



VALIDAÇÃO DO TESTE *REVERSE LACTATE THRESHOLD* (RLT) PARA DETERMINAÇÃO DA ZONA DE TRANSIÇÃO AERÓBIA-ANAERÓBIA DE CAMUNDONGOS CORREDORES

Juan B. Orsi*, Pedro P.M. Scariot, Leonardo H.D. Messias, Emanuel E.C. Polisel, Lara S. Araujo, Luisa O. Cardoso, Claudio A. Gobatto, Fúlvia B. Manchado-Gobatto

Resumo

O presente estudo teve como objetivo adaptar e validar o *Reverse Lactate Threshold* (RLT) para avaliação aeróbia de camundongos corredores, comparando e correlacionando os valores obtidos por esse novo teste com a máxima fase estável de lactato (MFEL). Para isso seguimos inicialmente nossa proposta aplicando o RLT à quinze animais. Para seguir o caminho de validação do protocolo, os animais foram submetidos ao protocolo de máxima fase estável de lactato, considerado padrão ouro para a determinação do limiar anaeróbio. O percentual de sucesso nessa primeira tentativa foi de apenas 65%, sugerindo ser o protocolo inicial de RLT (Teste e Reteste) não tão assertivo. Desta forma, dedicamos esforços para efetuar uma nova tentativa com ajustes metodológicos, mas apenas 8% dos animais atingiram todos os critérios de satisfação previamente estabelecidos. Em uma terceira tentativa, os animais foram separados em 5 grupos para trabalharmos com diferentes intensidades no RLT observando se, de alguma forma, o protocolo se adequava. Contudo, o número de roedores que atingiram os critérios de sucesso do teste foi também de 8%. Como última investida, selecionamos os animais que chegaram mais próximos dos critérios de satisfação e os separamos em 3 grupos, com a intenção de trabalhar novamente com diferentes intensidades. Ainda assim, o protocolo foi assertivo para apenas 1 entre 4 animais. Diante dos nossos resultados, ao menos das formas aqui propostas, o RLT não se mostrou um protocolo capaz de determinar, com segurança, o limiar anaeróbio dos animais submetidos à avaliação em corrida.

Introdução

Modelos experimentais, com especial atenção aos roedores, são amplamente utilizados no contexto da fisiologia do exercício e treinamento físico (LAURSEN et al., 2007, de ARAUJO et al., 2012). Essa opção está pautada nas possibilidades de investigações mais aprofundadas em ambiente laboratorial envolvendo esses animais de pequeno porte e fácil manipulação, considerando que ratos e camundongos apresentam respostas fisiológicas bastante próximas das observadas em seres humanos submetidos ao exercício físico e treinamento (GOUTIANOS et al., 2015). Nesse contexto, pesquisadores têm adaptado protocolos para identificação da zona de transição aeróbia-anaeróbia, anteriormente sugeridos para tais determinações em humanos, a diferentes tipos de esforços realizados por roedores, como testes em natação (GOBATTO et al., 2001, MANCHADO et al., 2004, GOBATTO et al., 2005, ROGRIGUES et al., 2017, dos REIS et al., 2018), escada (SOUSA et al., 2014, RODRIGUES et al., 2017) e corrida em esteira rolante (PILIS et al., 1993, LANGFORT et al., 1996, MANCHADO et al., 2004, MANCHADO-GOBATTO et al., 2011). Dessa forma, o estudo objetivou validar o protocolo não exaustivo *Reverse Lactate Threshold* como uma significativa ferramenta para a determinação da zona de transição aeróbia-anaeróbia de camundongos submetidos à corrida.

Materiais e Métodos

Animais e local

Para execução do estudo, foram utilizados camundongos C57BL/6J, mantidos em ambiente climatizado ($22 \pm 2^\circ$ C, umidade relativa do ar entre 45 e 55%, ciclo claro/escuro 12/12h, com luz acesa das 6 às 18h) e alimentados com ração balanceada Labina-Purina® para roedores, recebendo água *ad libitum*. O experimento foi realizado de acordo com a legislação Brasileira corrente e as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal foram rigorosamente seguidas, sendo os procedimentos previamente aprovados pela Comissão de Ética para o Uso de Animais – CEUA – UNICAMP (Protocolo). Todos os testes foram conduzidos em sala específica para avaliação e treinamento de roedores do Laboratório de Fisiologia Aplicada ao Esporte – LAFAE – UNICAMP, no mesmo período do dia (06:00 às 9:00hs). As avaliações foram executadas de forma controlada, visando a excelência e a fidedignidade das análises..

Desenho experimental

Aos sessenta dias de idade os animais foram recebidos pelo Biotério local, onde permaneceram até os cento e cinquenta dias para atingirem idade alvo. A partir dessa idade, foram adaptados à corrida em esteira rolante por um período de cinco dias. Dez animais realizaram o procedimento piloto para ajustar as intensidades de exercício adotadas no teste. Após ajustes no protocolo, 15 camundongos foram submetidos ao teste RLT adaptado à esteira rolante. Com base nas determinações de zona de transição aeróbia-anaeróbia obtida por esse novo teste, os roedores realizaram posteriormente a determinação individualizada de máxima fase estável de lactato, conforme procedimentos detalhados a seguir.

Reverse Lactate Threshold Test (RLT)

O RLT foi caracterizado, a princípio, por 5 estágios de corridas com duração de 4 minutos, em intensidades regressivas (22, 20, 18, 16 e 14 m/min). Ao final de cada estágio e com o animal em repouso, 15 μ l de sangue foram coletados da extremidade distal da cauda para posterior mensuração da concentração de lactato sanguíneo por método eletroquímico (Lactímetro - YSI 2300). A capacidade aeróbia obtida pelo método RLT (i.e. iRLT) foi determinada por meio de ajuste polinomial de segunda ordem, considerando esse parâmetro como a tangente zero no eixo x. A aplicabilidade do protocolo foi considerada com base nos coeficientes de ajustes perante o polinômio de segunda ordem, tendo como critérios de sucesso do teste: i) a realização de mais de três intensidades pelo roedor durante o teste, ii) comportamento do ajuste similar a um “U” invertido para a curva lactato vs. tempo e valor de R^2 para o ajuste superior à 0,80.

Determinação da Máxima Fase Estável de Lactato (MFEL)

Com o intuito de validar o RLT para modelo animal, posteriormente à identificação da capacidade aeróbia por esse novo teste, os camundongos foram submetidos ao protocolo de máxima fase estável de lactato, composto por três a quatro sessões de corrida contínua com duração de 25 minutos cada, separadas por um intervalo de 48 horas. As intensidades para o protocolo de MFEL definiram-se com base inicial em iRLT. Para possível determinação da curva lactacidêmica em cada intensidade, amostras sanguíneas foram extraídas da cauda dos camundongos nos momentos de repouso e cada 5 minutos de execução das corridas contínuas. Gráficos individuais de ‘concentração de lactato sanguíneo vs. tempo’, obtidos em diferentes intensidades, foram plotados para determinação da MFEL (intensidade e concentração de lactato equivalente). A intensidade de MFEL (iMFEL) foi considerada a mais elevada na qual o lactato sanguíneo apresentou aumento igual ou inferior a 1 mmol/L, do 10º ao 25º (GOBATTO et al., 2001).

Etapas de Reverse Lactate Threshold (RLT) após Máxima Fase Estável de Lactato (MFEL)

Devido ao baixo percentual de sucesso em RLT (Teste e Re-teste) da maneira como inicialmente proposto, dedicamos esforços para efetuar uma nova tentativa, com ajustes metodológicos. Nessa segunda oportunidade, optamos utilizar o protocolo padrão ouro (MFEL) como referência para escolhermos as intensidades regressivas e os estágios. Assim, os testes foram separados em três etapas, as quais tiveram suas intensidades e estágios adaptados de acordo com o desempenho dos animais, cujas características metodológicas já relatadas foram mantidas.

Na primeira etapa, o teste de RLT foi caracterizado por 4 estágios de corridas, com duração de 4 minutos cada, com intensidades regressivas equivalentes à 28, 26, 24 e 22 m/min. Nesse caso, todos os 14 animais foram submetidos ao procedimento. Na segunda etapa, o número de animais submetidos ao procedimento foi mantido (n=14), assim como a quantidade de estágios de corridas e a duração dos mesmos. Entretanto, as intensidades regressivas foram adaptadas, levando-se em conta o desempenho dos animais em “Etapa 1”. As intensidades, em ordem crescente, foram: 23,5; 21,5; 19,5 e 17,5 m/min (n=3); intensidades, 24,5; 22,5; 20,5 e 18,5 m/min (n=2); intensidades, 25,5; 23,5; 21,5 e 19,5 m/min (n=3); intensidades, 26; 24; 22 e 20 m/min (n=2) e 28; 26; 24 e 22 m/min (n=4). A terceira etapa permaneceu com as mesmas características das etapas anteriores, mas as intensidades regressivas foram readaptadas e apenas 5 animais realizaram este teste. As intensidades estabelecidas, em ordem crescente, foram: 22,5; 20,5; 18,5 e 16,5 m/min (n=1), 24; 22; 20 e 18 m/min (n=1), 27,5; 25,5; 23,5 e 21,5 m/min (n=2) e 29,5; 27,5; 25,5 e 23,5 m/min (n=1).

Análise estatística

A análise estatística está apresentada de maneira descritiva como média \pm erro padrão da média. A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade pelo teste de Levene. A comparação e a correlação entre a intensidade de RLT e MFEL foram efetuadas por teste t-*Student* para medidas pareadas e correlação de Pearson, respectivamente. Do mesmo modo, foram também analisadas as comparações e correlações entre a concentração de lactato em iRLT e iMFEL. Em todos os casos, o nível de significância foi fixado em 5%.

Resultados e discussão

Reverse Lactate Threshold Teste e Re-teste

Os resultados referentes à lactacidemia em RLT Teste e Re-teste estão exibidos na figura 1. Os dados de concentração de lactato deveriam apresentar comportamento característico com curva “U-invertido” com a regressão das intensidades de exercício (DOTAN et al., 2012, MESSIAS et al., 2018), na qual a lactacidemia aumenta de forma gradativa até atingir um pico e novamente declinar. Entretanto, esse não foi o achado inicial de nosso estudo, como é possível observar na tabela 1, que inclui os resultados médios obtidos pelos 14 animais avaliados, independente da obtenção de sucesso no teste.

Tabela 1: Lactacidemia (mmol/L) ao longo dos estágios do RLT (n=14)

Intensidades (m/min)					
	22	20	18	16	14
Teste	1,64 \pm 0,14	1,79 \pm 0,13	2,01 \pm 0,12	2,03 \pm 0,10	2,10 \pm 0,11
Reteste	1,53 \pm 0,10	1,70 \pm 0,12	1,68 \pm 0,11	1,72 \pm 0,12	1,58 \pm 0,09

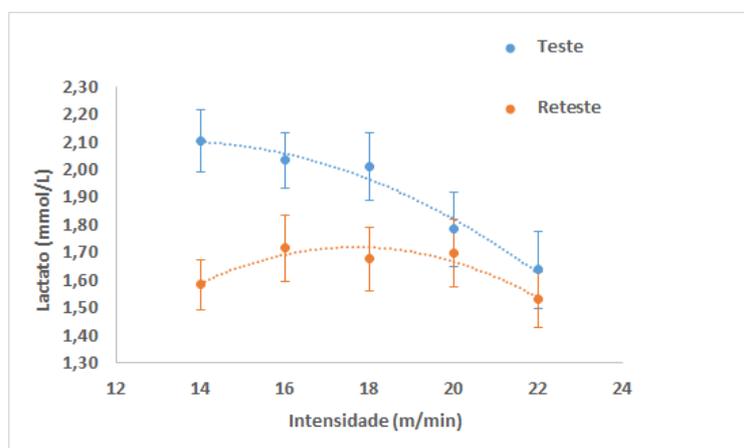


Figura 1: Lactacidemia (mmol/L) ao longo dos estágios do RLT.

A tabela 2 apresenta os valores de RLT e MFEL para os animais que apresentaram sucesso no teste aqui proposto. Entretanto, destaca-se que apenas 4 animais atingiram todos os critérios de sucesso nessas condições.

Tabela 2: Comparação entre a intensidade de limiar anaeróbio pelo teste RLT e MFEL. Dados estão expressos em média e erro padrão juntamente com testes de comparação e correlação entre os testes (n=4).

RLT	MFEL	Diferença %	Teste T	Correlação
16,05±0,47	24,5±1,11	35,77	t= -12,7; p<0,01	R= 0,88; p= 0,11

Reverse Lactate Threshold (RLT) após Máxima Fase Estável de Lactato (MFEL)

A tabela 3 apresenta a diferença percentual entre os resultados de RLT e MFEL em suas respectivas etapas, bem como a figura 2 apresenta os resultados dos roedores que não atingiram os critérios de satisfação, sendo o “Grupo A” aqueles que não conseguiram completar ao menos 3 estágios, “Grupo B” os que não apresentaram uma curva lactacidêmica em formato de “U invertido” e o “Grupo C” aqueles em que os resultados da curva de lactato apresentara $R^2 < 0,80$.

Tabela 3: Diferença percentual entre a intensidade de limiar anaeróbio dos animais em suas respectivas etapas em RLT após MFEL.

	Animais	RLT	MFEL	Diferença %
Etapa 1	6	26,2	28,6	8,39
	9	26,1	26,1	0
Etapa 2	5	25,6	27	5,18
Etapa 3	5	25,1	27	7,03

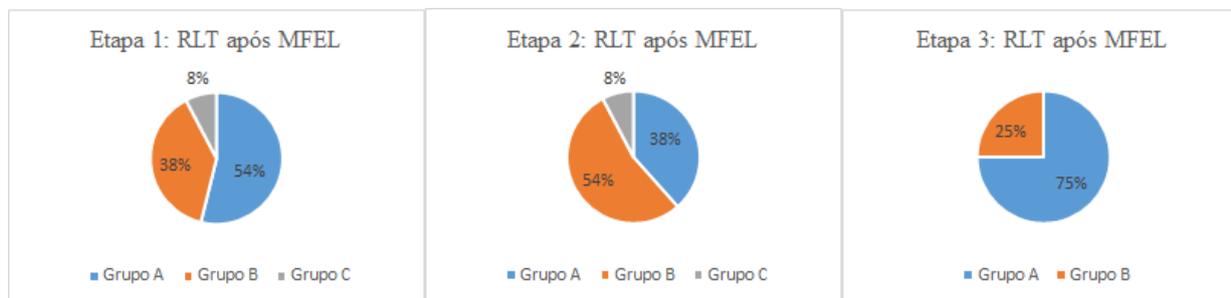


Figura 2: Animais que não atingiram os critérios de sucesso nos testes de RLT. Grupo A- animais que conseguiram completar ao menos 3 estágios; Grupo B - os que não apresentaram uma curva lactacêmica em formato de “U invertido” e Grupo C – roedores submetidos a testes em que os resultados da curva de lactato apresentara R^2 inferior à 0,80

Conclusão

Apesar de todos os esforços, não obtivemos um alto percentual de sucesso em todas as tentativas de validação do protocolo não exaustivo RLT para camundongos submetidos ao esforço de corrida. Dentre os animais que apresentaram resultados aceitáveis para os critérios de satisfação estabelecidos, a intensidade determinada pelo protocolo proposto ainda não foi compatível com a MFEL em muitos dos casos. Desse modo, considerando o baixo percentual de sucesso e todas as tentativas de ajustes no protocolo, o RLT não se mostrou um teste eficiente para a determinação da intensidade de limiar anaeróbio em modelo animal, especificamente quando aplicado a camundongos submetidos à avaliação em corrida.

Referências

- GOUTIANOS, G. et al. The rat adequately reflects human responses to exercise in blood biochemical profile: a comparative study. *Physiological Reports*, v. 3 (2), p. e12293–e12293, 2015.
- GOBATTO, C. A., MELLO, M. A. R., SIBUYA, C. Y., AZEVEDO, J. R. M., SANTOS, L. A., KOKUBUN, E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comp Biochem Physiol*, v.130A, p.21-7, 2001.
- RODRIGUES, N.A., TORSONI, A.S., FANTE, T.; DOS REIS, I.G.M., GOBATTO, C.A., MANCHADO-GOBATTO, F.B. Lactate minimum underestimates the maximal lactate steady-state in swimming mice. *Appl Physiol Nutr Metabol*, v. 42, p. 46-52, 2017
- SOUZA, M.V., LEITE, R.D., LINO, A.D., MARQUETI, R.C., BERNARDES, C.F., ARAUJO, H.S., BOUSKELLA, E., SHIGUEMOTO, G.E., PEREZ, S.E., KRAEMER-AGUIAR, L.G. Resistance training improves body composition and increases matrix metalloproteinase 2 activity in biceps and gastrocnemius muscles of diet-induced obese rats. *Clinics (USP. Impresso)*, v. 69, p. 265-270, 2014.
- MANCHADO-GOBATTO, F. B. et al. Non-exhaustive test for aerobic capacity determination in running rats. *Indian J Exp Biol*, v. 49, n. 10, p. 781–785, 2011.
- LANGFORT, J., ZARZECZNY, R., PILIS, W., KACIUBA-USCILKO, H., NAZAR, K., PORTA, S. Effect of sustained hyperadrenalinemia on exercise performance and lactate threshold in rats. *Comp Biochem Physiol*, v.114 A, p.51-5, 1996.
- PILIS, W., ZARZECZNY, R., LANGFORT, J., KACIUBA-USCILKO, H., NAZAR, K., WOJTYNA, J. Anaerobic threshold in rats. *Comp Biochem Physiol*, v.106A, p.285-9. 1993.

Agradecimentos



PIBIC
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE
BOLSAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

