

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE EDUCAÇÃO FÍSICA**

Renato Buscariolli de Oliveira

**APARATO PARA MEDIÇÃO DE VOLUME CORPORAL DE RATOS:
UMA PROPOSTA METODOLÓGICA**

Campinas
2006

Renato Buscarioli de Oliveira

**APARATO PARA MEDIÇÃO DE VOLUME CORPORAL DE RATOS:
UMA PROPOSTA METODOLÓGICA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Faculdade de Educação Física da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título
de Bacharel em Educação Física.

Orientador: Rodrigo Hohl
Co-Orientador: Dra. Denise Vaz de Macedo

Campinas
2006

Renato Buscariolli de Oliveira

**APARATO PARA MEDIÇÃO DE VOLUME CORPORAL DE RATOS:
UMA PROPOSTA METODOLÓGICA**

Este exemplar corresponde à redação final do Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) defendido por Renato Buscariolli de Oliveira e aprovado pela Comissão julgadora em: 13 / 11 / 2006.

Rodrigo Hohl
Orientador

Helena Coutinho Franco de Oliveira
Banca Avaliadora

Mariângela Gagliardi Caro Salve
Professora da Disciplina

Campinas
2006

Dedicatória

Dedico este trabalho, que simboliza o término de uma fase da vida (conclusão da graduação em uma faculdade) a todos que de alguma forma contribuíram para o seu desenvolvimento. Contudo, como é grande o número de pessoas que estão (estiveram) direta ou indiretamente envolvidas na produção deste (oh, parece até político falando sobre a geração de emprego!) e eu não gostaria de generalizar nem de esquecer ninguém, utilizarei o próximo espaço (agradecimentos) para “resenhar” sobre cada uma delas... Será que vou conseguir?

Agradecimentos

Bom, como é de praxe, começo agradecendo a DEUS, que mais uma vez me deu a oportunidade de poder evoluir neste plano espiritual. Em segundo lugar, agradeço a minha família, meu porto seguro, sem a qual eu não conseguiria atingir nenhum dos meus sonhos. Obrigado pai, obrigado mãe, obrigado Ricardo e obrigado Rogério. Vocês foram e são fundamentais em minha vida. Que nossa união se mantenha sólida pelo resto de nossa jornada. Ah, não posso esquecer de você vovó Leonor, por todos os ensinamentos e carinho que sempre me deu (sem mencionar as comidas “feras” que você faz e aquela viagem “sacanagem” que fizemos para Mongaguá!). Adoro conversar com você: sempre aprendo algo diferente! Obrigado Vovô “Meriquinho” pelo exemplo de vida e perseverança que foi. Muitas das minhas atitudes são baseadas no que o senhor fez. Tenho certeza que olha por nós (será que é você quem apaga as luzes dos postes quando estou andando de noite?). Vovó “Bebel”, obrigado pelo apoio e carinho que você tem dado a nossa família.

Passada a parte familiar, agradeço as pessoas que marcaram a minha infância e adolescência com tal magnitude que me levaram a escolher o curso de Educação Física como profissão, como modo de vida. Se não fossem vocês, eu não estaria aqui. Obrigado Dorival Cieni (grande “Xeine”), meu primeiro professor de futebol. Com muito amor, carinho, sabedoria e dedicação, mostrou que vida é feita de valores e que o futebol é um instrumento fantástico para ensiná-los (até hoje, toda vez que ouço a palavra “burro” sendo pronunciada por alguém, me recordo de um fato ocorrido em seu treino envolvendo este adjetivo!). Contigo conheci o amargo sabor da derrota e o viciante sabor da vitória. Agradeço também ao senhor Hugo Teixeira, que acreditou em mim e me deu a oportunidade de cursar todo o Ensino Fundamental II e o Ensino Médio com bolsa em sua instituição (Instituto de Ensino Sant’Anna): se não fosse por isso talvez eu não estivesse na UNICAMP hoje. Agradeço também ao Diogo Ponzo (“seu Diogo”) que mostrou a mim que nem sempre o conhecimento é o mais importante numa relação professor aluno (ou mesmo técnico e jogador) e que a sinceridade e a honestidade são valores irrefutáveis a um ser humano que se preze.

Bom, agora começam os agradecimentos às pessoas que fizeram parte da minha vida nestes últimos cinco anos de graduação. Começo agradecendo a todo pessoal da padaria, em

especial a Olívia, Osvaldo, Conceição e Cláudio. Vocês são muito “gente fina”! Continuem essas pessoas maravilhosas que são. Com vocês aprendi muito sobre “relações humanas” e convivência. Aprendi que a felicidade depende apenas de nós e que se encontra nos pequenos momentos da vida: no cartão de natal trocado (lembra Olívia?!), nas permutas das folgas para poder jogar bola e ir para o pagode (lembra Osvaldo?!), no rodízio de carne de R\$12,90 (lembra Claudião?!). Sorrir é o melhor remédio para os problemas e dinheiro é uma ilusão. Nestes quatro anos de Baguette Shop, virei padeiro, mas acima de tudo, me tornei um ser humano diferente. Obrigado amigos.

Continuando nestes últimos cinco anos, agradeço à Instituição UNICAMP. Esta que me acolheu me sustentou (foram dois anos de bolsa PIBIC e um semestre de bolsa PAD), me alimentou (foram cinco anos de frequência assídua ao “bandex”, a melhor relação custo benefício que eu já conheci: pode repetir tanto o suco como a mistura!) me deu a oportunidade de evoluir intelectualmente, de conhecer a diversidade cultural e política, enfim: de me tornar um ser humano mais crítico (pelo menos eu acho!). Contudo, o mais importante agradecimento que faço à UNICAMP é o de ter possibilitado conhecer as pessoas que citarei abaixo.

Assim, agradeço ao Grupo Labex (Laboratório de Bioquímica do Exercício) do qual faço parte. Dentro deste, em primeiro lugar, agradeço à “chefe”: Dra. Denise Vaz de Macedo, pelo fato de ter me dado a oportunidade de entrar no “mundo da pesquisa” e poder fazer parte deste grupo maravilhoso, no qual todos têm participação ativa e contribuem para a construção do conhecimento. Admiro muito a sua pessoa, são poucos os que conseguem coordenar e liderar um grupo desta magnitude da forma tão harmônica e eficiente que você o faz. O Labex é o que é hoje graças à sua competência e ao amor para com seus orientandos. Parabéns e muito obrigado!

Em segundo lugar, agradeço ao meu orientador, Rodrigo Hohl. Rodrigão, agradeço sinceramente a oportunidade de ter te conhecido. Você me orientou (e continua orientando) não apenas academicamente, mas para a vida. Com você, mudei algumas “filosofias de vida”, passei a enxergar tudo de um modo diferente. Tenho plena consciência de que muito do que sou hoje, devo a você. Quantos dias passamos enfurnados na “salinha de ratos”, fazendo testes de exaustão e medições de volume, discutindo a respeito de filmes, livros, músicas, fisiologia, treinamento, bioquímica, religião, futebol, mulheres... Como foram proveitosos todos aqueles dias! E aqui estamos hoje, colhendo o fruto materializado de todo nosso trabalho.

Obrigado Rodrigo e sinceramente espero poder continuar sendo “orientado” por você pelo resto de minha vida.

Continuando no grupo Labex, agradeço imensamente ao professor Dr. René Brenzikofer, idealizador deste aparato para medição de volume de ratos. Obrigado pela dedicação e empenho na realização deste trabalho e pelas incansáveis tentativas de me ensinar matemática, estatística e como usar o Mat Lab. Eu imagino como deve ser difícil para o senhor (dada a minha dificuldade na área de exatas).

Bom, agora agradeço aos parceiros do Labex: vocês são “os caras”! Valeu “molequinhos” por tudo que passamos juntos! Assim: obrigado Thiago (o “cara” do VO_2 max, dos passes de ônibus e grande amigo: admiro muito a sua “garra”), Danilão (o “cara” do processo inflamatório e das planilhas de treino), Rubinho (o “cara” da esteira de ratos e grande companheiro), Paulão (o “basqueteiro” mais crítico e com os gostos mais estranhos que já conheci: você é fera “molequinho!”), Lazarão (o “cara” das análises clínicas e amigo de todos do Labex), Lucão (o “cara” dos eletrodos e grande empreendedor), Marião (o “cara” dos *softwares* educacionais e de boas conversas sobre a vida), Micheli (a “mina” das trocas de livros e dicas de eventos culturais: Mimi, vc é muito “gente boa”, não tem quem não goste de você!), Charles, Bernardo, Clodoaldo, Duda, Carol, Mirtes, Fernanda, Madla, Rejane, Dalila e Armindo (o “cara” da química e a pessoa mais humilde e prestativa que conheço).

Quero usar este parágrafo para realizar um agradecimento especial a dois grandes amigos que fiz na Faculdade: Fernando Catanho e Gustavo Barbosa (vulgos Fernandão e Gustavão). Parceiros, muito obrigado por tudo que já passamos e que ainda haveremos de passar juntos. Espero que possamos resenhar e rir muitas e muitas vezes ainda. Já estou sentindo falta das nossas discussões sobre treinamento, bioquímica, fisiologia e relacionamentos... Com vocês conheci a essência da amizade verdadeira, aquela em que o companheiro não apenas auxilia e consola nos momentos de dificuldade, mas que sinceramente fica feliz e vibra pelo sucesso e conquistas do outro. Obrigado amigos e que assim permaneçamos pelo resto de nossas vidas, independente do que aconteça conosco.

Por fim, gostaria de mencionar e agradecer aqui algumas pessoas ilustres, se assim posso denominar: João Paulo (o maior parceiro que já tive para armar “esquemas” e “pegadas”...É “boleirão”, quantas “minas” já não “fizemos amizade” juntos nos pagodes da vida...Saudades de você moleque!), Muca (o “negão” mais “estiloso” e “boleirão” que conheço:

você é muito “gente boa” parceiro!), Anísio (a pessoa que mais conhece gente aqui na UNICAMP: espero que muitas pessoas possam ter a oportunidade de conhecer você e o “Taiguara” e percebam como é simples viver a vida), Joyce (a pessoa mais sincera que conheci, adoro conversar com você: força amiga, o que o destino lhe pregou, servirá para sua evolução neste plano), Mion (também conhecido como Rafael Moraes, o cara mais palhaço e engraçado que conheço: gosto de você parceiro!), Cidão (também conhecido como Marcelo Felipe, grande amigo e companheiro: gosto da sua simplicidade e admiro sua inteligência, com certeza, aqueles que te chamam de louco hoje, um dia irão entender suas idéias!), Varginha (vulgo Rafael Reis, amigo recente que prometeu que no ano que vem vai me ensinar a dançar!), Giba (o japonês mais brasileiro que conheço), Fernanda Aguirre (grande amiga e confidente) e Gustavo Havaiana (fundador e capitão do “Ludens”).

Bom, acho que terminei a parte de agradecimentos (que sinceramente foi o trecho mais empolgante deste trabalho!). Espero não ter esquecido de ninguém. Agora gostaria de finalizar esta parte com o refrão da música “O que é O que é” eternizada na voz de Gonzaguinha. Esta música muito me emociona e sempre que me encontro triste por algum motivo, ouço e relembro que a felicidade não está no mundo em que você vive e sim no mundo que você é:

“Viver...E não ter a vergonha de ser feliz.
Cantar e cantar e cantar a beleza de ser um eterno aprendiz.
Eu sei, que a vida poderia ser bem melhor e será
Mas isso não impede que eu repita:
É Bonita, é bonita e é bonita!”

Gonzaguinha

BUSCARIOLLI, Renato. **Aparato para medição de volume corporal de ratos: Uma proposta metodológica**. 2006. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) Faculdade de Educação Física. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2006.

RESUMO

Neste presente trabalho, apresentamos um sistema de vasos comunicantes para medir o volume corporal de ratos vivos através de um sistema de detecção do nível d'água por pesagem hidrostática. A reprodutibilidade, acurácia, linearidade e confiabilidade do aparato foram avaliadas em dois diferentes testes: utilizando-se volumes de água previamente pesados ou seis cilindros de alumínio de volumes conhecidos. Ambos os testes foram realizados após uma calibração prévia. A aplicabilidade do aparato para medir animais vivos (ratos *Wistar*) foi testada em um experimento transversal com cinco ratos, anestesiados e não-anestesiados. Foram realizadas 18 medições de volume em cada situação (anestesiado e não-anestesiado) totalizando 90 medições. A adição de volumes d'água (50-700ml) gerou uma equação de regressão com coeficiente angular de 1.0006 ± 0.0017 , coeficiente linear de 0.75 ± 0.81 ($R^2=0.99999$; $SEE=0.58\text{ml}$) e oscilação em torno de 1ml. As diferenças entre os volumes reais dos cilindros de alumínio e os volumes medidos pelo sistema foram menores do que 0.4ml. Os erros médios de volume ficaram entre 0.01% e 0.07%. Em relação aos animais vivos, a média \pm DP das diferenças obtidas entre os animais anestesiados e não anestesiados foi de $0.31\text{ml} \pm 2.34\text{ml}$ (n=90). Estes dados mostram que a movimentação do animal não interfere na medição do volume pelo aparato proposto e que nem anestesia e nem raspagem dos pêlos são necessários para este procedimento. Contudo, cuidados devem ser tomados para eliminação das bolhas de ar presas tanto no aparato como nos pêlos dos animais. O aparato proposto para medição do volume corporal de ratos (AMV) é barato e pode ser utilizado para diversos fins científicos.

Palavras-Chaves: Volume; Densidade; Rato; Ratos vivos; Pesagem hidrostática.

BUSCARIOLLI, Renato. **Apparatus for measuring rat body volume: A methodological proposition.** 2006. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) Faculdade de Educação Física. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2006.

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 ± 0.0017 , intercept of 0.75 ± 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.

Keywords: Volume; Density; Rat; Alive rat; Hydrostatic weighing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Aparato para medição do volume corporal de ratos (AMV).....	20
Figura 2 -	Foto do rato sendo medido pelo AMV.....	25
Figura 3 -	Calibração do Aparato com volumes fixos de água.....	27
Figura 4 -	Diferença entre o volume de água medido pelo AMV e o volume pesado (padrão)...	28
Figura 5 -	Histograma dos volumes medidos do rato 1 a partir de uma calibração prévia.....	30
Figura 6 -	Histograma das diferenças de volume entre os ratos anestesiados e não anestesiados	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Funções, dimensões e especificações dos principais componentes do AMV	21
Tabela 2 -	Idade e massa dos ratos utilizados na análise transversal.....	24
Tabela 3 -	Volume real e volume médio dos seis cilindros de alumínio mensurados no AMV através de 13 calibrações ao longo de 5 meses.....	29
Tabela 4 -	Volume e densidade dos animais utilizados na análise transversal.....	29
Tabela 5 -	Referências de densidades de mamíferos.....	33

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Implicações entre Estímulo VS. Período Regenerativo.....	14
1.2 Aplicabilidade de Exercícios de Natação em Ratos e Testes de Desempenho.....	16
1.3 Aferição de Volume Corporal.....	17
2 MATERIAIS E MÉTODOS	20
2.1 Aparato para medição do volume corporal de ratos (AMV).....	20
2.2 Protocolo de Montagem do AMV.....	22
2.3 Determinação do Volume.....	22
2.4 Calibração do AMV.....	23
2.5 Testes do AMV com água e objetos inanimados.....	23
2.6 Avaliação transversal do volume de animais anestesiados e não anestesiados.....	24
2.7 Análise Estatística.....	26
3 RESULTADOS	27
3.1 Comportamento do AMV na medição de volumes inanimados.....	27
3.2 Comportamento do AMV medindo modelos animais.....	29
4 DISCUSSÃO	32
AGRADECIMENTOS	35
REFERÊNCIAS	36
ANEXOS 1	42
ANEXOS 2	43

1 Introdução

1.1 IMPLICAÇÕES ENTRE ESTÍMULO VS. PERÍODO REGENERATIVO

A modulação da intensidade, duração e frequência de esforço físico durante as sessões de treino têm o objetivo de aumentar o rendimento em capacidades motoras diversas, que diferem em ordem de prioridade, dependendo da especificidade do trabalho muscular realizado (BOMPA, 2001). O princípio da sobrecarga é um dos princípios do treinamento necessários para a adaptação do organismo. Do ponto de vista metabólico e fisiológico, sobrecarga significa que o exercício realizado deve constituir-se num estímulo estressor suficiente para provocar distúrbios agudos relacionados à fadiga nas células, órgãos e estruturas envolvidas com o movimento.

É importante ressaltar que as respostas adaptativas positivas que esperamos que aconteçam nessas estruturas, e que envolvem processo inflamatório, responsável pelo reparo e regeneração dos tecidos, aumentos nas concentrações de reservas intramusculares de ATP, aumentos nas atividades de enzimas-chave do metabolismo e síntese de novas proteínas acontecem durante o período de descanso. Quando este período é adequado, a resposta adaptativa leva à condição conhecida como *supercompensação*. Nesse momento, a aplicação de novo estímulo conta com um melhor suprimento energético se os exercícios necessitarem de maior mobilização metabólica ou, ao contrário, induz economia de energia em atividades físicas que já eram habituais (FRY et al., 1992; BRUIN et al., 1994). Assim, a aplicação do princípio da sobrecarga induz fadiga reversível (*fadiga aguda de treinamento*) e a *supercompensação* ocorre com alguns dias de um período de carga de treinamento reduzida ou de descanso (também chamado de micro-ciclo regenerativo).

Overtraining é um termo geral, que indica um desequilíbrio entre cargas de esforço físico e período regenerativo, no sentido de aumentos no primeiro, resultando num estado de fadiga severa e constante (KUIPERS, KEIZER, 1998; STONE et al., 1991). Esse aumento no nível de estresse impossibilita a manutenção da *performance* num nível ótimo, mesmo após um período de recuperação maior (PLATEN, 2002). A literatura denomina o *overtraining* de curta-duração de *overreaching*. Os sintomas do *overreaching* podem ser supostamente revertidos por

um período regenerativo mais longo que o normal (FRY et al., 1992; KUIPERS, 1998; PETIBOIS, 2003; HALSON, JEUKENDRUP, 2004).

O principal problema é que a transição entre fadiga aguda de treinamento, *overtraining* de curta-duração e *overtraining* de longa-duração é desconhecida, e pode, ou não, levar à instalação da síndrome do *overtraining*, um estado de fadiga prolongado, com um nível de *performance* cronicamente diminuído que pode estar associado com um estado catabólico acentuado, sintomas relacionados a alterações fisiológicas, com o processamento de informações psicológicas, alterações imunológicas, bioquímicas e aumento na susceptibilidade a lesões (FRY et al., 1992; TIIDUS, 1998; LEHMAN et al., 1998). Como podemos observar, os sintomas do *overtraining* podem ser muito variados, mas uma vez o fenômeno instalado, a única forma de tratamento é o repouso, sendo que a recuperação é bastante lenta, podendo levar semanas ou meses (PETIBOIS, 2003; SMITH, 2004).

Pelo exposto acima, fica evidente que um dos grandes desafios dos profissionais da área do esporte é compreender melhor as relações entre quantidade ótima de treinamento e os fatores que influenciam a recuperação, para uma modulação correta das cargas de esforço físico, tendo em vista o papel do esporte de rendimento no mundo globalizado. Existem vários grupos de pesquisa estudando esse assunto, mas o único consenso é que a perda de *performance*, a despeito da diminuição ou manutenção das cargas de esforço é necessária para o diagnóstico (SMITH, 2000).

O monitoramento do treinamento através de biomarcadores sanguíneos poderia indicar esse *continuum* entre fadiga aguda de treinamento/*overreaching*/ *overtraining*, mas não há ainda um consenso sobre a confiabilidade das várias análises propostas na literatura. Em nossa opinião, um dos fatores de dificuldade para a análise das respostas da musculatura e sua associação com parâmetros sanguíneos que contribuísse para o diagnóstico de *overtraining*, é ainda não haver um protocolo de exercícios descrito para modelos animais que leve claramente a esse *continuum*. Conseqüentemente, é também importante que se desenvolvam testes de *performance* precisos para ser aplicado em modelos animais submetidos à natação como modelo de exercício, já que esta permite a aplicação de intensidades maiores que os modelos que utilizam corrida em esteira rolante.

1.2 APLICABILIDADE DE EXERCÍCIOS DE NATAÇÃO EM RATOS E TESTES DE DESEMPENHO.

A utilização de protocolos de treinamento e testes de desempenho com ratos no meio aquático vem sendo empregada há muito tempo no meio científico, como parâmetro tanto de avaliação da capacidade física quanto do estresse/adaptação advindos do exercício (McARDLE, MONTOYE, 1966; MATSUMOTO et al.,1996). O primeiro teste de desempenho em natação com ratos foi realizado por HARRIS, INGLE (1940) em estudo com ratos adrenalectomizados.

O teste até a exaustão é o mais empregado para determinar adaptação dos animais aos mais variados tipos de exercícios e tratamentos. Baseia-se no pressuposto que o animal melhor adaptado nada por um período de tempo maior, antes de atingir a exaustão (McARDLE, MONTOYE, 1966). Na quase totalidade dos estudos o controle da intensidade do esforço é feito pela adição de pesos de chumbo relacionados a um determinado percentual da massa corporal dos animais, presos ao rabo ou ao redor do tórax. Isso possibilita uma sobrecarga maior, e com isso, uma diminuição no tempo de exaustão.

Esse teste parte do pressuposto de que o animal mais pesado (de maior massa corporal) suporta cargas maiores, uma vez que a porcentagem da massa corporal escolhida é fixa para todos os animais, independente do peso de cada um. No entanto, o ganho de massa corporal não é proporcional ao aumento na capacidade de manutenção de cargas (McARDLE, MONTOYE, 1966; NAITO, GRIFFITH, 1977), sendo esse dado inerente também aos humanos (KEY, 1962). Além disso, a aplicação de pesos de chumbo de acordo com um determinado percentual da massa corporal não leva em consideração o efeito da flutuação (empuxo) exercida quando submergimos um corpo em meio líquido, conforme previsto pelo Princípio de Arquimedes: $E = d \times V \times g$, onde “d” é a densidade do líquido, “V” o volume do corpo imerso no líquido e “g” é a aceleração da gravidade. Ou seja, o volume do animal também deveria ser considerado na determinação das cargas aplicadas.

Reforçando essa proposta, resultados preliminares obtidos no nosso laboratório (Labex- Laboratório de Bioquímica do Exercício) mostraram que com o incremento de cargas baseado no percentual da massa corporal, a habilidade de ratos sedentários em suportar cargas crescentes era inversamente proporcional à massa de cada animal. Ou seja, os ratos mais leves (mais novos) nadavam mais tempo até atingirem a exaustão enquanto que os mais pesados (mais

velhos) entravam em fadiga mais rapidamente, além de exibir maior dificuldade na execução do esforço com o mesmo percentual de carga.

Há algum tempo McARDLE, MONTOYE (1966) e NAITO, GRIFFITH (1977) já sugeriam uma reavaliação da metodologia empregada para a aplicação de pesos, pois como os animais possuem peso corporal variado, as cargas acabariam não sendo ajustadas de maneira igualitária. No entanto, esses fatos tem sido seguidamente ignorados, e a quase totalidade dos estudos continua utilizando a metodologia de aplicação de cargas baseadas em um determinado percentual do peso corporal para determinar a *performance* de animais após diferentes protocolos de treinamento em natação (GOBATTO et al., 2001; TERADA et al., 2001; BRAGA et al., 2004).

Assim, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver um sistema confiável e reprodutível para aferir o volume dos animais, para poder utilizar como parâmetro de carga não a massa corporal, mas a capacidade de flutuação de cada animal (peso aparente), considerando para isso o empuxo e o peso da cada rato como referência para aplicação das cargas. Essa conduta é fundamental, pois os testes de desempenho para avaliação do protocolo de exercícios proposto no projeto do grupo de pesquisa serão realizados em meio líquido, onde o empuxo é uma força existente.

1.3 AFERIÇÃO DE VOLUME CORPORAL

A densidade ou gravidade específica corporal é um parâmetro biológico determinado pela razão entre massa e volume corporal. A determinação da densidade é importante para avaliação de mudanças morfológicas provocadas pela idade (MYHRE, KESSLER, 1966), uso de drogas (ROGERS, WEBB, 1980; STONE et al., 1978), diferentes dietas (DAHMS, GLASS, 1972; KRAYBILL et al., 1952; SCHEER et al., 1947) ou treinamento (STONE et al., 1978) porque ela tem correlação inversa com a porcentagem de gordura corporal em humanos (BEHNKE et al., 1942) e animais (DAHMS, GLASS, 1972). Além disso, a determinação da densidade pode ser de fundamental importância na aplicação de testes de exaustão em ratos submetidos à natação (DAWSON, HORVATH, 1970; HARDIN, 1968; McARDLE, MONTOYE, 1966; NAITO, GRIFFITH, 1977; SCHEER et al., 1947) uma vez que o volume e a massa corporal dos animais interferem na flutuabilidade dos animais na água. De

fato, em 1947, SCHEER et al., mostrou que a reprodutibilidade dos testes de *performance* foi significativamente maior quando os animais tiveram suas densidades homogeneizadas antes dos testes. Contudo, a padronização da intensidade de esforço em ratos submetidos a testes de exaustão na natação ainda se dá pela adição de cargas equivalentes a uma determinada porcentagem da massa corporal ao invés de se utilizar o volume do animal (i.e. densidade) (BRAGA et al., 2004; GOBATTO et al., 2001; RAJA et al., 2003; TERADA et al., 2001).

Outros estudos no desenvolvimento e validação de métodos para medição de volume em humanos e pequenos animais datam do início do século XX e abrangem métodos que incluem deslocamento de ar, hélio-diluição e pesagem hidrostática (BEHNKE et al., 1942; BOHNENKAMP, SCHMAH, 1931; DAHMS, GLASS, 1972; GNAEDINGER, 1962; JONGBLOED, NOYONS, 1938; KODAMA, 1971; KRAYBILL et al., 1952; RATHBUN, PACE, 1945; STERN, 1901; WALSER, STEIN, 1953; WEDGEWOOD et al., 1953).

O método de deslocamento de ar consiste do esvaziamento parcial de uma câmara padrão conectada a outra câmara de volume conhecido que contém o corpo a ser medido. Após conectar as duas câmaras, a pressão se equilibra e o volume corporal é calculado através dos dados de temperatura e pressão obtidos em ambas as câmaras (GNAEDINGER, 1962; HIX et al., 1964; KODAMA, PACE, 1963). De acordo com HIX et al. (1964) as possíveis fontes de erro neste método são mudanças de temperatura e da umidade do ar, e baixa precisão dos sensores de pressão. Recentemente, um pletismógrafo de deslocamento de ar (BOD POD), que não necessita de condições isotérmicas para realização das medições – uma vez que o ar no interior das câmaras se expande e se comprime adiabaticamente – está comercialmente disponível para medição de volume corporal em humanos (DEMPSTER, AITKENS, 1995; FIELDS et al., 2002; McCRORY et al., 1995).

O método de hélio-diluição é executado em uma câmara de volume conhecido com um volume fixo de hélio (GNAEDINGER, 1962; HIX et al., 1964; SIRI, 1955; WALSER, STEIN, 1953). O volume desconhecido de um corpo é determinado por uma célula de condutância usada para análise da concentração de hélio (HIX et al., 1964) ou pelo princípio da diluição dos gases (WALSER, STEIN, 1953). No primeiro caso, a determinação do volume pela célula de condutância é afetada pela umidade do ar e CO₂, uma vez que a célula é sensível a ambas as variáveis (HIX et al., 1964). Temperatura, absorção de hélio pelo corpo e mistura incompleta do gás interferem na determinação do volume no outro método (WALSER, STEIN, 1953).

A pesagem hidrostática tem sido a metodologia mais utilizada para determinação de volume em animais. Esta técnica, baseada no princípio de Arquimedes, compara o peso obtido no ar ao peso aparente obtido em um líquido de densidade conhecida. A principal dificuldade na utilização deste procedimento é a movimentação dos animais durante a medição. Na tentativa de resolução desta problemática, a maioria dos estudos utiliza animais anestesiados (KODAMA, 1971; STONE et al., 1978) ou mortos (DAHMS, GLASS, 1982; RATHBUN, PACE, 1945; ROGERS, WEBB, 1980). A raspagem dos pêlos também é usada para diminuir o aparecimento das bolhas de ar presas aos pêlos (DAHMS, GLASS, 1982; KRAYBILL et al., 1952; RATHBUN, PACE, 1945). Contudo, estes procedimentos não são aplicáveis em estudos longitudinais que avaliam a densidade individualizada de animais vivos submetidos a condições específicas de treinamento ou nutricional por várias semanas.

Este estudo apresenta um aparato fácil de ser construído para medição de volume corporal em animais de pequeno porte, que pode medir de maneira acurada e reproduzível o volume corporal de ratos vivos sem anestesia e nem raspagem dos pêlos.

2 MATERIAIS e MÉTODOS

2.1 APARATO PARA MEDIÇÃO DO VOLUME CORPORAL DE RATOS (AMV)

O aparato para medição do volume corporal de ratos (AMV) está mostrado na Figura 1.

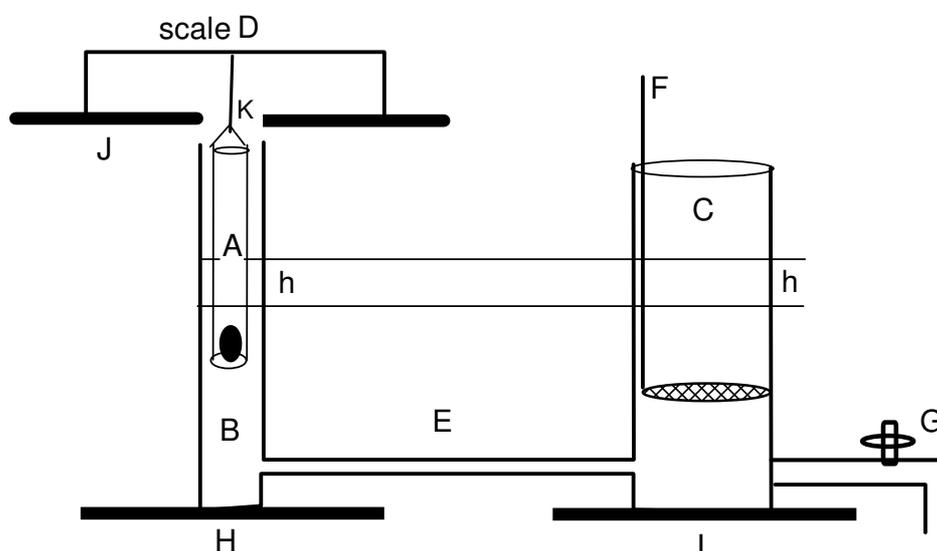


Figura 1 - APARATO PARA MEDIÇÃO DO VOLUME CORPORAL DE RATOS (AMV). [A] Proveta com chumbo dentro; [B] Vaso de Medida; [C] Vaso de vidro para submersão dos animais; [D] Balança digital; [E] Mangueira flexível para conexão dos vasos; [F] Tela para retenção das fezes; [G] Torneira; [K] Haste de ferro; [H, I, J] Suportes de ferro que fixam o sistema; [h] Variação do nível da água antes e depois da introdução do animal no sistema.

O sistema consiste em dois vasos comunicantes cilíndricos ligados por uma mangueira flexível. O rato é colocado em um vaso [C] e as alterações do nível da água são medidas através da pesagem hidrostática de uma proveta com chumbo dentro [A] localizada no outro vaso [B]. A mangueira de conexão dos vasos foi dimensionada para atenuar a transmissão das oscilações causadas pela movimentação dos animais e as paredes grossas impedem que o seu volume interno se altere com a pressão. O AMV é simples e desmontável. Cuidados devem ser

tomados para que os suportes [H, I, J] estejam fixos e a balança fique protegida contra a circulação de ar. Vidro ou outro material transparente deve ser utilizado no vaso [C] para que o animal seja melhor visualizado e a medição facilitada. Para aumentar a linearidade do sistema, as porções que são suscetíveis a serem molhadas quando o nível da água sobe, devem ser cilíndricas. As características dos principais componentes do AMV estão descritas na Tabela 1.

TABELA 1
Funções, Dimensões e Especificações dos Principais Componentes Do AMV

Descrição do Componente	Função	Comp.(mm)	Diâmetro(mm)
A – Proveta com chumbo	Mede o nível da água	230	29.7
B - Vaso 2	Vaso comunicante no qual localiza-se a proveta com chumbo	510	47.5
C - Vaso 3	Vaso comunicante no qual o animal é inserido	330	68
D - Balança	Pesagem Hidrostática	*	-
E – Mangueira flexível	Conecta os vasos comunicantes	1250	8
F – Tela de retenção	Suporte do animal / Retenção das fezes	-	-
K – Haste de ferro	Conecta a proveta ao prato da balança	200	-

*Especificações da Balança: capacidade mínima = 0.50g, capacidade máxima = 1010g, sensibilidade = 0.01g, função de pesagem hidrostática

2.2 PROTOCOLO DE MONTAGEM DO AMV

1. Conexão entre os dois vasos [B e C] através da mangueira [E];
2. Adição de água (1.7 L) no sistema de vasos comunicantes; retirada das bolhas de ar do interior da mangueira [E] e dos vasos [B e C] através de movimentação (inclinando e balançando) do sistema e fluxo de água (250ml) pela torneira [G];
3. Pedurar a proveta com chumbo dentro [A] na balança [D] através de uma haste [K] e centralização no interior do vaso [B];
4. Adição de água no vaso [C] até atingir o fundo da proveta [A] no interior do vaso [B] e ser sinalizado pela balança [D];
5. Adição de água (150ml) no vaso [C] até que o nível da água ultrapasse a porção abaulada da proveta e atinja sua porção cilíndrica;
6. Taragem da balança [D] antes do início da calibração.

2.3 DETERMINAÇÃO DO VOLUME

A introdução do animal no interior do vaso [C] aumenta o nível da água [h] no sistema. Simulações nas quais os volumes medidos eram relacionados com as dimensões dos componentes otimizaram a sensibilidade do aparato. O volume do rato (V_{rato}) está relacionado a variações de volume “ ΔV_B ” e “ ΔV_C ” dos vasos [B] e [C], respectivamente:

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

Onde “ ΔV_A ” e “ ΔV_F ” são as variações de volume ocupados pela proveta [A] e pelo cabo da tela de retenção das fezes [F], respectivamente.

O aumento no nível da água [h] em torno da proveta [A] de diâmetro “ d_a ”, causa uma variação na leitura da balança (M_{bal}) de:

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

onde “ $D_{\text{água}}$ ” indica a densidade da água (1g/ml).

Assim, o volume do rato é diretamente proporcional à variação mostrada na balança:

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

Nesta equação, “ d_B ” e “ d_C ” representam os diâmetros internos dos vasos [B] e [C], “ d_A ” é o diâmetro externo da proveta [A] e “ d_F ” é o diâmetro do cabo da tela de retenção das fezes [F].

Desta maneira, M_{bal} varia de acordo com o volume do objeto inserido no sistema. Se os componentes [A, B, C e F] são cilíndricos na faixa onde ocorre variação do nível da água, V_{rato} não depende do nível inicial da água no momento da taragem da balança. Na prática, a medida do volume depende apenas do valor fornecido pela balança (M_{bal}) e da calibração prévia realizada após o protocolo de montagem.

2.4 CALIBRAÇÃO DO AMV

O objetivo da calibração é quantificar uma reta que relaciona o volume do corpo a ser medido ao valor fornecido pela balança. Um método de calibração prático e preciso foi desenvolvido utilizando-se seis cilindros de alumínio (cerca de 5cm de diâmetro x 5cm altura) medidos cuidadosamente com um paquímetro para determinação do volume individual. A calibração constitui na introdução consecutiva dos cilindros no vaso [C] com cuidados para eliminar eventuais bolhas de ar. Após a introdução de cada peça, esperava-se a estabilização do

sistema (aproximadamente 20s) e registrava-se o valor fornecido pela balança. Este procedimento foi adotado até que a última peça fosse introduzida. Os valores fornecidos pela balança correspondiam a soma de cada uma das peças e uma regressão linear foi aplicada a estes dados para determinação da reta de calibração. Treze calibrações deste tipo foram realizadas ao longo de cinco meses. Vale ressaltar que a calibração deve ser realizada quando a parede externa da proveta estiver molhada. Assim, sugerimos que as peças de alumínio sejam inseridas todas de uma única vez antes do início da calibração.

2.5 TESTES DO AMV COM ÁGUA E OBJETOS INANIMADOS

O AMV e suas respectivas calibrações foram avaliadas em concordância, linearidade e acurácia. Como não existem animais com volumes precisamente conhecidos, volumes padrão de água quantificados por pesagem prévia (50.00 ± 0.05 ml) foram consecutivamente acrescentados no vaso [C]. Os valores obtidos na balança foram registrados e a equação de calibração (obtida com os cilindros de alumínio) foi aplicada para avaliar os volumes medidos de água.

Ainda avaliamos a habilidade do AMV para determinar com acurácia e reprodutibilidade o volume conhecido de objetos inanimados. Utilizou-se cada uma das treze retas de calibração para determinar o volume dos seis cilindros de alumínio ao longo de cinco meses.

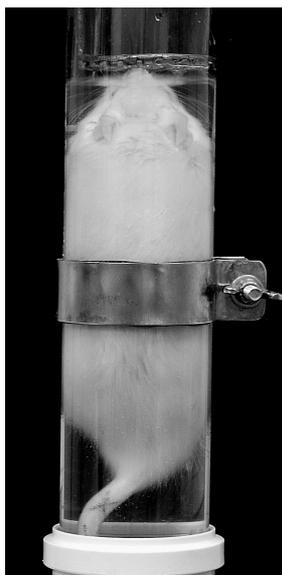
2.6 AVALIAÇÃO TRANSVERSAL DO VOLUME DE ANIMAIS ANESTESIADOS E NÃO ANESTESIADOS

Os protocolos experimentais com animais foram previamente submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (638-1) conforme anexo 1. Para testarmos a reprodutibilidade das medidas de volume em animais vivos, cinco ratos *Wistar* machos de diferentes tamanhos e idades (Tabela 2) foram utilizados em um experimento transversal. Cada animal foi introduzido seis vezes no sistema, tanto anestesiado como não anestesiado. Os experimentos foram realizados em dias distintos, sempre no mesmo horário. Foi utilizado um rato por dia sendo que o sistema foi previamente calibrado com as peças de alumínio.

Tabela 2 - Idade e Massa dos Ratos Utilizados na Análise Transversal

Rato	Idade (dias)	Massa (g)
1	58	297.87
2	84	343.59
3	120	420.07
4	105	373.59
5	107	375.02

Primeiramente o rato não anestesiado foi introduzido no vaso [C]. As medidas foram feitas somente após o animal estar calmo e adaptado à água ($35 \pm 1^\circ\text{C}$) e as condições do vaso. O rato foi mantido praticamente submerso por uma tela – semelhante à usada para contenção das vezes [F] – sendo que somente seu focinho não estava submerso de modo que pudesse respirar (Figura 2). Três determinações de volume foram realizadas cada vez que um animal era introduzido no sistema. Cada determinação de volume correspondeu a média de 20 medidas tomadas durante 30s e calculada automaticamente por um software embutido na balança. Como os ratos foram introduzidos no AMV seis vezes, 18 medidas foram realizadas com cada rato. Assim, um total de 90 determinações de volume foram realizadas sendo que cada uma durou cerca de 3 minutos. Após cada pesagem, o animal era secado com uma toalha e um secador. Antes de reintroduzi-lo no aparato, o volume de água retirado do sistema carregado junto aos pêlos, era repostado. A balança era então tarada.

**Figura 2 - Rato sendo medido pelo AMV.**

O mesmo procedimento foi realizado quando os animais foram anestesiados por tiopental sódico (40 mg/kg peso corporal) intraperitoneal. Cada rato era introduzido no vaso com ajuda de uma haste. Foi amarrado fio dental ao dente incisivo do animal com o intuito de manter seu focinho sobre a superfície da água e assegurar sua respiração durante a aferição. Os animais foram agitados com uma haste introduzida na água que passava entre o rato e as paredes do vaso, de maneira que as bolhas de ar presas nos pêlos pudessem ser liberadas.

Para avaliar a interferência das bolhas de ar presas nos pêlos dos animais anestesiados no volume, medidas complementares de volume foram realizadas com um animal (Rato 1). Seis sessões de pesagem foram conduzidas, cada uma delas com três medidas realizadas antes e três realizadas depois do animal ter sido agitado por uma haste, resultando em 18 medições em cada situação. Em todos os casos, o volume do animal foi obtido aplicando-se o valor obtido na balança na reta de calibração realizada previamente.

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para comparar o volume medido com os padrões, dois tipos de análise foram realizadas. Uma regressão linear entre as duas variáveis relacionou a linha de identidade com o teste de concordância dos resultados. Para mostrar as oscilações dos volumes medidos das peças inanimadas, a análise proposta por BLAND, ALTMAN (1986) foi realizada, o que também permitiu a avaliação da precisão e acurácia da metodologia. Análise paramétrica ANOVA para grupos independentes foi utilizada para avaliar o rato 1 anestesiado ou não, com ou sem agitação. O nível de significância considerado foi $p < 0.05$.

3 RESULTADOS

3.1 COMPORTAMENTO DO AMV NA MEDIÇÃO DE VOLUMES INANIMADOS

Uma regressão linear típica entre os volumes dos cilindros de alumínio e os valores mostrados na balança resultaram em uma reta de calibração com coeficiente angular de $6.87 \pm 0.04 \text{ ml/g}$ e coeficiente linear de $1.70 \pm 2.1 \text{ ml}$ ($R^2=0.99998$ and $\text{SEE}=0.22 \text{ ml}$). Estas calibrações foram realizadas 13 vezes ao longo de 5 meses e uma equação de reta de ajuste foi calculada para cada calibração.

A comparação entre as medidas de volume de água pelo AMV (utilizando uma calibração prévia com cilindros de alumínio) e por pesagem mostra linearidade e concordância. A regressão linear mostra um coeficiente angular de 1.0006 ± 0.0017 , coeficiente linear de 0.75 ± 0.81 , $R^2=0.99999$ e $\text{SEE}=0.58 \text{ ml}$. A Figura 3 ilustra o experimento com volumes fixos de água.

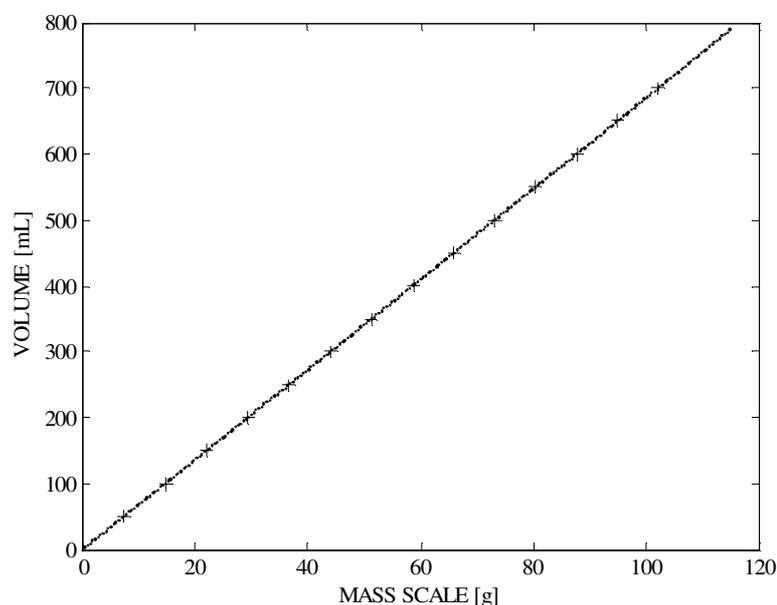


Figura 3 - Calibração do Aparato com volumes fixos de água. Eixo Y: volumes de água ($50,00 \pm 0,05 \text{ ml}$) inseridos no aparato. Eixo X: valores mostrados na balança respectivos aos volumes fixos de água.

A diferença entre os volumes pesados e os mensurados pelo AMV está plotada na análise de BLAND, ALTMAN, 1986 (Figura 4). As diferenças entre os volumes mostram uma média 0.996ml e um desvio padrão de 0.584ml com oscilações de aproximadamente 1ml. Além da linha que representa a diferença média, a Figura 4 inclui os limites experimentais observados equivalentes a $\pm 2DP$ das diferenças entre os volumes. Expressos em percentual do volume medido, os valores para $média \pm 2DP$ são $0.262\% \pm 0.266\%$.

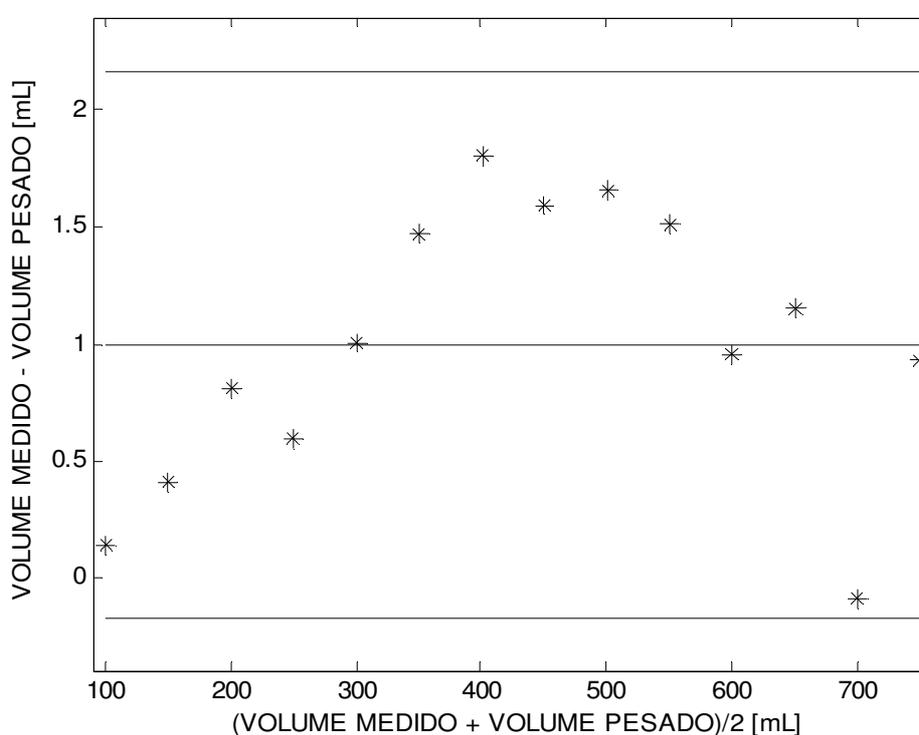


Figura 4 - Diferença entre o volume de água medido pelo AMV e o volume pesado (padrão) comparados pela média em ambas as medidas. As linhas representam a diferença média $\pm 2DP$.

A Tabela 3 mostra os volumes reais dos seis cilindros e a $média \pm 2DP$ dos 13 volumes de cada cilindro medidos pelo AMV ao longo de 5 meses. A diferença entre o volume real e o volume medido pelo AMV é menor do que 0.4ml. Os erros médios de volume expressos em porcentagem, variaram entre 0.01% e 0.07% exceto para o cilindro 1 (0.36%), mostrando boa acurácia do sistema.

A confiabilidade das medidas também foi boa. O coeficiente de variação ($2DP$ Volume AMV/ Volume Real) deu $média \pm DP$ de $0.16\% \pm 0.14\%$.

Tabela 3 - Volume Real e Volume Médio dos Seis Cilindros de Alumínio Mensurados no AMV Através de 13 Calibrações ao Longo de 5 Meses

Volume Real (ml)	Volume AMV±2DP (ml)	Dif. (ml)	Erro Médio	CV2DP
107.76	108.148 ± 0.461	0.388	0.0036	0.0043
215.56	215.620 ± 0.456	0.0602	0.0003	0.0021
323.26	323.198 ± 0.321	-0.0619	-0.0002	0.001
430.56	430.273 ± 0.326	-0.2872	-0.0007	0.0008
538.15	538.230 ± 0.465	0.0795	0.0001	0.0009
645.81	645.881 ± 0.326	0.0705	0.0001	0.0005

Dif = Volume AMV – Volume Real;

Erro Médio = (Volume AMV – Volume Real)/ Volume Real;

CV2DP = 2DP/ Volume Real.

3.2 COMPORTAMENTO DO AMV MEDINDO MODELOS ANIMAIS

Avaliação transversal do volume corporal de animais anestesiados e não anestesiados

A Tabela 4 mostra a média±DP do volume e da densidade dos ratos, anestesiados e não anestesiados.

Tabela 4 - Volume e Densidade dos Animais Utilizados na Análise Transversal

Ratos	Volume não-anestesiado (ml)	Volume anestesiado (ml)	Densidade não-anestesiado (g/ml)	Densidade anestesiado (g/ml)
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

Média±DP dos volumes (ml) e densidades (g/ml) dos ratos (n=5) anestesiados ou não (18 medidas em cada condição).

A variação do volume do rato 1 nas três condições experimentais (18 medições cada) está mostrada no histograma da Figura 5.

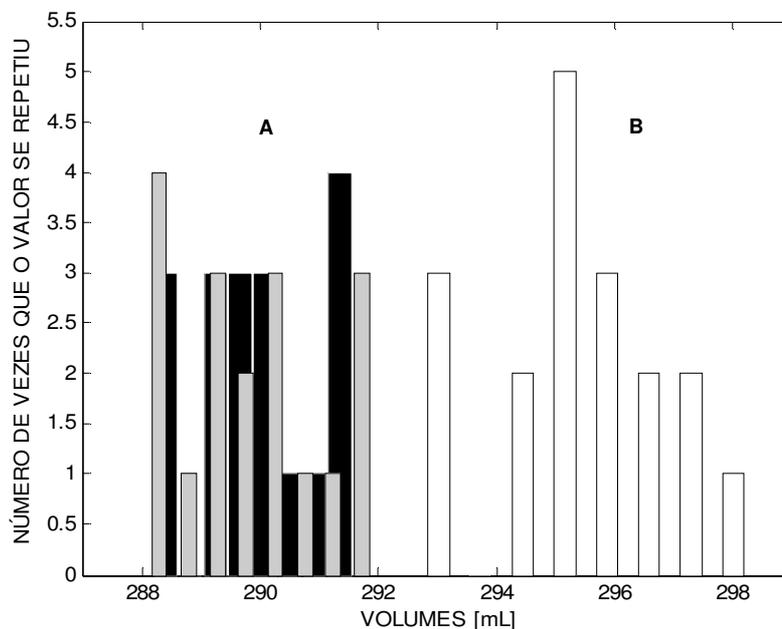


Figura 5 - Histograma dos volumes medidos do rato 1 a partir de uma calibração prévia. A – Rato não-Anestesiado (preto) e anestesiado (cinza) após agitação. B – Rato anestesiado antes da agitação (branco).

A média $\pm 2DP$ das diferenças dos volumes do rato 1 anestesiado sem agitação para retirada das bolhas e o rato 1 não anestesiado foi de $5.54\text{ml} \pm 3.92\text{ml}$ e entre o rato 1 anestesiado e agitado e o animal não anestesiado foi de $0.07\text{ml} \pm 3.06\text{ml}$. Consequentemente, a densidade aparente do rato 1 anestesiado e não agitado ($1.008 \pm 0.005\text{g/ml}$) foi significativamente menor do que do animal agitado ($1.028 \pm 0.004\text{g/ml}$). Além disso, a variação do volume no rato 1 anestesiado foi maior antes da agitação ($\pm 3\text{ml}$) se comparada as medidas após agitação ($\pm 2\text{ml}$).

A Figura 6 apresenta o histograma das 90 diferenças entre as medidas de volumes dos animais anestesiados e não anestesiados realizadas no experimento transversal. Uma distribuição próxima da normal foi observada e a média±DP foi de 0.31ml±2.34ml.

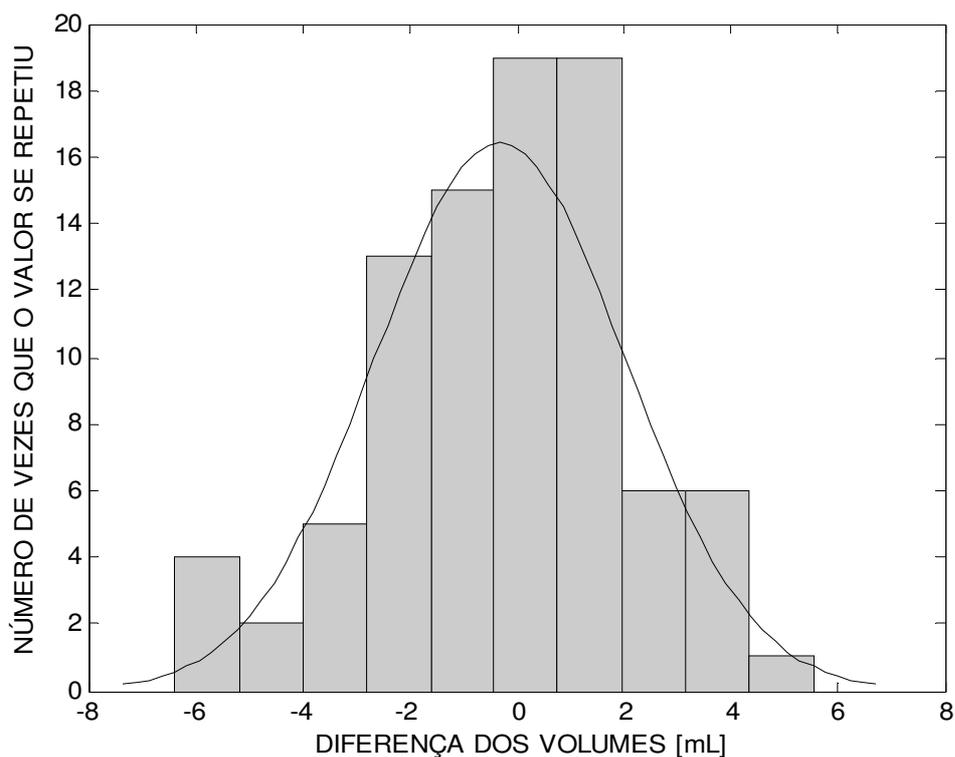


Figura 6 - Histograma das diferenças de volume entre os ratos anestesiados e não anestesiados (n=5). Média±DP 0.31ml±2.34ml. Total de 90 medidas.

O coeficiente de variação, expresso como percentual (CV%) dos volumes dos animais anestesiados e não anestesiados foi (média±DP) 0.45%±0.13% e 0.38%±0.04%, respectivamente. Os valores de CV% e o pequeno desvio padrão (Tabela 4) indicam uma boa confiabilidade sobre as repetidas medidas dos animais anestesiados e não anestesiados.

4 DISCUSSÃO

No presente estudo, é proposto um novo aparato para medição do volume corporal de ratos que não necessita do sacrifício do animal, anestesia ou raspagem dos pêlos. Isto traz vantagens importantes sobre os métodos alternativos existentes. A reprodutibilidade, acurácia e sensibilidade do método proposto são apresentadas no estudo. Devido ao fato do aparato ser de fácil construção, pode ser utilizado para uma série de propósitos científicos.

A movimentação dos animais sem anestesia tem sido considerada um fator que prejudica a determinação do volume por pesagem hidrostática (WALSER, STEIN, 1953). Contudo, os resultados obtidos no AMV não suportam essa afirmativa. Os valores das densidades dos ratos, anestesiados ou não, foram similares aos encontrados em outros animais (Tabela 5), o que corrobora com o fato de que o animal a ser medido pelo AMV não precisa ser anestesiado, uma vez que sua movimentação não interfere no procedimento de aferição. Ao contrário, a movimentação dos animais auxiliou na liberação das bolhas de ar presas nos pêlos. Além disso, independentemente do volume dos animais (pequeno= 289.9 ± 1.0 ml; grande= 410.4 ± 1.5 ml), o \pm DP foi baixo, o que evidencia a repetibilidade das medições do AMV. A respeito dos animais vivos, considerando o desvio padrão de ± 2.34 ml (Figura 6), sugerimos que seja utilizada a média aritmética de duas medidas desde que estas tenham diferenças inferiores a 2ml. Se a diferença for superior a 2ml, faz-se necessário uma terceira medida.

Tabela 5. Referências de densidades de mamíferos.

P.H. Pesagem Hidrostática; D.A. Deslocamento de Ar; H.D. Hélio-Diluição. * \pm DP não informado.

Referências	Modelo Animal	Metodologia	Δ Densidade(g/mL)	Idade
Rathbun, 1945	Porco da Índia (n=50)	P.H. Animais Mortos	1.021 a 1.093	-
Scheer, 1947	Ratos	Animais Vivos	$1.015 \pm *$	12 semanas
Kraybill, 1952	Gado (n=30)	P.H. Animais Mortos	1.017 a 1.070	-
Walser, 1953	Gatos (n=10)	H.D. Animais Vivos	1.023 a 1.087	-
Kodama, 1971	Hamster (n=34)	D.A. Animais Anestesiados	1.049 ± 0.010	3 meses
Stone, 1978	Ratos <i>Sprague Dawley</i> (n=14)	P.H. Animais Anestesiados	1.047 ± 0.01 a 1.058 ± 0.009	3 a 6 semanas

Parece que o modelo proposto por SCHEER et al. (1947) é o único utilizado para aferição do volume de animais vivos e não anestesiados. Este modelo tem funcionamento semelhante ao AMV, uma vez que mede o deslocamento do nível da água após a introdução do animal não anestesiado. Neste estudo (SCHEER et al., 1947), as densidades dos ratos foram mensuradas pela razão entre massa corporal e a massa de água deslocada pelo animal obtida através de três transferências de água. Porém, nenhum comentário foi feito pelos autores no que diz respeito ao volume residual de água nos vasos, o que poderia levar a erros de medição. Além disso, neste modelo, o rato era mantido completamente submerso e isolado durante o processo de medição (enchimento total dos vasos, fechamento da válvula, abertura da saída de emergência e finalmente retirada do volume de água correspondente ao volume do animal). Este estudo (SCHEER et al., 1947) não apresenta nenhum tipo de calibração com o intuito de determinar a acurácia do modelo e nem comenta sobre a possível interferência das bolhas de ar na medição, sendo que sua reprodutibilidade (1%) foi apenas mencionada sem maiores detalhes. Mostramos que o AMV possui algumas vantagens em relação ao sistema do SCHEER et al. (1947). Nossos dados (Tabela 3) mostram que o maior erro relativo do AMV foi de 0.4% medindo volumes entre 100ml a 700ml.

As densidades dos cinco ratos apresentadas neste trabalho (Tabela 4) são menores do que os mínimos valores encontrados em outros artigos com ratos *Sprague-Dawley* e ratos *Wistar* (Tabela 5). Provavelmente isto se deva ao fato de que em nosso trabalho, assim como no do SCHEER et al., 1947, calculamos a densidade de animais vivos e conscientes, nos quais o ar preso nos pulmões, vias aéreas superiores e trato gastrointestinal pode interferir na densidade, levando a obtenção de valores menores do que os obtidos com carcaça de animais mortos e com os pêlos raspados (DAHMS, GLASS, 1982). Assim, não é recomendado que se utilize a mesma relação que existe a partir da densidade de animais mortos para o cálculo indireto da porcentagem de gordura corporal em animais vivos e conscientes. Definir uma equação que relacione a densidade de animais vivos com porcentagem de gordura corporal não foi o objetivo deste trabalho. Concluindo, nossos dados mostram que o AMV é confiável, acurado, reprodutível e sensível. O princípio de medição do volume pode ser aplicado para qualquer animal desde que o aparato esteja fisicamente dimensionado. O AMV é barato e pode ser usado com animais vivos possibilitando a avaliação longitudinal individual de volume corporal em experimentos que durem semanas ou meses.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP - e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq – (03/09923-2P e 523383-96-7). Rodrigo Hohl recebeu suporte financeiro da CAPES e Renato Buscariolli de Oliveira recebeu suporte financeiro do PIBIC-CNPq.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEHNKE, A. R.; FEEN, B. G.; WELHAM, W. C. The specific gravity of health men. **J Am Med Ass**, 118, p. 495-498, 1942.
- BLAND, J. M.; ALTMAN, D. G. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. **Lancet**, v. 1, n. 8476, p. 307-310, 1986.
- BOHNENKAMP, H.; SCHMAH, 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**, v. 228, p.100-124, 1931.
- BOMPA, T. O. **Periodização**: teoria e metodologia do treinamento. São Paulo: Phorte, 2001.
- BRAGA, L. R.; MELLO, M. A. R.; GOBATTO, C. A. Exercício contínuo e intermitente: efeitos do treinamento e do destreinamento sobre a gordura corporal de ratos obesos. **Arch Lat Nutr**, v. 54, n. 1, p. 58-65, 2004.
- BRUIN, G. et al. Adaptation and overtraining in horses subjected to increasing training loads. **J Appl Physiol**, v. 76, n. 5, p. 1908-1913, 1994.
- DAWSON, C. A.; HORVATH, S. M. Swimming in small laboratory animals. **Med Sci Sports**, v. 2, p. 51-78, 1970.
- DAHMS, W. T.; GLASS, A. R. Correlation of percent body fat with body specific gravity in rats. **J Nutr**, v. 112, p. 398-400, 1982.
- DEMPSTER, P.; AITKENS, S. A new air displacement method for the determination of human body composition. **Med Sci Sports Exerc**, v. 27, p. 1692–1697, 1995.
- FIELDS, A. D.; GORAN, M. I.; MCCRORY, M. A. Body-composition assessment via air-displacement plethysmography in adults and children: a review. **Am J Clin Nutr**, v. 75, p. 453-467, 2002.
- FRY, R. W.; MORTON, A. R.; KEAST, D. Periodization of training stress: a review. **Can J Sports Sci**, v. 17, n. 3, p. 234-240, 1992.
- GNAEDINGER, R. H. Estimation of density of live pigs by air displacement and helium dilution techniques. (**Ph.D. Thesis**) – East Lansing: Michigan State Univ., 1962.
13. GOBATTO, C. A. et al. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. **Comp Biochem Physiol A**, v. 130, p. 21-27, 2001.

- HALSON, S. L.; JEUKENDRUP, A.E. Does Overtraining Exist? **Sports Med**, v. 34, n. 14, p. 967-981, 2004.
- HARDIN, D. Reliability of selected swimming endurance tests for laboratory rats. **Res Quart**, v. 39, n. 2, p. 405-407, 1968.
- HARRIS, R. E.; INGLE, D. J. The capacity for vigorous muscular activity of normal rats and of rats after removal of the adrenal medula. **Am J Physiol**, v. 130, p. 151-154, 1940.
- HIX, V. M., PEARSON, A. M., REINEKE, E. P. Specific gravity of human subjects by air displacement and helium dilution. **J Appl Physiol**, 19, n. 5, p. 955-958, 1964.
- JONGBLOED, J.; NOYONS, A. K. M. Die Bestimmung des wahren volumens und des spezifischen. **Arch Ges Physiol**, v. 240, p. 197-201, 1938.
- KEY, J. Relationship between load and swimming endurance in humans. **Res Quart**, v. 33, p. 559-565, 1962.
- KODAMA, A. M. In vivo and in vitro determinations of body fat and body water in the hamster. **J Appl Physiol**, v. 31, n. 2, p. 218-222, 1971.
- _____.; PACE, N. A simple decompression method for *in vivo* body fat in small animals. **J Appl Physiol** 18: 1272-1276, 1963.
- KRAYBILL, H. F.; BITTER, H. L.; HANKINS, O. G. Body composition of cattle. II. Determination of fat and water content from measurement of body specific gravity. **J Appl Physiol**, v. 4, n. 7, p. 575-583, 1952.
- KUIPERS, H. Training and overtraining: an introduction. **Med Sci Sports Exerc**, v. 30, n. 7, p.1137-1139, 1998.
- _____.; KEIZER, H. A. Overtraining in elite athletes: review and directions for the future. **Sports Med**, v. 6, p. 79-92, 1998.
- LEHMANN, M. et al. Automatic imbalance hypothesis and overtraining syndrome. **Med Sci Sports Exerc**, v. 30, n. 7, p.1140-1148, 1998.
- MATSUMOTO, K. et al.. An adjustable-current swimming pool for the evaluation of endurance capacity of mice. **J Appl Physiol**, v. 81, n. 4, p.1843-1849, 1996.
- MCCRORY, M. A. et al. Evaluation of a new air displacement plethysmograph for measuring human body composition. **Med Sci Sports Exerc**, v. 27, p.1686-1691, 1995.
- MCARDLE, W. D.; MONTROYE, H. J. Reliability of exhaustive swimming in the laboratory rat. **J Appl Physiol**, v. 21, n. 4, p. 1431-1434, 1966.

- MYHRE, L. G.; KESSLER, W.V. Body density and potassium 40 measurements of body composition as related to age. **J Appl Physiol**, v. 21, n. 4, p. 1251-1255, 1966.
- NAITO, H. K.; GRIFFITH, D. R. Interaction of thyroxine, energy metabolism and swimming performance of rats. **Life Sci**, v. 20, p. 1121-130, 1977.
- PETIBOIS, C. et al. Biochemical aspects of overtraining in endurance sports. **Sports Med** 33: 83-94, 2003.
- PLATEN, P. Overtraining and the endocrine system. **Eur J Sport Sci**, n. 2, p. 1-7, 2002. pt. 1
- RAJA, G. et al. Repeated bouts of high-intensity exercise and muscle glycogen sparing in the rat. **The J Exp Biol**, v. 206, p. 2159-2166, 2003.
- RATHBUN, E. N.; PACE, N. The body water and chemically combined nitrogen content in relation to fat content. **J Biol Chem**, v. 158, p. 685-691, 1945.
- _____. The determination of total body fat by means of the body specific gravity. **J Biol Chem**, v. 158, p. 667-676, 1945.
- ROGERS, P.; WEBB, G. P. Estimation of body fat in normal and obese mice. **Br J Nutr**, v. 43, p. 83-86, 1980.
- SCHEER, B.T. et al. Physical capacity of rats in relation to energy and fat content of the diet. **Am J Physiol**, v. 149, p.194-203, 1947.
- SIRI, W.E. Apparatus for measuring human body volume. **Rev Sci Instr**, v. 27, p. 729-738, 1955.
- SMITH, L.L. Cytokine hypothesis of overtraining: a physiological adaptation to excessive stress? **Med Sci Sports Exerc**, v. 32, n. 2, p. 317-331, 2000.
- SMITH, L. L. Tissue trauma: the underlying cause of overtraining syndrome? **J Stre Cond Res**, v. 18, n. 1, p. 185-193, 2004.
- STERN, H. Investigations on corporeal specific gravity and on the value of this factor in physical diagnosis. **Med Rec**, v. 59, p. 204-207, 1901.
- STONE, M. H. et al. Overtraining: a review of the signs, symptoms and possible causes. **J Appl Sport Sci Res**, n. 5, p. 35-50, 1991.
- STONE, M.H.; RUSH, M.E.; LIPNER, H. Responses to intensive training and methandrostenelone administration: II. hormonal, organ weights, muscle weights and body composition. **Pflugers Arch**, n. 375, p. 147-151, 1978.

TERADA, S. et al. Effects of high-intensity swimming training on glut-4 and glucose transport activity in rat skeletal muscle. **J Appl Physiol**, v. 90, p. 2019-2024, 2001.

TIIDUS, P. M. Radical species in inflammation and overtraining. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 76, p. 533-538, 1998.

WALSER, M.; STEIN, S. N. Determination of specific gravity of intact animals by helium displacement; comparison with water displacement. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 82, p. 774-777, 1953.

WEDGEWOOD, R. J.; BRECKENRIDGE, J. R.; NEWMAN, R.W. Measurement of body volume by air displacement. **Fed Proc**, n 12, p. 151, 1953.

ANEXOS 1



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia



CEEA-IB-UNICAMP

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 638-1, sobre "DESENVOLVIMENTO DE TECNOLOGIA DESPORTIVA ATRAVÉS DE UMA AÇÃO MULTIDISCIPLINAR" sob a responsabilidade de Profa. Dra. Denise Vaz de Macedo está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 12 de Fevereiro de 2004.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 638-1, entitled "SPORTIVE TECHNOLOGY THROUGH A MULTIDISCIPLINARY ACTION", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on February 12, 2004.

Campinas, 12 de Fevereiro de 2004.

Profa. Dra. Liana Verinaud
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP

Fátima Alonso
Secretária - CEEA/IB/UNICAMP

ANEXOS 2

O artigo referente a este trabalho, foi publicado na versão “In Press” no periódico *Journal of Applied Physiology* em Novembro de 2006 e o resumo do trabalho encontra-se disponível na base de dados PubMed.

Journal of Applied Physiology **TRY AMERICAN JOURNAL OF BOTANY** **QUICK SEARCH:** [advanced]

HOME HELP FEEDBACK SUBSCRIPTIONS ARCHIVE SEARCH SEARCH RESULT

Institution: CAPES/MEC - UFPA, FCAP, UFAP | Sign In via User Name/Password

My search criteria: **hohl,r** (author)

standard / condensed citation format
10 / 25 / 40 / 60 / 80 results per page
best matches / newest first

Alert me when new articles matching this search are published
Download all citations on this page to my citation manager

For checked items below: view abstracts in new window download to citation manager

Journal of Applied Physiology [Journal Home](#)
[Abstract](#)
[PDF](#)

INNOVATIVE METHODOLOGY:
Rodrigo Hohl, Renato Buscariolli, Denise Vaz Macedo, and Rene Brenzikofer

APPARATUS FOR MEASURING RAT BODY VOLUME: A METHODOLOGICAL PROPOSITION
J Appl Physiol, Nov 2006; doi:10.1152/jappphysiol.00744.2006

this article is FREE to you why?

NCBI **PubMed** A service of the National Library of Medicine and the National Institutes of Health www.pubmed.gov

All Databases PubMed Nucleotide Protein Genome Structure OMIM PMC Journals

Search PubMed [Save Search](#)

Limits Preview/Index History Clipboard Details

Display Summary Show 20 Sort by Send to

All: 17 Review: 0

Items 1 - 17 of 17

1: [Hohl R, Buscariolli R, Macedo DV, Brenzikofer R.](#) [APPARATUS FOR MEASURING RAT BODY VOLUME: A METHODOLOGICAL PROPOSITION.](#)
J Appl Physiol. 2006 Nov 2; [Epub ahead of print]
PMID: 17082370 [PubMed - as supplied by publisher]