

TRANSIÇÃO METABÓLICA E TESTE DO LACTATO MÍNIMO EM RATOS: NOVA PROPOSTA DE QUANTIFICAÇÃO DO ESFORÇO

METABOLIC TRANSITION AND LACTATE MINIMUM TEST IN RATS: NEW PROPOSAL OF EFFORT QUANTIFICATION

Fabrcio Azevedo Voltarelli*
Maria Alice Rostom de Mello**
Claudio Alexandre Gobatto**

RESUMO

A porção progressiva do teste do lactato mínimo (TLM) inicia-se após indução de acidose metabólica, seguida de repouso, visando-se atingir o pico de lactato [LAC_{pico}], para a obtenção da curva em forma de "U". No entanto, [LAC_{pico}] não é inserido nos cálculos. O presente estudo objetivou apresentar nova proposta de determinação da transição metabólica (TM) através do TLM, ou seja, avaliar a curva [LAC] vs tempo de exercício (A), ao invés de [LAC] vs intensidade de exercício (B), incluindo-se o valor de LAC_{pico} . Ratos *wistar*, adultos (90 dias) e sedentários foram avaliados pelo TLM para a determinação do lactato sanguíneo mínimo (LSM). Os valores de LSM, quando analisada a curva (A), não mostraram diferença se comparados com valores obtidos através da curva (B). Não houve, também, diferença entre as cargas de exercício obtidas através destas curvas. Sugerimos, então, uma potencial aplicação da nova proposta na estimativa do LSM em ratos.

Palavras-chave: Teste do lactato mínimo. Transição metabólica. Ratos.

INTRODUÇÃO

O fornecimento de energia para a contração muscular no exercício pode ser derivado dos metabolismos aeróbio e anaeróbio. Durante o exercício, existe uma zona de transição na qual ocorre mudança da predominância de metabolismo aeróbio para o anaeróbio. Essa zona de transição mostrou-se importante na avaliação do condicionamento físico e na prescrição de treinamento (TEGTBUR *et al.*, 2001). Por esse motivo, diversos protocolos fisiológicos de avaliação foram desenvolvidos para detectar essa zona de transição metabólica, muitos deles empregando o lactato sanguíneo como marcador. Entre os procedimentos mais utilizados na prática encontram-se: o limiar ventilatório observado por Wasserman & Mc Ilroy (1965), o limiar anaeróbio (Lan) identificado pelo aumento da concentração

sanguínea de lactato, proposto por Kinderman *et al.* (1979), o procedimento que considera a concentração sanguínea de lactato de 4,0 mmol/L como o marco do "início" do acúmulo de lactato sanguíneo (OBLA), sugerido por Sjodin & Jacobs (1981), entre outros.

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

* Mestre. Docente do Departamento de Educação Física, Laboratório de Biodinâmica da Universidade Estadual Paulista-UNESP, Campus Rio Claro/SP.

** Doutor (Livre Docente). Mestre. Docente do Departamento de Educação Física, Laboratório de Biodinâmica da Universidade Estadual Paulista-UNESP, Campus Rio Claro/SP.

DOUST, 1998; TEGTBUR *et al.*, 1993; RIBEIRO *et al.*, 2003; VOLTARELLI *et al.*, 2004).

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

Uma vez que a determinação do lactato mínimo requer apenas um teste realizado em um único dia, poderia ser adequado a ratos durante exercício de natação. Dessa forma, nosso grupo recentemente desenvolveu estudos com vista a padronizar um protocolo para a identificação da transição metabólica em ratos durante a natação, utilizando os princípios do TLM estabelecidos por Tegtbur *et al.* (1993). Em nosso estudo, o LSM médio calculado dos animais foi obtido na carga de $4,95 \pm 0,10\%$ do peso corporal, enquanto a concentração média de lactato sanguíneo foi obtida, nessa carga, a $7,17 \pm 0,16$ mmol/L (VOLTARELLI *et al.*, 2002). Nos estudos utilizando o TLM, citados acima, sejam eles realizados com seres humanos ou animais, o LSM foi determinado a partir dos resultados obtidos referentes à intensidade de exercício (% do peso corporal para animais e velocidade, em m/s, para seres humanos) e concentração de lactato sanguíneo (mmol/L). Nesse tipo de procedimento, para quantificação do esforço, não se faz necessária a inserção do valor de pico de lactato (obtido após indução da acidose metabólica) sanguíneo para a realização dos cálculos, pois essa inserção descaracteriza a curva em forma de “U”. Essa questão pode prejudicar a validade do teste, visto que a cinética de lactato sanguíneo certamente depende do nível inicial desse substrato energético.

A partir dessas informações, propomos aqui uma nova maneira de apresentar os gráficos em forma de “U” obtidos durante o teste do lactato mínimo. Essa nova maneira consiste em

confeccionar os gráficos apresentando os valores calculados de lactato sanguíneo (mmol/L) (inclusive os valores-pico de lactacidemia após a indução da acidose metabólica) *versus* a variável tempo (minutos), incluindo o tempo máximo de repouso após a indução da hiperlactacidemia (9 minutos) antes do início do teste progressivo, que corresponde à concentração-pico de lactato sanguíneo e dá início à caracterização da curva em forma de “U”.

OBJETIVO

O presente estudo teve como finalidade propor, a partir do exposto anteriormente, um novo procedimento de determinação da transição metabólica, obtida através do teste do lactato mínimo aplicado em ratos durante exercício agudo de natação, visando a quantificar a intensidade de esforço desses animais e comparar os resultados obtidos com a primeira proposta.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Os experimentos, envolvendo animais, do presente estudo, seguiram rigorosamente as resoluções específicas referentes à Bioética de Experimentos com Animais (Lei n.º 6.638, de 08 de maio de 1979; e Decreto n.º 24.645 de 10 de julho de 1934). Foram utilizados ratos da linhagem *wistar*, adultos (90 dias de idade) sedentários, cujas mães eram provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Botucatu/SP. Os animais permaneceram em gaiolas coletivas (5 ratos por gaiola) e foram alimentados com ração comercial (Purina®) para roedores e água *ad libitum*, bem como mantidos sob ciclo periódico claro e escuro de 12 horas à temperatura média de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Adaptação ao meio líquido

A adaptação consistiu em manter os animais em contato com água rasa à temperatura de $32 \pm 2^\circ\text{C}$, durante 3 semanas, 5 dias por semana por 30 minutos. Nas 2ª e 3ª semanas de adaptação, os mesmos suportaram sobrecargas

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

TLM adaptado às condições do rato

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

Análise Estatística

Para diferenças estatísticas foi utilizado teste *t* pareado com nível de significância preestabelecido em 5%. As curvas, que determinaram os valores mínimos, foram obtidas por ajuste polinomial de 2º grau, com auxílio de programa de computador (Windows - Excel®) com aplicação de análise por regressão, linear quando necessário.

RESULTADOS

Para fins de comparação, apresentamos, a seguir, os gráficos contendo resultados referentes à transição metabólica obtidos através do teste do lactato mínimo (de acordo com os dados de apenas um rato, a título de exemplo) a partir de dois diferentes procedimentos de cálculo, onde: Figura 1 = Concentração de lactato sanguíneo *versus* carga de exercício e Figura 2 = Concentração de lactato sanguíneo *versus* tempo de exercício (incluindo tempo máximo de repouso, igual a 9 minutos, após a indução da acidose metabólica, o

qual corresponde à concentração-pico de lactato sanguíneo antes do início da porção progressiva do teste do lactato mínimo).

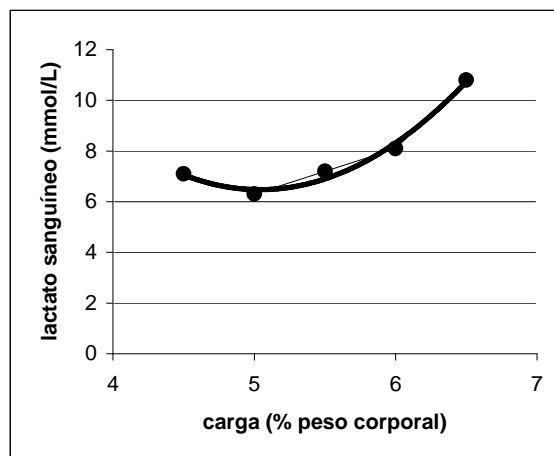
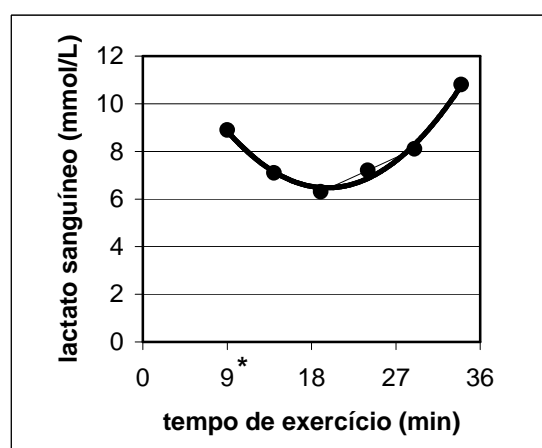


Figura 1 - Curva de lactato sanguíneo (mmol/L) *versus* carga de trabalho (% do peso corporal - pc) de apenas um rato, a título de exemplo, durante o teste do lactato mínimo. A curva foi obtida por ajuste polinomial de 2º grau, com auxílio de programa de computador (EXCEL®). A equação a seguir, que definiu a curva, possibilitou o cálculo do menor valor da concentração de lactato sanguíneo e respectiva carga de trabalho: $y = 2,0143x^2 - 20,339x + 57,81$ (5,05% do pc a 6,5 mmol/L). Esse menor valor de lactato sanguíneo indica a carga de trabalho equivalente à transição metabólica.



* Tempo máximo de repouso, igual a 9 minutos, após a indução da acidose metabólica, o qual corresponde à concentração pico de lactato sanguíneo antes do início da porção progressiva do teste do lactato mínimo.

Figura 2 - Curva de lactato sanguíneo (mmol/L) *vs* tempo de exercício (minutos - min) de apenas um rato, a título de exemplo, durante o teste do lactato mínimo. A curva foi obtida por ajuste polinomial de 2º grau, com auxílio de programa de computador (EXCEL®). A equação a seguir, que definiu a curva,

possibilitou o cálculo do menor valor da concentração de lactato sanguíneo e respectivo tempo de exercício: $y = 0,021x^2 - 0,823x + 14,57$ (19,7 min a 6,4 mmol/L). Esse menor valor de lactato sanguíneo indica o tempo de exercício equivalente à transição metabólica.

A Tabela 1 contém os valores médios de lactato sanguíneo (mmol/L) e cargas de exercício (% do peso corporal), de todos os animais (n=16), quando as relações utilizadas para determinação da transição metabólica foram lactato sanguíneo *versus* carga de exercício e lactato sanguíneo *versus* tempo de exercício.

Tabela 1 - Valores médios (todos animais; n=16) de lactato sanguíneo mínimo (mmol/L) e cargas de exercício (% peso corporal), obtidos durante o teste do lactato mínimo, quando as relações utilizadas para determinação da transição metabólica foram lactato sanguíneo *versus* carga de exercício (obtidos através de análise de função polinomial de grau 2-Excel®) e lactato sanguíneo *versus* tempo de exercício (lactato sanguíneo obtido através de análise de função polinomial de grau 2- Excel® e carga de exercício determinada por regressão linear- Excel®).

Valores de LSM e cargas de exercício obtidos durante TLM	
Tipo de relação utilizado	
Lactato sanguíneo <i>versus</i> carga de exercício	7,2±0,4 mmol/L 4,9±0,1 % do peso corporal
Lactato sanguíneo <i>versus</i> tempo de exercício	7,5±0,5 mmol/L 4,8±0,1 % do peso corporal

obs: não foi encontrada diferença estatística entre os valores obtidos (teste t pareado p<0,05)

DISCUSSÃO

Apesar das inúmeras tentativas, as bases fisiológicas para o acúmulo de lactato sanguíneo durante o exercício ainda não foram totalmente elucidadas. Em diferentes estudos, a hipótese de que a formação de lactato durante o exercício submáximo seja devida à hipóxia tecidual foi questionada. Estudos demonstraram que mesmo frente a cargas moderadas de exercício (50-75% do VO_2 max), portanto, com concentrações intracelulares adequadas de oxigênio, já ocorre acúmulo de lactato tanto no músculo quanto no sangue (BROOKS, 1985; CAMPBELL *et al.*, 1989). Pesquisas com cães mostraram, também, que há acúmulo de lactato nos músculos em

cargas tão baixas quanto 10% do VO_2 max (CONETT *et al.*, 1981). Tais evidências contestam a relação causa/efeito entre produção de lactato e hipóxia tecidual, sugerindo algum outro fator que não a limitação na oferta de oxigênio como responsável pelo aumento da produção muscular de lactato no exercício. A despeito disso, a determinação de “limiares”, isto é, determinação da intensidade de exercício na qual ocorre a transição do metabolismo aeróbio para anaeróbio, tem-se mostrado ferramenta útil na prescrição de exercícios (SJODIN *et al.*, 1981; JONES & CARTER, 2000; SIMÕES *et al.*, 2000; BILLAT *et al.*, 2003).

Para fins práticos, a identificação da transição metabólica tem sido feita submetendo-se o sujeito a esforços com cargas progressivamente mais elevadas e utilizando-se o lactato sanguíneo como marcador. A determinação do limiar pode ser feita baseando-se no desvio da linha de base da concentração circulante de lactato (Lan) ou na intensidade de trabalho correspondente a uma concentração fixa de lactato circulante (OBLA).

O primeiro método fundamenta-se no fato de que o aumento não linear da concentração de lactato sanguíneo em relação à intensidade do exercício indica a transição do metabolismo, conforme definiram Kinderman *et al.* (1979). Já o segundo procedimento assume o princípio de que até uma determinada concentração circulante de lactato, ocorre equilíbrio entre a produção muscular e a remoção desse substrato da circulação, conforme postularam Sjodin & Jacobs (1981) e Heck *et al.* (1985).

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

Com base nessas informações, desenvolvemos, em nosso laboratório, um teste para determinar o lactato sanguíneo mínimo durante exercício de natação, utilizando os princípios básicos do TLM proposto por Tegtbur *et al.* (1993), adaptado às condições do rato (VOLTARELLI *et al.*, 2002). O LSM de ratos sedentários (VOLTARELLI *et al.*, 2002) foi

obtido na carga média calculada de $4,9 \pm 0,1\%$ do peso corporal do animal na concentração média de lactato sanguíneo calculada de $7,2 \pm 0,2 \text{ mmol/L}$.

Por questão meramente matemática, o valor lactacidêmico no momento do início do teste progressivo, na metodologia proposta originalmente para seres humanos (TEGTBUR *et al.*, 1993), não é incluído nos cálculos para se determinar a transição metabólica através do valor mínimo de lactato (LSM) e respectiva carga de exercício, obtidos a partir da curva em forma de “U”. Esse valor é inserido no gráfico separadamente dos valores de lactato sanguíneo referentes à porção progressiva do teste e produz uma figura contendo os valores do lactato sanguíneo, após indução da acidose metabólica, isolada da curva do teste progressivo. Em nosso estudo (VOLTARELLI *et al.*, 2002) optamos por confeccionar nossas figuras seguindo o modelo mostrado no estudo original de Tegtbur *et al.* (1993). Tal procedimento, no entanto, foi questionado devido à não-inclusão das concentrações-pico de lactato para a caracterização da curva.

Pensando nisso, propomos, no presente estudo, uma nova maneira de determinação da transição metabólica obtida através do teste do lactato mínimo aplicado em ratos durante exercício de natação, ou seja, sugerimos calcular os valores de concentração de lactato sanguíneo *versus* tempo de exercício (min), com a inserção dos valores de pico de lactato obtidos através da indução metabólica.

Essa proposta visou quantificar a intensidade de esforço desses animais e comparar os resultados obtidos com a proposta anteriormente utilizada, a fim de se detectarem, ou não, possíveis diferenças entre elas.

Como podemos observar nas Figuras 1 e 2, foi possível determinar os valores referentes à transição metabólica de apenas um rato, a título de exemplo, através do teste do lactato mínimo efetuando-se as duas propostas, sem alteração significativa nos valores de concentração de

lactato sanguíneo dos animais. Esses resultados mostraram-se semelhantes aos obtidos por Voltarelli *et al.* (2002).

Após a determinação das cargas médias de exercício (% do peso corporal) de todos os animais, correspondentes à transição metabólica, através de procedimento estatístico de regressão linear, não foi observada diferença estatística quando comparadas as relações concentração de lactato sanguíneo *versus* carga de exercício e concentração de lactato sanguíneo *versus* tempo de exercício (Tabela 1). Tais valores de intensidade de exercício, em relação ao peso corporal, foram semelhantes aos encontrados por Voltarelli *et al.* (2002), durante a realização do teste do lactato mínimo adaptado às condições do rato, e por Gobatto *et al.* (2001), durante a efetuação de testes com cargas fixas para a determinação e verificação da máxima fase estável de lactato.

CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, pudemos concluir que:

- o conjunto dos resultados do presente estudo mostra a adequação do protocolo do TLM aplicado a ratos durante exercício de natação;
- a aplicação de uma nova proposta de quantificação de esforço, utilizando-se o TLM (incluindo-se os valores de lactato de pico nos cálculos matemáticos), mostrou-se igualmente eficiente ao procedimento normalmente utilizado (exclusão dos valores de lactato de pico) quando da determinação das variáveis correspondentes à transição metabólica;
- visto que o presente trabalho trata-se de padronização de um protocolo de teste em animais, acreditamos serem pertinentes a inclusão e a adequação de novos meios de análise dos resultados obtidos.

METABOLIC TRANSITION AND LACTATE MINIMUM TEST IN RATS: NEW PROPOSAL OF EFFORT QUANTIFICATION

ABSTRACT

The progressive part of lactate minimum test (LMT) begins after induction of metabolic acidosis, followed by resting, aiming to reach the peak of lactate [LAC_{peak}], to achieve the “U” shape curve. However, [LAC_{peak}] is not inserted into the

calculations. The present study aimed to suggest a new proposal of determination of metabolic transition (MT) by LMT, or either, to evaluate the curve [LAC] *versus* time of exercise (A) instead of [LAC] *versus* exercise intensity (B), including the [LAC_{peak}] value. Wistar rats, adults (90 days) and non-exercised ones were evaluated by LMT for determination of minimum blood lactate (MBL). The MBL values, when analyzed the curve (A), did not show difference if compared with the values obtained by curve (B). There was not difference between exercise loads obtained in both curves. We suggest, then, a potential application of the new proposal to estimate the MBL in rats.

Key words: Lactate minimum test. Metabolic transition. Rats.

REFERÊNCIAS

- BILLAT, V.L; SIRVENT, P; KORALSZTEIN, J.P; MERCIER, J. The concept of maximal lactate steady state: a bridge between biochemistry, physiology and sport science (review). **Sports Medicine**, New Zealand, 33(6): 407-426, 2003.
- BROOKS, G.A. Anaerobic threshold: review of the concept and directions for future research. **Medicine and Science of Sports Exercise**, Baltimore, 7(1): 22-31, 1985.
- CAMPBELL, M.E; HUGHSON, R.L; GREEN, H.J. Continuous increase in blood lactate concentration during different ramp exercise protocols. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, 66 (3): 1104-1107, 1989.
- CONNETT, R.J; GAYESKI, T.E; HONIG, C.R. Lactate accumulation in fully aerobic working dog gracilis muscle. **American Journal of Physiology**, Baltimore, 246: H120-H128, 1981.
- GOBATTO, C.A; MELLO, M.A.R; SIBUYA, C.Y; AZEVEDO, J.R.M; SANTOS, L.A; KOKUBUN, E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. **Comparative Biochemistry Physiology**, Vancouver, 130: 21-27, 2001.
- HECK, H; A. MADER; G. HESS; S. MUCK and W. HOLLMAN. Justification of the 4.0 mmol/L lactate threshold. **International Journal of Sports Medicine**, Stuttgart, 6: 117-130, 1985.
- JONES, A. M. and CARTER, H. The effect of endurance training on parameters of aerobic fitness. **Sports Medicine**, New Zealand, 29: 373-376, 2000.
- JONES, A. M. and J. H. DOUST. The validity of the lactate minimum test for determination of the maximal lactate steady state and physiological correlates to 8 km running performance. **Medicine and Science of Sports Exercise**, Baltimore, 30: 1304-1313, 1998.
- KINDERMAN, W; G. SIMON and J. KEUL. The significance of the aerobic-anaerobic transition for the determination of work load intensities during endurance training. **European Journal of Applied Physiology**, Heidelberg, 42: 25-34, 1979.
- RIBEIRO, L; BALIKIAN, P; MALACHIAS, P; BALDISSERA, V. Stage length, spline function and lactate minimum swimming speed. **Journal of Sports Medicine and Physician Fitness**, Torino, 43(3): 312-318, 2003.
- SIMÕES, H.G; CAMPBELL, C.S.G; TANGO, M.H; MELLO, F; MAZIERO, D.C; BALDISSERA, V. Lactate minimum test in swimming relationship to performance and maximal lactate steady state. **Medicine and Science of Sports Exercise**, Baltimore, 32: S161, 2000.
- SJODIN, B. and I. JACOBS. On set of blood lactate accumulation and marathon running performance. **International Journal of Sports Medicine**, Stuttgart, 2: 23-26, 1981.
- TEGTBUR, U; M. W. BUSSE and K. M. BRAUMANN. Estimation of individual equilibrium between production and catabolism during exercise. **Medicine and Science of Sports Exercise**, Baltimore, 25(5): 620, 627, 1993.
- TEGTBUR, U; MACHOLD, H; MEYER, H; STORP, D; BUSSE, M.W. Determining the extent of extensive physical performance in patients with coronary heart disease. **Zeitschrift für Kardiologie**, Toronto, 90: 627-645, 2001.
- VOLTARELLI, F.A.; GOBATTO, C.A.; MELLO, M.A.R. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, 35: 1389-1394, 2002.
- VOLTARELLI, F.A; MELLO, M.A; GOBATTO, C.A. Limiar anaeróbico determinado pelo teste do lactato mínimo em ratos: efeito dos estoques de glicogênio muscular e do treinamento físico. **Revista Portuguesa de Ciências do Desporto**, Porto, 4(3): 16-25, 2004.
- WASSERMAN, K. and M. B. MC. ILROY. Detecting the threshold of anaerobic metabolism in cardiac patients during exercise. **American Journal of Cardiology**, New York, 14: 844-852, 1965.

Recebido em 13/01/05

Revisado em 28/04/05

Aceito em 15/05/05

Endereço para correspondência: Fabrício Azevedo Voltarelli. Departamento de Educação Física-Laboratório de Biodinâmica, Universidade Estadual Paulista-Unesp, Campus Rio Claro, Avenida 24-A, número 1515 – Bairro: Bela Vista, CEP: 13506-900, Rio Claro/SP. E-mail: faunesp8@yahoo.com.br