m) dos grupos AD (N=5) e BD (N=4) nas três últimas semanas de treino e em PT1 e PT2.

| Fases do treino | Desempenho (Kg*m) |                           |
|-----------------|-------------------|---------------------------|
|                 | <i>AD</i>         | <i>BD</i>                 |
| <b>T2x</b>      | 372.4 ± 60.1      | 331.5 ± 77.4              |
| <b>T3x</b>      | 337.4 ± 144.6     | 304.4 ± 119.7             |
| <b>T4x</b>      | 389.6 ± 87.9      | 150.9 ± 62.7 <sup>a</sup> |
| <b>PT1</b>      | 364.9 ± 32        | 153.0 ± 58.5 <sup>a</sup> |
| <b>PT2</b>      | 297.5 ± 118.7     | 148.9 ± 51.7 <sup>a</sup> |

Os dados estão apresentados como média ± SD. <sup>a</sup> diferença significativa em relação a T2x ( $p < 0,05$ ).

## DISCUSSÃO

A avaliação do decréscimo de desempenho ainda representa o “padrão ouro” de diagnóstico do OTS (38). Enquanto OTS não estiver bem compreendido, treinadores e atletas continuarão a verificar a existência do OTS em testes específicos que devem prosseguir até a exaustão (2), uma vez que os testes até a exaustão parecem demonstrar maiores alterações no desempenho em situação de overreaching ou OTS (13). Partimos desta premissa para avaliar os efeitos do protocolo de treinamento aplicado em ratos *Wistar*, uma vez que somente o aumento da carga de treinamento pelo aumento da frequência diária não poderia ser justificativa suficiente para atestar o modelo como instrumento de investigação do overreaching/OTS.

Os resultados apresentados na Figura 1 mostraram que o crescimento dos ratos não influenciou no resultado do teste realizado pelos ratos sedentários, cujo desempenho não sofreu alterações significativas a partir do teste 1, que corresponde a três meses de vida dos animais. A

confiança no teste de desempenho é fundamental para o diagnóstico do overreaching/OTS, pois caso o desempenho permanecer sem alterações após o aumento das cargas de treinamento, por definição o indivíduo não pode ser considerado como *overreached* (13).

Os dados apresentados na Figura 2 corroboram esta afirmação. Quando não há a seleção dos ratos (boxplot branco) através do teste de desempenho, tem-se a impressão de que todos responderam de forma similar ao aumento de cargas determinado pelo aumento da frequência diária de treinamento, com uma tendência de aumento na variabilidade dos dados. Quando separamos os ratos pelo desempenho em BD e AD, observamos respostas diferenciadas dos dois grupos ao aumento de cargas.

Resultados prévios de nosso laboratório utilizando o protocolo descrito neste trabalho para investigar a relação entre o aumento da frequência diária de treinamento e o estresse oxidativo nos músculos semitendinoso, sóleo e digitorium longus sugeriram que o estresse oxidativo induzido pelo overreaching é dependente do tipo de fibra muscular (42). Como nesse estudo não foi realizado o teste de desempenho, não foi possível saber se todos os ratos que poderiam ser separados em BD e AD apresentariam as mesmas respostas, impossibilitando que maiores considerações fossem feitas sobre o overreaching/OTS. Porém, este trabalho representou o primeiro passo para a elaboração do presente estudo.

Muitos trabalhos apontam a perda de massa como um dos sintomas de OTS (2, 5, 10, 16, 20, 33). A aferição da massa corporal ao longo das semanas de treinamento (Tabela 3) nos grupos CO, BD e AD confirmam que a aplicação de um teste de desempenho é fundamental para a investigação dos sintomas e mecanismos de causa do OTS. Nossos dados mostraram que apenas a aferição da massa não é suficiente para se diagnosticar overreaching ou OTS, visto que tanto BD quanto AD perderam massa durante o treinamento intenso, porém isso não se refletiu igualmente

no desempenho (Tabela 4). O grupo AD manteve o desempenho enquanto o grupo BD diminuiu em aproximadamente 50% o desempenho no teste de exaustão. Interessante notar que apesar do mesmo comportamento das massas nos grupos BD e AD durante o treinamento, a recuperação da mesma após a suspensão do treinamento foi mais rápida no grupo AD, que apresentou um valor similar à fase T2x após PT1 enquanto o grupo BD atingiu esta meta com uma semana a mais de repouso completo (PT2). Ainda assim, o grupo BD apresentou um valor médio da massa significativamente menor do que o grupo CO. Esses dados sugerem que os mecanismos que levam a perda de massa corporal intensa estiveram igualmente atuantes nos dois grupos (BD e AD) enquanto houve o aumento de cargas. A diferença entre eles pode residir nos mecanismos de recuperação após esforço, que pode estar mais eficiente nos ratos do grupo AD.

Muitos estudos medem o desempenho simplesmente antes e após um período de treinamento intenso e a falta de testes durante o período de treinamento faz com que as informações sobre as alterações em marcadores biológicos relacionados com o desempenho fiquem incompletas (13). Os resultados apresentados na Figura 3 mostram como se encontrava o desempenho dos grupos de ratos utilizados nas análises sanguíneas de alanina e da razão Gm/Ga no momento da coleta do sangue. Observa-se que os ratos que foram sacrificados após T2x, apresentaram um nível de desempenho similar aos grupos AD e BD avaliados no mesmo período (teste 3). Isto demonstra que durante o processo de treinamento com uma sessão diária de exercícios todos os ratos estavam se adaptando ao estímulo de forma parecida. Dessa forma, como não é possível realizar uma análise pareada dos marcadores sanguíneos ao longo do treinamento, utilizando o desempenho como parâmetro, podemos assumir que os grupos AD e BD estão representados nas análises sanguíneas em três momentos: início do treinamento (CO), treinados (após T2x) e BD ou AD (após T4x).

Muitos indicadores sanguíneos têm sido apresentados na busca de possíveis alterações em estudos do overreaching/OTS (31). Neste sentido, Halson et al. (14) reportaram uma diminuição na razão Gm/Ga após um protocolo de treinamento intenso em humanos sugerindo uma classificação do overreaching baseada nesta razão. Smith & Norris (32) também sugeriram que a relação Gm/Ga pode ser utilizada como um marcador geral de tolerância ao treinamento. Segundo esses autores, atletas com desempenho dentro do esperado apresentariam uma razão Gm/Ga entre 3.58 - 5.88 e atletas em overreaching valores abaixo de 3.58.

No presente estudo, os ratos dos grupos T2x e AD apresentaram uma razão Gm/Ga maior ( $4.5 \pm 1,7$  e  $4.5 \pm 0,9$ ) do que os grupos CO e BD ( $2.8 \pm 0,5$  and  $3.1 \pm 0,2$ ), apresentando um comportamento similar ao efeito do treinamento intenso em seres humanos. Estes resultados reforçam os resultados de desempenho observados. Por outro lado, a concentração de alanina (Tabela 2) não apresentou diferença significativa em nenhum dos grupos analisados. Esse resultado é similar ao apresentado por Parry-Billings et al. (30) que verificaram alterações nas concentrações de glutamina e glutamato, porém a concentração de alanina manteve-se sem variação no repouso de 40 atletas de diversas modalidades diagnosticados como *overtreinados* em relação à um grupo controle. No entanto, este trabalho (30) não apresentou dados de desempenho, mencionando apenas “baixo desempenho atlético” sem maiores detalhes.

Não podemos afirmar que um estado complexo como OTS pode ser induzido em animais, visto que não se sabe ao certo se a atividade física é condição necessária ou suficiente para a apresentação não apenas da queda de desempenho, mas também para a manifestação de distúrbios psicológicos e comportamentais. No entanto, acreditamos que estudos mais controlados e reprodutíveis em modelo animal podem auxiliar na definição mais objetiva dos mecanismos

causadores da queda de desempenho ocasionados exclusivamente pelo desequilíbrio entre o exercício e o tempo de recuperação.

## PERSPECTIVAS

O protocolo de treinamento proposto neste trabalho mostra-se um método reprodutível e controlado de indução ao overreaching ou overtraining de curta duração diagnosticado através da queda de desempenho. Com este modelo é possível se estabelecer uma relação mais precisa entre queda de desempenho, fases de treinamento, perda de massa e biomarcadores abrindo boas possibilidades de investigação.

## REFERÊNCIAS

1. **Alexander RM.** Models and the scaling of energy costs for locomotion. *J. Exp. Biol.* 208: 1645-1652, 2005.
2. **Armstrong LE, VanHeest JL.** The Unknown mechanism of the overtraining syndrome. *Sports Med* 32(3):185-209,2002.
3. **Barron JL, Noakes TD, Levy W.** Hypothalamic dysfunction in overtrained athletes. *J Clin Endocrinol Metab* 60:803-806, 1985.
4. **Budgett R, Newsholme E, Lehmann M, Sharp C, Jones D, Peto T, Collins D, Nerurkar L, White P.** Redefining the overtraining syndrome as the unexplained underperformance syndrome. *Br J Sports Med* 34: 67-68, 2000.
5. **Carlile F.** *Forbes Carlile on Swimming.* Pelham Books, London, 1963.

6. **Costill DL., Flynn MG, Kirwan JP, Houmard JA, Mitchell JB, Thomas R, Park SH.** Effects of repeated days of intensified training on muscle glycogen and swimming performance. *Med. Sci. Sports Exerc.* 20(3): 249-254, 1988.
7. **Eicher ER.** Overtraining: consequences and prevention. *J Sports Sci* 13: 41-48, 1995.
8. **Fellman N, Bedu M, Bondet G.** Inter-relationships between pituitary and catecholamines during a 6-day Nordic ski race. *Eur J Appl Physiol* 64: 258-265, 1992.
9. **Fitzgerald L.** Overtraining increased the susceptibility to infection. *Int J Sports Med* 12(1):5-8, 1991.
10. **Froehlich J.** Overtraining syndrome. Inc Heil J, editor. *Psychology of sport injury.* Champaign (IL): Human Kinetics: 59-70, 1995.
11. **Fry AC, Kraemer WJ.** Resistance exercise overtraining and overreaching. *Sports Med* 23:106-129, 1997.
12. **Fry AC, Kramer WJ, van Borselen F.** Catecholamine responses to short-term high-intensity resistance exercise overtraining. *J Appl Physiol* 77:941-946, 1994.
13. **Halsen LH, Jeukendrup AE.** Does overtraining exist? An analysis of overreaching and overtraining research. *Sports Med* 34: 967-981, 2004.
14. **Halsen SL, Lancaster GI, Jeukendrup AE, Glesson M.** Immunological responses to overreaching in cyclists. *Med Sci Sports Exerc* 35(5): 854-861, 2003.
15. **Jeukendrup AE, Hesselink MK, Snyder AC.** Physiological changes in male competitive cyclists after two weeks of intensified training. *Int J Sports Med* 13(7):534-541, 1992.
16. **Karpovich P, Sinning W.** *Physiology of Muscular Activity.* Saunders, Philadelphia., 1971.

- 17. Kreider R, Fry AC, O'Toole M.** *Overtraining in sports: terms, definitions and prevalence.*  
In: *Overtraining in sports.* Champaign, IL, Human Kinetics, 1998, p. vii-ix.
- 18. Kreizer HA.** Neuroendocrine aspects of overtraining In: *Overtraining in sports.* Champaign, IL, Human Kinetics, 1998, p. 145-167.
- 19. Kuipers H.** Training and overtraining: an introduction. *Med.Sci.Sports Exerc* 30:1137-1139,1998.
- 20. Lehmann M, Foster C, Keul J.** Overtraining in endurance athletes: a brief review. *Med. Sci.Sports Exerc* 25(7):854-862,1993.
- 21. Liu J, Yeo HC, Overvik-douki E, Hagen T, Doniger SJ, Chu DW, Brooks GA, Ames BN.** Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. *J. Appl Physiol* 89: 21-28, 2000.
- 22. Lund P.** Glutamine: UV-method with glutaminase and glutamate dehydrogenase. In: *Methods of Enzymatic Analysis, Vol VIII, Metabolites 3: Lipids, Amino Acids and related Compounds.* B. Hu (Ed.) Weinheim: VCF, 1985, p. 357-363.
- 23. Mackenzie, RT.** *Exercise in Education and Medicine.* London: Sauders, 1923.
- 24. Mackinnon LT.** Effects of overreaching and overtraining on immune function. In: *Overtraining in sports.* Champaign, IL, Human Kinetics, 1998 p. 219-241.
- 25. McNair D, Lorr MM, Droppleman LF.** *Profile of mood states manual.* San Diego (CA), 1992.
- 26. Meeusen R, Piacentini MF, Busschaert B, Buyse L, De Shutter G, Stray-Gandersen J.** Hormonal responses in athletes: the use of a two bout exercise protocol to detect subtle differences in (over)training status. *Eur J Appl Physiol* 91: 140-146, 2004.

27. **Nieman DC.** Effects of athletic endurance training on infection rates and immunity. In: Overtraining in sports. Champaign, IL, Human Kinetics, 1998 p. 193-217.
28. **Noakes TD.** *Lore of running*. South Africa: Human Kinetics, 2001.
29. **Ogonovszky H, Berkes I, Kumagai S, Kaneko T, Tahara S, Goto S, Radak Z.** The effects of moderate, strenuous, and overtraining on oxidative stress markers, DNA repair, and memory in rat brain. *Neurochem Int* 46(8): 635-640, 2005.
30. **Parry-Billings M, Budgett R, Koutedakis Y, Blomstrand E, Brooks S, Williams C, Calder P, Pilling S, Baigrie R, Newshole E.** Plasma amino acid concentrations in the overtraining syndrome: possible effects on the immune system. *Med Sci Sports Exerc* 24(12): 1353-1358, 1992.
31. **Petibois C, Cazorla G, Poortmans JR, D  leris G.** Biochemical Aspects of Overtraining in Endurance Sports. *Sports Med* 32(13): 867-878, 2002.
32. **Smith DJ, Norris SR.** Changes in glutamine and glutamate concentrations for tracking training tolerance. *Med. Sci. Sports Exerc* 32(3):684-689, 2000.
33. **Smith LL.** Cytokine hypothesis of overtraining: a physiological adaptation to excessive stress? *Med. Sci. Sports Exerc* 32(2): 317-331, 2000.
34. **Snyder AC.** Overtraining and glycogen hypothesis. *Med Sci Sports Exerc* 30:1146-1150, 1998.
35. **Tiitus PM.** Radical species in inflammation and overtraining. *Can J. Physiol. Pharmacol* 76:533-538, 1998.
36. **Urhausen A, Gabriel H, Kindermann W.** Blood hormones as markers of training stress and overtraining. *Sports Med* 20:251-276, 1995.

- 37. Urhausen A, Gabriel HHW, Kindermann W.** Impaired pituitary hormonal response to exhaustive exercise in overtrained endurance athletes. *Med Sci Sports Exer* 30: 407-414, 1998.
- 38. Urhausen A, Kindermann W.** Diagnosis of overtraining: what tools do we have?. *Sports Med* 32(2):95-102, 2002.
- 39. Van Borselen F, Vos NH, Fry AC.** The role of anaerobic exercise in overtraining. *J Strength Cond Res* 14: 74-79, 1992.
- 40. Viru A.** The mechanism of training effects: a hypothesis. *Int. J. Sports Med* 5:219-227, 1984.
- 41. Williamson DH.** Alanine: Determination with alanine dehydrogenase. In: *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol VIII, Metabolites 3: Lipids, Amino Acids and related Compounds. B. Hu (Ed.) Weinheim: VCH, 1985, p. 341-344.
- 42. Zoppi CC, Macedo DV.** Overreaching-induced oxidative stress, enhanced HSP72 expression, antioxidant and oxidative enzymes downregulation. *Scand J Med Sci Sports*, 2007 (*In Press*).

## **CAPÍTULO IV**

### **Alterações na glutamina plasmática, leucocitose e no metabolismo energético muscular em ratos induzidos ao overreaching.**

Rodrigo Hohl; Rodrigo Luiz Ferraresso, Rejane Lucco, Renato Buscariolli de Oliveira; René Brenzikofer ;Denise Vaz de Macedo

## RESUMO

Diversas hipóteses vêm sendo sugeridas para explicar os mecanismos envolvidos na queda de desempenho observada nos estados de overreaching/overtraining. A dificuldade de se estabelecer modelos comparativos e reprodutíveis de indução a esses estados parece ser a maior causa do persistente conflito das informações. O presente estudo utilizou um protocolo de treinamento de indução ao overreaching em ratos, estabelecido pelo aumento das sessões diárias de treino de 1 para 2, 3 e 4 vezes, com diminuição no tempo de recuperação entre elas (24, 4, 3 e 2 h), e diagnosticado através de um teste de desempenho. Ao final do treinamento foram selecionados dois grupos: Alto Desempenho (AD) e Baixo Desempenho (BD). Nosso objetivo foi analisar as diferenças adaptativas entre os ratos AD e BD em relação a marcadores do metabolismo energético muscular, concentrações plasmáticas de glutamina, glutamato e parâmetros hematológicos. Comparando ambos os grupos, observamos que o grupo BD apresentou: (1) diminuição das concentrações plasmáticas de glutamina e aumento nas de glutamato; (2) diminuição da capacidade oxidativa e estoques de glicogênio semelhantes; (3) leucocitose. Os nossos resultados mostraram que os ratos dos grupos BD e AD apresentaram uma resposta adaptativa diferenciada frente ao aumento da carga de treinamento. Sugerimos a hipótese de que esta diferença reside na adaptação do sistema de defesa antioxidante muscular que estaria mais eficiente no grupo AD. O grupo BD se encontraria com concentrações aumentadas de EROs exacerbando o efeito antiinflamatório do exercício impedindo a regeneração eficiente mediada por neutrófilos e macrófagos. Isto causaria a queda compulsória de desempenho no estado de overreaching, provavelmente uma forma de preservação do tecido muscular com objetivo de evitar um estado mais avançado que pode ser chamado de síndrome do overtraining.

## INTRODUÇÃO

O treinamento de alto nível geralmente envolve altas cargas de trabalho a fim de aumentar o desempenho atlético. No entanto, se houver um desequilíbrio freqüente entre o estímulo do exercício e o período de recuperação pós-esforço o atleta pode experimentar um estado crônico de fadiga associado à queda de desempenho denominado *overtraining* (OT). Este quadro, também chamado síndrome do *overtraining* (OTS) pode estar associado com um ou mais sintomas, entre eles um estado catabólico acentuado, com alterações fisiológicas, imunológicas, bioquímicas, com o aumento na susceptibilidade a lesões e alterações comportamentais (61). A recuperação do OTS é lenta, podendo persistir por várias semanas ou meses (5, 30, 32). A literatura denomina o *overtraining* de curta-duração de *overreaching* (19, 23, 50). Os sintomas do *overreaching* podem ser revertidos com um período mais curto (dias ou poucas semanas) (5, 30, 32).

Ainda não existe um consenso, somente hipóteses, sobre quais são os mecanismos envolvidos, ou qual seria a seqüência de alterações induzidas por esse desequilíbrio persistente entre carga e descanso que desencadeiam a queda do desempenho. O desequilíbrio no sistema nervoso autônomo talvez seja uma das mais antigas hipóteses do OTS (26, 31). Alterações no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal também tem recebido atenção (7, 18, 60). Embora o comportamento do cortisol e do ACTH nos trabalhos que investigam o OR/OTS sejam variáveis (5, 61), tem sido proposto que no estado avançado e crônico do *overtraining* ocorreria um decréscimo na resposta do cortisol (31) enquanto um estado de alto esforço fisiológico inicial seria representado por um aumento nas concentrações plasmáticas do cortisol (29, 27).

Há também a proposição de que o alto grau de fadiga que caracteriza o *OR/OTS* seria devido a reposição parcial das reservas de glicogênio muscular pós-exercícios intensos diários (54). Já a teoria da glutamina propõe que este aminoácido teria sua concentração plasmática diminuída no

estado de *OTS* e por ser o principal substrato energético de leucócitos explicaria a diminuição na resposta imune e aumento na frequência de infecções observadas (38)

O aumento na produção de espécies reativas de  $O_2$  (EROs), que acompanha o aumento da atividade contrátil muscular (2, 12) parece ser importante tanto para a adaptação positiva (52, 65) quanto para o início do dano muscular induzido pelo exercício e o início e propagação da resposta inflamatória subsequente (39). Nesse sentido, Vassilakopoulos e col. (63) sugeriram que o estresse oxidativo seria o principal estímulo para a indução da produção de citocinas no exercício físico, uma vez que as EROs podem atuar como mediadores de vias de transdução de sinais, capazes de induzir a síntese de citocinas pelo músculo (3, 28). Tidus (58) já havia proposto uma relação entre o estresse oxidativo, processo inflamatório e overtraining ressaltando a importância dos neutrófilos no reparo celular. Smith (51) complementou a proposta, sugerindo que a *OTS* seria causada por uma resposta inflamatória sistêmica mediada por citocinas pró-inflamatórias produzidas, principalmente por neutrófilos e macrófagos.

A despeito das várias hipóteses existentes, a queda de desempenho ainda representa o padrão ouro no diagnóstico do OT em testes de desempenho realizados até a exaustão (23), sendo este o único parâmetro de consenso na literatura que deve estar obrigatoriamente associado tanto ao OR quanto ao *OTS* (5). Recentemente apresentamos um protocolo controlado e reprodutível de indução ao OR para ser aplicado em ratos *Wistar*, diagnosticado através da queda de desempenho (capítulo III). A aplicação desse protocolo permite a separação, no final de 11 semanas, de dois grupos de ratos diferenciados em relação ao desempenho: Baixo Desempenho (BD) e Alto Desempenho (AD).

No presente trabalho, o objetivo foi analisar as diferenças adaptativas entre os ratos AD e BD em relação a marcadores do metabolismo energético muscular (glicogênio, citrato sintase e

lactato desidrogenase), concentrações plasmáticas de glutamina (Gm), glutamato (Ga) e parâmetros hematológicos. O segundo objetivo foi estabelecer perspectivas na investigação dos mecanismos envolvidos na diferenciação dos dois grupos de ratos e avaliar o potencial do modelo no estudo do OR/OTS.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### *ANIMAIS*

Utilizamos inicialmente 80 ratos da raça Wistar com 60 dias de idade, pesando entre 200 – 250 g, alimentados com ração e água *ad libitum*. Durante o período de experimento os animais foram mantidos em ambiente com a temperatura controlada entre 18 e 22°C e fotoperíodo de 12 horas com ciclo de luz claro-escuro invertido. Todos os ratos foram adaptados à esteira rolante durante duas semanas antes do início dos experimentos. A fase de adaptação consistiu em colocá-los na esteira 5 dias/semana durante 10 minutos com velocidade em 12 m/min, a fim de separar os animais que corriam voluntariamente daqueles que se recusavam a correr, para que apenas realizassem os testes os animais que corressem voluntariamente. Os ratos que realizaram o teste inicial com um tempo de exaustão entre 20 e 30 minutos foram selecionados para o estudo (N=49). O protocolo experimental e o manejo dos animais foram aprovados previamente pela Comissão de Ética para Experimentação Animal (638-1).

### *DESIGN DO PROTOCOLO DE TREINAMENTO*

O protocolo foi realizado de acordo com o Capítulo III com duração total de 11 semanas. Os animais do grupo controle (CO) (N = 8) foram submetidos a 10 minutos de esteira com

velocidade de 12 m/min duas vezes na semana durante todo o período de análise, excetuando as semanas destinadas ao teste de desempenho. O restante dos ratos ( $N = 33$ ) foi submetido a um protocolo de treinamento que buscou estabelecer um continuum entre adaptação/overreaching/OTS. As oito primeiras semanas foram dimensionadas para ser um treinamento adaptativo, composto de duas fases. Nas primeiras 4 semanas a velocidade e o tempo de corrida foram aumentados progressivamente em cada semana (AT1). Nas quatro semanas posteriores a velocidade e o tempo de corrida, atingidos ao final da fase AT1 foram mantidos (AT2). Já nas 3 semanas seguintes procurou-se estabelecer um desequilíbrio entre estímulo e recuperação nos animais treinados, aplicando a mesma carga do AT2 mas aumentando-se o número de sessões diárias de treino para duas (T2x), três (T3x) e quatro (T4x) vezes ao dia, com diminuição no tempo de recuperação entre as sessões (4, 3 e 2 h).

#### *TESTE DE DESEMPENHO*

Todos os testes iniciaram-se com os animais correndo em esteira sem inclinação, na velocidade inicial de 12 m/min. A cada 2 min incrementou-se a velocidade em 1 m/min até que fosse atingido 20 m/min. A partir dessa velocidade o incremento da esteira passou a ser de 2 m/min a cada 3 minutos até que o animal atingisse a exaustão. A exaustão foi definida no momento em que os animais tocavam a grade eletrificada da esteira cinco vezes em um minuto (33). Os testes de desempenho realizados nos ratos sedentários (CO) foram feitos nas semanas correspondentes aos testes realizados nos animais dos grupos treinados. O desempenho foi quantificado através do produto entre a massa corporal e a distância percorrida até a exaustão por cada animal para possibilitar comparação longitudinal individualizada (Capítulo III).

Os testes de performance foram feitos antes do início do treinamento (teste 0) e após a 4<sup>a</sup> (teste 1), 8<sup>a</sup> (teste 2), 9<sup>a</sup> (teste 3), 10<sup>a</sup> (teste 4) e 11<sup>a</sup> (teste 5) semanas de treinamento, sempre 60 h após a última sessão de treino semanal. Assim, cinco testes de desempenho foram realizados ao longo do estudo, refletindo as diferentes fases do treinamento, conforme descrito na Tabela 1.

**Tabela 1.** Número do teste de desempenho respectivo a cada fase do treinamento.

| <u>Número do testes</u> | <u>Fases do treinamento</u> |
|-------------------------|-----------------------------|
| 0                       | Adaptação                   |
| 1                       | TA1                         |
| 2                       | TA2                         |
| 3                       | T2x                         |
| 4                       | T3x                         |
| 5                       | T4x                         |

### *GRUPOS DE ANIMAIS*

Dezesseis ratos compuseram o grupo controle sedentário (CO), sendo que 8 deles foram submetidos mensalmente aos testes de desempenho até o final do protocolo de treinamento (capítulo III). Os demais oito ratos CO foram sacrificados após teste 4 para a retirada do sangue e tecidos. Os 33 ratos do grupo treinado foram divididos em três sub-grupos: Treinados (T2x) (N=8) sacrificados para análise de sangue e músculo após teste 3; Baixo Desempenho (BD) (N=8) e Alto Desempenho (AD) (N=8), sacrificados após o teste 5. Detalhes sobre os critérios de separação dos grupos são encontrados no Capítulo III.

### *ANÁLISES SANGUÍNEAS*

O sangue foi extraído através de punção cardíaca após 60 horas da realização do teste de desempenho. Foram analisados quatro grupos: 1- Controle (CO) (N = 8); 2- T2x (N = 8); 3- BD

(N = 8) e 4- AD (N = 8). Os ratos foram anestesiados com hidrato de cloral 20%. Cinco mL de sangue foram imediatamente desproteinados com ácido perclórico 10% e centrifugado à 3000g por 5 minutos (4°C). O sobrenadante foi neutralizado com KOH e re-centrifugado nas mesmas condições anteriores. As amostras foram armazenadas à -80°C para posterior análises. Foram coletados mais 2 mL de sangue em tubo contendo K<sup>+</sup>/EDTA para análise do hematócrito referente a porcentagem de hemácias no sangue (HCT), contagem de leucócitos, de hemácias, volume corpuscular médio das hemácias (VMC) e concentração de hemoglobina (HGB) em contador automatizado, imediatamente após a coleta.

A análise do glutamato foi realizada na presença da enzima glutamato desidrogenase (EC 1.4.1.3) e NAD<sup>+</sup>, medindo-se em espectrofotômetro (Beckman DU-640) a formação de NADH (339 nm). As amostras para a análise de glutamina ficaram incubadas à 37°C em solução contendo glutaminase (EC 3.5.1.2). O método de análise foi feito segundo Lund (35).

### *ANÁLISES EM MÚSCULO*

Foram utilizados 30 mg (úmido) do músculo gastrocnêmio vermelho (GV) armazenados à -80°C. No momento das análises, as amostras foram trituradas num homogenizador Polytron por 10 segundos com velocidade máxima em tampão MOPS 20 Mm (pH=7,2) contendo EDTA (1mM), sacarose (440 mM) e PMSF (200 Mm). A atividade da citrato sintase (CS) e lactato desidrogenase (LDH) foram medidas em espectrofotômetro segundo o método proposto por Srere (55) e Vassault (62), respectivamente.

Para quantificação do glicogênio muscular utilizamos 50 mg (úmido) do músculo GV. Todos os músculos analisados ficaram armazenados durante sete dias à -80°C. Ao completarem este tempo de armazenamento o glicogênio muscular foi analisado conforme proposto por Lo (34)

### *ANÁLISE ESTATÍSTICA*

As análises dos resultados e as estatísticas foram feitas através dos aplicativos Matlab<sup>®</sup> 7.0. e Origin<sup>®</sup> 6.0. Utilizamos o teste ANOVA para amostras não pareadas com pós-teste de Tukey. Também utilizamos o teste t para comparação entre dois grupos. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

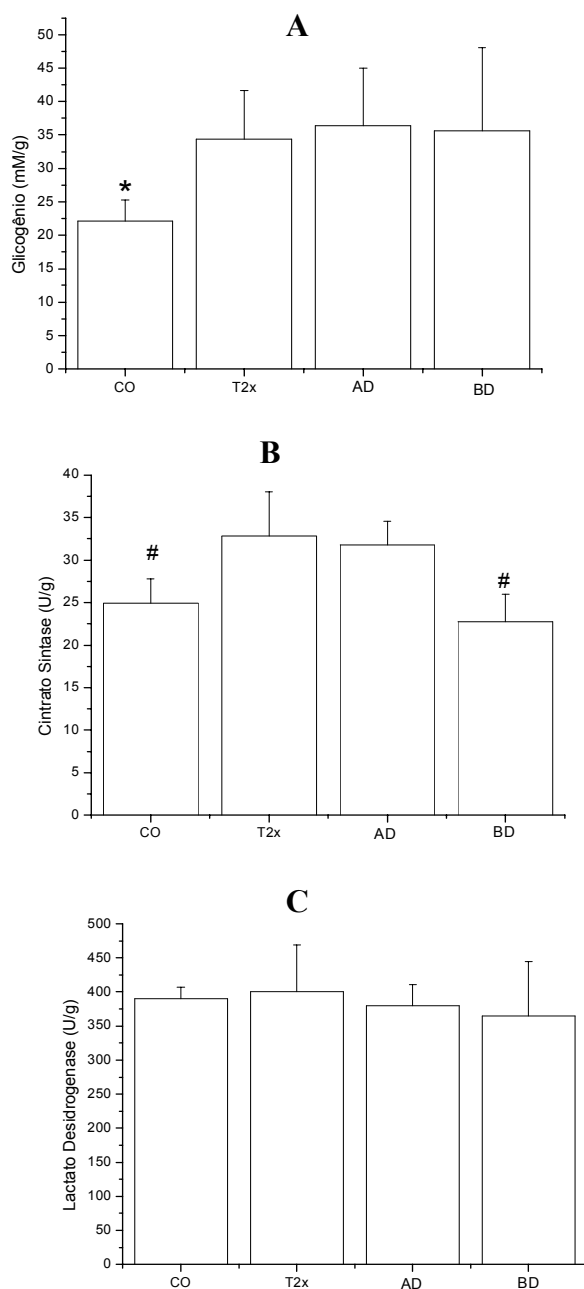
## **RESULTADOS**

### *EFEITO DO PROTOCOLO DE INDUÇÃO AO OVERREACHING E DESEMPENHO*

O desempenho do grupo T2x aumentou significativamente ( $p < 0,001$ ) no teste 3 comparado ao teste 0 ( $492,8 \pm 50,5$  kg.m e  $164,9 \pm 41,3$  kg.m, respectivamente). O grupo AD manteve no teste 5 o desempenho atingido no teste 3 ( $473,1 \pm 136,1$  Kg.m e  $462,5 \pm 110,2$  Kg.m, respectivamente), sem diferença significativa para o grupo T2x na comparação com o teste 3. O grupo BD diminuiu o desempenho ( $p < 0,001$ ) no teste 5 comparado ao teste 3 ( $252,6 \pm 110,5$  Kg.m e  $405,6 \pm 82,6$  Kg.m, respectivamente). Não houve diferença significativa quando o teste 3 do grupo BD foi comparado com o teste 3 do grupo T2x. O grupo CO manteve o desempenho sem alterações significativas do teste 1 ( $210,1 \pm 56,8$  Kg.m) até o teste 5 ( $138,8 \pm 40,6$  Kg.m). Esses dados indicam que até a 9ª semana de treinamento os grupos BD e AD exibiam praticamente o mesmo desempenho que os animais do grupo T2x. As duas semanas subsequentes (T3x e T4x) foram responsáveis pelas diferenciações dos grupos em relação o desempenho. Maiores detalhes sobre alterações no desempenho no Capítulo III.

### EFEITO DO PROTOCOLO SOBRE PARÂMETROS METABÓLICOS MUSCULARES

As concentrações do glicogênio (A), atividade da enzima CS (B) e LDH (C) mensuradas no músculo GV dos diferentes grupos de animais estão apresentados na Figura 1.



**Figura 1.** Média  $\pm$  DP da concentração de glicogênio (A) e atividades da CS (B) e LDH (C) no músculo GV dos grupos CO, T2x, AD e BD. \* diferença significativa em relação aos grupos T2x, AD e BD, ( $p < 0,05$ ). # diferença significativa em relação aos grupos T2x e AD, ( $p < 0,05$ ).

A concentração do glicogênio no músculo GV (A) estava significativamente menor nos animais do grupo CO em relação a todos os grupos treinados ( $p < 0,05$ ). A atividade da CS (B) estava significativamente menor nos grupos CO e BD quando comparados aos grupos T2x e AD ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença significativa na atividade da LDH em nenhum dos grupos analisados.

### *EFEITO DO PROTOCOLO SOBRE PARÂMETROS SANGUÍNEOS*

A Tabela 2 mostra parâmetros hematológicos e as concentrações de glutamato e glutamina no sangue de todos os grupos.

**Tabela 2.** Média  $\pm$  DP das variáveis analisadas no sangue dos grupos CO, T2x, AD e BD.

| Variáveis Sanguíneas                                 | Grupos de ratos  |                               |                               |                            |
|------------------------------------------------------|------------------|-------------------------------|-------------------------------|----------------------------|
|                                                      | CO               | T2x                           | AD                            | BD                         |
| <b>Glutamato (<math>\mu\text{M}</math>)</b>          | 179 $\pm$ 22,3   | 140,8 $\pm$ 31,6 <sup>a</sup> | 126,9 $\pm$ 21,7 <sup>b</sup> | 161,5 $\pm$ 19,4           |
| <b>Glutamina (<math>\mu\text{M}</math>)</b>          | 498,6 $\pm$ 93,2 | 596,7 $\pm$ 71,9 <sup>c</sup> | 558,0 $\pm$ 42,4              | 502,9 $\pm$ 51,0           |
| <b>Leucócitos (<math>10^9 \text{ L}^{-1}</math>)</b> | 3,2 $\pm$ 1,1    | 2,1 $\pm$ 1,4                 | 2,2 $\pm$ 0,8                 | 5,3 $\pm$ 2,3 <sup>d</sup> |
| <b>Hemácias (<math>10^9 \text{ L}^{-1}</math>)</b>   | 8,2 $\pm$ 0,4    | 7,62 $\pm$ 0,8                | 7,8 $\pm$ 0,7                 | 7,46 $\pm$ 0,4             |
| <b>HCT (%)</b>                                       | 41,4 $\pm$ 1,3   | 39,1 $\pm$ 4,6                | 41,7 $\pm$ 3,4                | 41,3 $\pm$ 4,3             |
| <b>VCM (<math>\mu^3</math>)</b>                      | 49,8 $\pm$ 1,4   | 51,4 $\pm$ 3,1                | 52,6 $\pm$ 4,7                | 54,9 $\pm$ 2,8             |
| <b>HGB (g.dL<sup>-1</sup>)</b>                       | 15,7 $\pm$ 0,5   | 14,9 $\pm$ 1,7                | 15,2 $\pm$ 0,5                | 14,9 $\pm$ 1,2             |

<sup>a</sup> diferença significativa em relação ao CO ( $p < 0,01$ ). <sup>b</sup> diferença significativa em relação ao CO e BD ( $p < 0,001$ ). <sup>c</sup> diferença significativa em relação ao CO e BD ( $p < 0,05$ ). <sup>d</sup> diferença significativa em relação ao CO, T e AD ( $p < 0,05$ ).

Observou-se diminuição significativa nas concentrações plasmáticas de glutamato nos animais do grupo T2x quando comparado ao grupo CO ( $p < 0,01$ ). Já os animais do grupo AD apresentaram diminuição do glutamato ainda maior ( $p < 0,001$ ). Somente o grupo T2x apresentou

aumento significativo na concentração de glutamina em relação aos grupos CO e BD ( $p < 0.05$ ). Os animais do grupo AD apresentaram somente uma tendência de aumento nas concentrações de glutamina plasmática. O grupo BD não apresentou nenhuma alteração nas concentrações plasmáticas de ambos os aminoácidos, exibindo valores semelhantes aos observados nos animais do grupo CO.

Em relação aos parâmetros hematológicos somente no grupo BD o número de leucócitos totais aumentaram significativamente quando comparado aos outros grupos ( $p < 0,05$ ). Os demais parâmetros hematológicos não sofreram alterações, o que descarta a possibilidade de alterações no volume sanguíneo.

## DISCUSSÃO

Os resultados nos biomarcadores analisados nesse estudo refletem respostas crônicas ao protocolo de treinamento, visto que os ratos foram analisados 60 h após o teste de exaustão, e 120 h após a última sessão de treino. Nestas condições, observamos que as concentrações de glicogênio no músculo gastrocnêmio vermelho encontravam-se em níveis similares nos três grupos T2x, AD e BD, e com valores significativamente maiores do que o observado nos animais do grupo CO (Figura 1A). Assumindo que no momento do teste de desempenho os ratos se encontravam nessas mesmas condições, podemos concluir que a concentração de glicogênio muscular não foi responsável pela queda de desempenho observada nos ratos do grupo BD. Resultados anteriores obtidos com humanos também não haviam encontrado relação entre baixas concentrações de glicogênio e queda de desempenho após um período de treinamento intenso (10), e em atletas diagnosticados como *overtreinados* (53). Os resultados obtidos nos ratos também

descartam a hipótese da redução dos estoques do glicogênio muscular como causa da queda de desempenho nos animais.

A queda de desempenho manifestada nos animais do grupo BD pode estar relacionada com a diminuição da capacidade oxidativa, medida através da atividade da CS (Figura 1B), que também explicaria o aumento e manutenção de desempenho observado nos grupos T2x e AD, uma vez que a atividade da LDH não se alterou em nenhum dos grupos (Figura 1C). O teste de desempenho até a exaustão utilizado nesse estudo possui característica progressiva, iniciando em baixa velocidade.

O aumento na atividade da CS é esperado após um treinamento de endurance (14, 24) e foi verificado nos grupos T2x e AD, mas o fato surpreendente observado neste estudo foi a diminuição na atividade da CS nos animais do grupo BD. A especulação de que a diminuição na atividade da CS no grupo BD ocorreu em resposta a uma carga insuficiente de treinamento, não propiciando estímulo adequado para o aumento da sua expressão (42), parece descartada pela observação de adaptação similar nas concentrações de glicogênio muscular nos ratos BD, AD e T2x, significativamente superiores as do grupo CO (21, 44, 47).

A diminuição da atividade da enzima CS no grupo BD pode ter ocorrido devido a um aumento do nível de estresse oxidativo intracelular induzido nas 3 últimas semanas de treino, propiciando o ataque à membrana mitocondrial e a conseqüente diminuição da capacidade oxidativa muscular. Atividades musculares que elevam o consumo de oxigênio mitocondrial resultam num aumento na formação de espécies radicalares como o ânion superóxido (43, 48). Zhang e col. (64) mostraram inativação da capacidade oxidativa da cadeia de transporte de elétrons após exposição de subpartículas mitocôndriais à EROs. Resultados prévios mostraram elevação da atividade das enzimas glutathione redutase e catalase no músculo sóleo paralelo ao

aumento na atividade da CS em ratos submetidos a um protocolo similar até a fase adaptativa (AT2) utilizada no presente trabalho (52). Provavelmente uma capacidade diferenciada de adaptação do sistema antioxidante dos grupos BD e AD nas duas últimas semanas de treinamento (T3x e T4x) poderia explicar as diferentes respostas no desempenho dos dois grupos de animais.

Recentemente, utilizando o mesmo protocolo de treinamento Zoppi e Macedo (65) demonstraram aumento nos marcadores de estresse oxidativo com concomitante diminuição da atividade da CS no músculo sóleo. No entanto, neste estudo não foi realizado o teste de desempenho e, portanto os resultados agrupados não permitiram a diferenciação dos grupos.

O aumento da carga de treinamento pode aumentar o requerimento de aminoácidos numa situação de hipermetabolismo, que pode ser parcialmente provido pelo aumento da proteólise muscular e pela concomitante redução do anabolismo (51). No capítulo III mostramos a variação de massa corporal apresentada pelos grupos CO, AD e BD após o teste 3. Nas análises anteriores ao teste 3, todos os três grupos apresentaram aumento progressivo da massa no processo normal de crescimento dos ratos (dados não mostrados). A partir do teste 3 os animais AD e BD apresentaram uma curva descendente da massa corporal média, indicando que ambos os grupos se encontravam sob grande estresse catabólico quando o treinamento passou para as fases T3x e T4x. Glicocorticóides, liberados em condição de estresse, quando se encontra aumentado na corrente sanguínea em concentrações fisiológicas causa aumento da proteólise (8, 49), induzindo a grande perda de massa (13).

A glutamina é considerada um aminoácido essencial em situação de estresse quando as concentrações de corticoesteróides estão elevadas (13). O tratamento com corticoesteróides causa aumento na exportação de glutamina pelo músculo (25, 37), com concomitante aumento da atividade da glutamina sintetase e da expressão do mRNA desta enzima (1). Este fato pode estar

relacionado com o aumento basal da concentração plasmática de glutamina encontrada nos grupos T2x em relação aos grupos CO e BD. Também o grupo AD exibiu uma tendência de aumento (Tabela 2), o que não ocorreu nos ratos BD, que também se encontravam sob forte estresse.

No grupo BD, apesar de uma provável sinalização para o aumento na exportação de glutamina da mesma forma que para os outros grupos (AD e T2x), a diminuição da capacidade oxidativa medida pela CS talvez não permita atender a demanda por  $\alpha$ -cetoglutarato para a formação de glutamato. Rowbottom e col. (46) especularam que lesões mitocondriais poderiam limitar a disponibilidade de  $\alpha$ -cetoglutarato e a formação de glutamato no músculo; e a infusão de dicloroacetato, um potente ativador do complexo piruvato desidrogenase, aumentam a produção de glutamina significativamente (16).

É possível que o aumento na concentração de glutamato sanguíneo do grupo BD quando comparado ao grupo AD seja devido à diminuição do gradiente eletroquímico causado pelo aumento de  $\text{Na}^+$  intracelular (22). O glutamato é transportado para dentro das células por transportadores dependentes de  $\text{Na}^+$  (36). Lesões celulares podem aumentar o influxo de  $\text{Na}^+$  para o interior da célula muscular, diminuindo o transporte de glutamato para dentro da célula (45, 59) como verificado em condições de alto catabolismo (22).

O aumento de leucócitos no plasma no grupo BD (Tabela 2) também pode contribuir para a diminuição da concentração de glutamina observada nesse grupo em comparação com o grupo AD e T2x. Macrófagos e neutrófilos são leucócitos envolvidos no processo inflamatório com alta taxa de consumo de glutamina (20, 41). No presente estudo, encontramos leucócitos elevados 120 h após a última sessão de treino e 60 h após o teste de desempenho. Na situação de estresse crônico estabelecida no grupo BD o aumento basal de glicocorticóides poderia aumentar a circulação de neutrófilos (56), refletido na leucocitose observada nos animais desse grupo. A

elevação dos neutrófilos na corrente sanguínea e o subsequente declínio em algumas horas podem ser interpretados como infiltração dos neutrófilos no tecido muscular lesado (15, 17). No entanto, glicocorticóides suprimem a expressão de moléculas de adesão endoteliais e inibe a migração de neutrófilos para o tecido lesado (11), mantendo-os circulantes por mais tempo. Os ratos BD podem estar num estado mais elevado de estresse catabólico, provavelmente mediado por concentrações basais corticoesteróides mais elevadas. O retardo em uma semana da retomada do crescimento normal nos ratos BD (capítulo III) e a concentração de leucócitos elevada muitas horas após o exercício reforçam essa hipótese.

Acreditamos que alterações nas concentrações de corticoesteróides e suas ações nos tecidos e no endotélio parecem fazer a ligação entre os resultados encontrados neste trabalho. Recentes descobertas demonstraram o efeito anti-inflamatório do exercício (40) e a relação entre estresse oxidativo, produção de interleucinas anti-inflamatórias (IL-6, IL-10 e IL-1ra) e liberação de corticoesteróides (39, 56). O cortisol possui efeito anti-inflamatório (6) que pode suprimir a inflamação aguda exagerada, visto que macrófagos e neutrófilos podem lesar mais ainda o tecido caso o processo inflamatório agudo seja muito acentuado (9, 57). Sugerimos que os ratos AD e T2x se encontram com o tecido muscular menos lesado pela melhor adaptação dos sistemas antioxidante e oxidativo para atender a demanda regenerativa inflamatória moderada nos momentos de repouso. Os ratos BD, diferenciados provavelmente pela adaptação insatisfatória do sistema de defesa antioxidante frente à demanda do aumento de carga (fases T3x e T4x) se encontrariam com concentrações aumentadas de EROs, exacerbando o efeito anti-inflamatório do exercício, mediado pela produção de IL-6 que pode estar relacionada com aumento na concentração basal de glicocorticóides (56). Isso suprimiria o processo regenerativo eficiente e moderado e causaria a queda compulsória de desempenho no estado de *overtraining* de curta

duração. Este estado poderia representar uma forma de preservação do tecido muscular tentando evitar o estado mais avançado de OTS onde os mecanismos metabólicos e fisiológicos atuantes podem não mais serem os mesmos sugeridos neste trabalho. Armstrong e VanHeest (2002), analisando 10 estudos da literatura em seres humanos, apresentaram uma proposta de diferenciação das concentrações de cortisol em três estados. No estado overreaching (ou semanas iniciais do OT) haveria manutenção da concentração basal de cortisol e aumento durante o exercício, no estado de overtraining (2<sup>a</sup> à 4<sup>a</sup> semana) haveria manutenção ou aumento da concentração basal de cortisol e diminuição durante o exercício e no estado de síndrome do overtraining (OTS), haveria diminuição do cortisol na concentração basal e durante o exercício. Sugerimos que o estado mais avançado (OTS) poderia ser atingido após exposição crônica ao estresse durante e após o exercício em indivíduos com alta exposição a EROs. Isto causaria alterações tônicas no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal como efeito acumulativo da situação (4). Tal hipótese, como as outras, precisa ainda ser experimentalmente testada.

## PERSPECTIVAS

Com esse modelo será possível estabelecer relações mais precisas entre fases de treinamento, perda de massa, biomarcadores e desempenho, abrindo a possibilidade de muitas investigações simultâneas.

## REFERÊNCIAS

1. **Abcouwer SF, Bode BP, Souba WW.** Glucocorticoids regulate rat glutamine synthetase expression in a tissue-specific manner. *J.Surg. Res.*: 59(1):59–65, 1995.

2. **Alessio HM.** Exercise-induced oxidative stress. *Med. Sci. Sports Exerc.* 25(2): 218-224, 1993.
3. **Aoi W, Naito W, Takanami Y, Kawai W, Sakuma K, Ichikawa H e col.** Oxidative stress and delayed-onset muscle damage after exercise. *Free Rad. Biol. Med.* 37: 480-487, 2004.
4. **Armário, A.** The hypothalamic-pituitary-adrenal axis: what can it tell us about stressors? *CNS Neurol Disord Drug Targets.* Oct.5(5):485-501, 2006.
5. **Armstrong LE, VanHeest JL.** The Unknown mechanism of the overtraining syndrome. *Sports Med* 32(3):185-209,2002.
6. **Barnes PJ.** Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Cli. Sci.* 94: 557-572, 1998.
7. **Barron JL, Noakes TD, Levy W.** Hypothalamic dysfunction in overtrained athletes. *J Clin. Endocrinol. Metab.* 60:803-806, 1985.
8. **Brillon DJ, Zheng B, Campbell RG, Matthews DE.** Effect of cortisol on energy expenditure and amino acid metabolism in humans. *Am. J. Physiol.* 268(31): E501-E513, 1995.
9. **Butterfield TA, Best TM, Merrick MA.** The dual roles of neutrophils and macrophages in inflammation: A criticalbalance between tissue damage and repair. *J. Athl. Train.* 41(4): 457-465, 2006.
10. **Costill DL., Flynn MG, Kirwan JP, Houmard JA, Mitchell JB, Thomas R, Park SH.** Effects of repeated days of intensified training on muscle glycogen and swimming performance. *Med. Sci. Sports Exerc.* 20(3): 249-254, 1988.
11. **Cronstein BN, Kimmel SC, Levin RJ, Martiniuk F, Weissmann G.** A mechanism for antiinflammatory effects of corticosteroids: The glucocorticoid receptor regulates leukocyte adhesion to endothelial cells and expression of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 and intecellular adhesion molecule 1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 9991-9995, 1992.
12. **Davies KJA, Quintanilha AT, Brooks GA, Packer I.** Free radical and tissue damage produced by exercise. *Biochem. Biophys. Re. Commun.* 107: 1198-1205, 1982.
13. **de Blaauwa I, Schols A MWJ, Koerts-deLang E, Wouters EFM, Deutz NEP.** De novo glutamine synthesis induced by corticosteroids in vivo in rats is secondary to weight loss. *Clinical Nutrition* 23:1035–1042, 2004.
14. **Dudley GA, Abraham WM, Terjung RL.** Influence of exercise intensity and duration on biochemical adaptations in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 53(4): 844-850, 1982.

15. **Evans W, Cannon J.** Metabolic effects of exercise-induced muscle damage. In. *Exercise and sports sciences reviews*. 18: 99-125. Edited by: Holloszy JO, Williams and Wilkins, Baltimore, 1991.
16. **Ferrando AA, Chinkes DL, Wolf SE, Matin S, Herndon DN, Wolfe RR.** Acute dichloroacetate administration increase skeletal muscle free glutamine concentration after burn injury. *Ann. Surg.* 228 (2): 249-256, 1998.
17. **Fielding R, Manfredi T, Ding W, Fiatarone M, Evans W, Cannon J.** Acute phse response to exercise. III. Neutrophil and IL-1 $\beta$  accumulation in skeletal muscle. *Am J. Physiol.* 265: R166-R162, 1993.
18. **Fry AC, Kraemer WJ, Ramsey LT.** Pituitary-adrenal-gonadal responses to high-intensity resistance exercise overtraining. *J. Appl. Physiol.* 85 (6):2352-2359, 1998.
19. **Fry AC, Kraemer WJ.** Resistance exercise overtraining and overreaching. *Sports Med* 23:106-129,1997.
20. **Gordon S.** Biology of macrophages. *J. Cell. Sci.Suppl.* 4: 267-268, 1986.
21. **Greiwe, Jeffrey S., Robert C. Hickner, Polly A. Hansen,Susan B. Racette, May M. Chen, and John O.Holloszy.** Effects of endurance exercise training on muscle glycogen accumulation in humans. *J. Appl. Physiol.* 87(1):222–226, 1999.
22. **Hack V, Stütz O, Kinscherf R, Schykowski M, Kellerer M, Holm E, Dröge W.** Elevated venous glutamate levels in (prê)catabolic conditions result at least partly from a decreased glutamate transport activity. *J. Mol. Med.* 74: 337-343, 1996.
23. **Halsen LH, Jenkendrup AE.** Does overtraining exist? An analysis of overreaching and overtraining research. *Sports Med* 34: 967-981, 2004.
24. **Holloszy JO, Coyle EF** Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences. *J. Appl. Physiol.* 56(4): 831-838, 1984.
25. **Hundal HS, Babij P, Taylor PM, Watt PW, Rennie MJ.** Effects of corticosteroid on the transport and metabolism of glutamine in rat skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta.* 1092: 376–83, 1991.
26. **Israel, S.** Problems of overtraining from na internal medical and performance physiology standpoint. *Medizin Sport* 16:1-12, 1976.
27. **Kirwan JP, Costill DL, Flynn MG e col.** Physiological responses to successive days of intense training in competitive swimmers. *Med. Sci. Sports Exerc.* 20: 255-259, 1988.

- 28. Kosmidou I, Vassilakopoulos T, Xagorari A, Zakynthinos S, Papetropoulos A, Roussos C.** Production of interleukin-6 by skeletal muscle myotubes. Role of reactive oxygen species. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 26: 587-593, 2002.
- 29. Kraemer WJ, Fleck SJ, Callister R e col.** Training responses of plasma  $\beta$ -endorphin, adrenocorticotropin and cortisol. *Med. Sci. Sports Exerc.* 21: 146-153, 1989.
- 30. Kreider R, Fry AC, O'Toole M.** Overtraining in sports: terms, definitions and prevalence. In: *Overtraining in sports*. Champaign, IL, Human Kinetics. pp. vii-ix., 1998.
- 31. Lehmann M, Foster C, Dickhuth H-H, Gastmann U.** Autonomic imbalance hypothesis and overtraining syndrome. *Med. Sci. Sports Exerc.*, Vol 30 (7): 1140-1145, 1998.
- 32. Lehmann M, Foster C, Keul J.** Overtraining in endurance athletes: a brief review. *Med. Sci. Sports Exerc* 25(7):854-862, 1993.
- 33. Liu J, Yeo HC, Overvik-douki E, Hagen T, Doniger SJ, Chu DW, Brooks GA, Ames BN.** Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. *J. Appl Physiol* 89: 21-28, 2000.
- 34. Lo S, Russel JC, Taylor AW.** Determination of glycogen in small tissue samples. *J. Appl. Physiol.* 28(2):234-236, 1970.
- 35. Lund P.** Glutamine: UV-method with glutaminase and glutamate dehydrogenase. In: *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol VIII, Metabolites 3: Lipids, Amino Acids and related Compounds. B. Hu (Ed.) Weinheim: VCF, 1985, p. 357-363.
- 36. McGivan JD, Pastor-Anglada M.** Regulatory and molecular aspects of mammalian amino acid transport. *Biochem. J.* 229: 321-334, 1994.
- 37. Muhlbacher F, Kapadia CR, Colpoys MF, Smith RJ, Wilmore DW.** Effects of glucocorticoids on glutamine metabolism in skeletal muscle. *Am. J. Physiol.*:247:E75-83, 1984.
- 38. Parry-Billings M, Budgett R, Koutedakis Y, Blomstrand E, Brooks S, Williams C, Calder P, Pilling S, Baigrie R, Newshole E.** Plasma amino acid concentrations in the overtraining syndrome: possible effects on the immune system. *Med Sci Sports Exerc* 24(12): 1353-1358, 1992.
- 39. Peake JM, Suzuki K, Coombee JS.** The influence of antioxidant supplementation on markers of inflammation and relationship to oxidative stress after exercise. *J. Nutr. Biochem.* 2006 (*In press*).

40. **Pedersen AMW, Pedersen BK.** The anti-inflammatory effect of exercise. *J. Appl. Physiol.* 98: 1154-1162, 2005.
41. **Pithon-Curi TC, Pires-de-Melo M, De-Azevedo R, Zorn TMT, Curi R.** Glutamine utilization by rat neutrophils. Presence of phosphate-dependent glutaminase. *Am. J. Physiol.* 273:C1124-C1129, 1997.
42. **Powers SK, Criswell D, Lawler J, Ji LL, Martin D, Herb RA, Dudley G** Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 266(2 Pt 2):R375-380, 1994.
43. **Powers SK, Ji LL, Leeuwenburgh C.** Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. *Med Sci Sports Exerc.* 31(7):987-97, 1999.
44. **Putman, C. T., N. L. Jones, E. Hultman, M. G. Hollidge-Horvat, A. Bonen, D. R. McConachie, and G. J. F. Heigenhauser.** Effects of short-term submaximal training in humans on muscle metabolism in exercise. *Am. J. Physiol.* 275 (*Endocrinol. Metab.* 38): E132–E139, 1998.
45. **Rebouche CJ.** Carnitine movement across muscle cell membranes. Studies in isolated rat muscle. *Biochim. Biophys. Acta* 471: 145-155, 1977.
46. **Rowbottom DG, Keast C, Goodman C.** The haematological, biochemical and immunological profile of athletes suffering from the overtraining syndrome. *Eur. J. Appl. Physiol.* 70: 502-509, 1995.
47. **Saltin, B., and P. D. Gollnick.** Skeletal muscle adaptability: significance for metabolism and performance. In: *Handbook of Physiology. Skeletal Muscle*. Bethesda, MD: Am. Physiol. Soc., sect. 10, chapt. 19: 555–631, 1983.
48. **Sen CK.** Oxidants and antioxidants in exercise. *J. Appl. Physiol.* 79:675-686, 1995.
49. **Simmons P, Miles JM, Gerich JE, Haymond MW.** Increased Proteolysis: an effect of increases in plasma cortisol within the physiologic range. *J. Clin. Invest.* 73: 412-420, 1984.
50. **Smith DJ, Norris SR.** Changes in glutamine and glutamate concentrations for tracking training tolerance. *Med. Sci. Sports Exerc* 32(3):684-689, 2000.
51. **Smith LL.** Cytokine hypothesis of overtraining: a physiological adaptation to excessive stress? *Med. Sci. Sports Exerc* 32(2): 317-331, 2000.
52. **Smolka MB, Zoppi CC, Alves AA, Silveira LR, Marangoni S, Pereira-Da-Silva L, Novello JC, Macedo DV** HSP72 as a complementary protection against oxidative stress induced by exercise in the soleus muscle of rats. *Am. J. Physiol.* 279(5): R1539-R1545, 2000.

- 53. Snyder AC, Kuipers H, Cheng B, Servais R, Franssen E.** Overtraining following intensified training with normal muscle glycogen. *Med. Sci. Sports Exerc.* 27 (7): 1063-1070, 1995.
- 54. Snyder AC.** Overtraining and glycogen hypothesis. *Med Sci Sports Exerc* 30:1146-1150, 1998.
- 55. Srere PA.** Citrate synthase. *Methods Enzymol* 13: 3-11, 1969.
- 56. Steensberg A, Fischer CP, Keller C, Moller K, Pedersen BK.** IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10 and cortisol in humans. *Am. J. Physiol.* 285: E433-E437, 2003.
- 57. Tidball JG.** Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am. J. Physiol.* 288: R345-R353, 2005.
- 58. Tiidus PM.** Radical species in inflammation and overtraining. *Can J. Physiol. Pharmacol* 76:533-538, 1998.
- 59. Turinsky J, Gonnerman WA.** Temporal alteration of intracellular  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  and  $\text{PO}_4^{3-}$  in muscle beneath the burn wound. *J. Surg. Res.* 33:337-344, 1982.
- 60. Urhausen A, Gabriel HHW, Kindermann W.** Impaired pituitary hormonal response to exhaustive exercise in overtrained endurance athletes. *Med. Sci. Sports Exerc.* 30: 407-414, 1998.
- 61. Urhausen A, Kindermann W.** Diagnosis of overtraining: what tools do we have?. *Sports Med* 32(2):95-102, 2002.
- 62. Vassault A.** Lactate Dehydrogenase: UV- method with pyruvate and NADH. In: *Methods of Enzymatic Analysis, Vol III, Enzymes 1: oxido reductases.* B. Hu (Ed.) Weinheim: VCH: 118-127, 1983.
- 63. Vassilakopoulos T, Karatza M-H, Katsaounou P, Kollintza A, Zakynthinos S, Roussos C.** Antioxidants attenuate the plasma cytokine response to exercise in humans. *J. Appl. Physiol.* 94: 1025-1032, 2003.
- 64. Zhang Y, Marcillat O, Giulivi C, Ernest L, Davies KJA** The inactivation of mitochondrial electron transport chain components and ATPase. *J Biol Chem* 265:16330-16336, 1990.
- 65. Zoppi CC, Macedo DV.** Overreaching-induced oxidative stress, enhanced HSP72 expression, antioxidant and oxidative enzymes downregulation. *Scand J Med Sci Sports*, 2007 (*In Press*).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta primeira investigação utilizando o modelo de indução de overreaching em ratos levou a proposta que o processo que gera queda de desempenho inicia-se no músculo esquelético de indivíduos que não estariam adaptados a suportar um determinado aumento na carga de treinamento, que estaria associado a um aumento na produção de EROs e efeitos distintos na capacidade de defesa antioxidante. Ou seja, este aumento de cargas pode tanto promover o aumento de desempenho quanto a queda, sendo que esta resposta deve ser individualizada como mostrado nos grupos AD e BD. As recentes descobertas da literatura sobre o efeito anti-inflamatório do exercício sugerem que as alterações observadas nos ratos BD estejam relacionadas com um mecanismo que preserva o tecido muscular de um ataque maior que poderia ser causado por neutrófilos e macrófagos com concomitante redução compulsória da capacidade de trabalho, induzindo ao descanso. Esta e outras hipóteses poderão ser investigadas experimentalmente através do modelo de treinamento e teste de desempenho propostos em detalhes no Capítulo 3.

Parece que o OTS se desenvolve num processo contínuo cujo tempo de manifestação de um estado para outro é dependente do tipo de treinamento e da individualidade biológica. Se continuarmos a definir os estados de overreaching, overtrainig e síndrome do overtraining somente pelo tempo de recuperação (dias, semanas ou meses) estaremos generalizando a manifestação dos estados para todos os indivíduos e protocolos de treinamento. Isto acaba gerando respostas variadas e polêmica na interpretação dos dados, pois estão descontextualizados da sucessão de eventos fisiológicos e metabólicos. Temos que ser objetivos em investigar não apenas o antes e depois das intervenções, mas modelar experimentos que auxiliem no entendimento dos mecanismos metabólicos, mesmo que em animais.

Talvez o estado de overreaching seja o máximo que se pode atingir em animais e mesmo assim apenas quando forçados. Naturalmente, estes ratos jamais teriam chegado ao estado BD por iniciativa própria, pois parece que o ser humano é o único capaz de negligenciar os sinais do corpo, motivado pelas mais diversas razões, forçando-o a atingir um estado mais avançado que pode ser chamado de síndrome do overtraining.

---

### DECLARAÇÃO

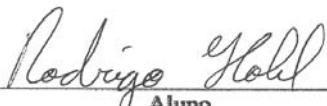
Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação/ tese de mestrado/doutorado intitulada PADRONIZAÇÃO DE UM MODELO DE INDUÇÃO DE OVERREACHING EM RATOS: DESENVOLVIMENTO E PERSPECTIVAS DE INVESTIGAÇÃO EM NATAÇÃO E ESTEIRA

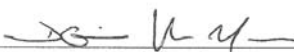
( ) não se enquadra no Artigo 1º, § 3º da Informação CCPG 002/06, referente a bioética e biossegurança.

( ) está inserido no Projeto CiBio (Protocolo nº \_\_\_\_\_), intitulado \_\_\_\_\_

(X) tem autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal (Protocolo nº 638-1).

( ) tem autorização do Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos (?) (Protocolo nº \_\_\_\_\_).

  
\_\_\_\_\_  
Aluno

  
\_\_\_\_\_  
Orientador

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

( ) Deferido ( ) Indeferido

\_\_\_\_\_  
Nome:  
Função: