



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

PATRICIA CHIMIN

**RELAÇÃO ENTRE FATORES MORFOFISIOLÓGICOS E
INDICADORES DE DESEMPENHO DERIVADOS DO
MODELO DE CARGA CRÍTICA NA NATAÇÃO
EM RATOS WISTAR**

Londrina
2009

PATRICIA CHIMIN

**RELAÇÃO ENTRE FATORES MORFOFISIOLÓGICOS E
INDICADORES DE DESEMPENHO DERIVADOS DO
MODELO DE CARGA CRÍTICA NA NATAÇÃO
EM RATOS WISTAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Educação Física da Universidade Estadual de Londrina – UEM/UEL, como resultado parcial à obtenção do título de Mestre em Educação Física.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Yuzo Nakamura

Londrina
2009

**Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

C538r Chimin, Patricia.

Relação entre fatores morfofisiológicos e indicadores de desempenho derivados do modelo de carga crítica na natação em ratos Wistar / Patricia Chimin. – Londrina, 2009.
64 f. : il.

Orientador: Fábio Yuzo Nakamura.

Dissertação (Mestrado em Educação Física) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Educação Física e Esporte, Programa de Pós-Graduação em Educação Física, 2009.

Inclui bibliografia.

1. Carga crítica – Exercícios de natação com ratos – Teses. 2. Medidas morfofisiológicas – Desempenho – Ratos Wistar – Teses. I. Nakamura, Fábio Yuzo. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Educação Física e Esporte. Programa de Pós-Graduação em Educação Física. III. Título.

CDU 612:796

PATRICIA CHIMIN

**RELAÇÃO ENTRE FATORES MORFOFISIOLÓGICOS E
INDICADORES DE DESEMPENHO DERIVADOS DO
MODELO DE CARGA CRÍTICA NA NATAÇÃO
EM RATOS WISTAR**

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fábio Yuzo Nakamura
Orientador

Profa. Dra. Solange Marta Franzói de
Moraes

Prof. Dr. Claudio Alexandre Gobatto

Londrina, 04 de maio de 2009.

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, José Carlos e Maria de Lourdes e também aos meus irmãos, Robson e Caio por todo o apoio que me deram durante toda essa jornada

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por iluminar meu caminho e me dar forças para continuar.

Agradeço também imensamente minha família (pais e irmãos) por todo o apoio durante o tempo que estive longe, tanto nos momentos bons quanto nos momentos não tão bons. Agradeço também pelo apoio da minha avó Aparecida, mesmo que às vezes não entendesse o porquê de eu estar tão longe. Muito obrigada mesmo!

Não poderia deixar de agradecer ao meu namorado Luiz Augusto (Lulo) por toda a ajuda quando me mudei para Londrina, e também durante todo o mestrado. Obrigada pelo carinho e pelas conversas! Da mesma forma, tenho uma imensa gratidão por toda sua família: Jair, Maria Angélica e João Paulo. Obrigada por sempre se preocuparem comigo e por me tratarem como uma filha também!

Ao Prof. Dr. Fábio Yuzo Nakamura pela orientação, conversas, ensinamentos e por toda confiança depositada em mim.

À professora Jeane Barcelos pela amizade, pelas conversas, conselhos e por me mostrar que ainda há muito que se fazer pela área.

Ao professor Jefferson Cardoso Rosa pelas aulas de estatística e pela amizade.

Ao meu companheiro de mestrado Lúcio Flávio pelos risos no laboratório e por toda a ajuda, e também ao Nilo Massaru Okuno por todas as conversas e pelo apoio. Obrigada também ao GEAFIT e aos seus integrantes pelas apresentações de trabalhos e amizade. Com certeza foi uma experiência muito boa para minha formação.

À professora Solange Marta Franzói de Moraes, assim também como a toda sua família, por ter me recebido em sua casa, por toda a ajuda durante as coletas e pela amizade. Sua ajuda foi fundamental para a realização desse trabalho.

Um agradecimento especial para o pessoal da Universidade Estadual de Maringá,

principalmente ao agora mestre, Felipe Natali, que deixava suas coisas de lado para me auxiliar durante as análises dos meus dados e pela amizade.

Às técnicas Elizete Rosa dos Santos e Valéria Schoffen Romão Carrascoza pela ajuda durante as coletas e também pela amizade no tempo que estive em Maringá. Aos professores Célia Regina de Godoy Gomes e Celso Ivan Conegero pelo auxílio nas análises. Ao Renato Nachbar e ao ICB- USP pela análise enzimática.

Aos amigos Rômulo Fernandes, Marcio Kawano, Diego Leite, Cássio Gustavo, Aline Gerage, Débora Alonso e Camilla Kawanishi pelo apoio durante a realização do mestrado. E um agradecimento especial para Camila Rosa pela amizade e pela companhia nas corridas de quarta-feira.

Aos meus amigos de longa data, que mesmo longe sempre me deram muito apoio.

À todos que de uma maneira ou de outra participaram para meu crescimento e desenvolvimento acadêmico, muito obrigada!

CHIMIN, Patricia. **Relação entre fatores morfofisiológicos e indicadores de desempenho derivados do modelo de Carga Crítica na natação em ratos Wistar**. 2009. 60f. Dissertação (Mestrado em Educação Física) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

RESUMO

O teste de Potência Crítica (PC) tem sido muito usado nos últimos anos, e vários estudos vêm buscando compreender o real significado fisiológico de seus índices aeróbio e anaeróbio. Testes realizados até exaustão na intensidade do índice aeróbio obtido por esse modelo de PC foram realizados, entretanto, as variáveis fisiológicas medidas durante os esforços não se mantiveram em estado estável, além dos sujeitos não suportarem longos períodos de tempo, como seria esperado. Como ainda não há um consenso sobre as variáveis fisiológicas que determinam o tempo de exercício na intensidade da PC, outras variáveis, como, por exemplo, variáveis morfofisiológicas que sejam capazes de predizê-la, tornam-se importantes para o melhor entendimento de seu significado. Dessa forma, os objetivos do presente estudo foram: (1) verificar o tempo de tolerância na intensidade de 100% da Carga Crítica (Ccrit) individual, e (2) verificar se os parâmetros morfofisiológicos têm alguma relação com o desempenho e o tempo de tolerância na natação. Vinte ratos machos da linhagem Wistar, previamente adaptados ao exercício de natação, foram submetidos a testes preditivos para o cálculo da Ccrit e da capacidade de nado anaeróbio (CNA), pela equação não-linear, e subsequentemente, foram submetidos a exercício suportando 100% da Ccrit até a exaustão. Vinte e quatro horas após o exercício, os animais foram anestesiados para a coleta de sangue e tecidos para posterior análise de hematócrito, contagem de hemácias, relação capilar/fibra, área transversal da fibra muscular do sóleo e do gastrocnêmio, tipagem de fibra e atividade da citrato sintase. Os resultados mostraram que os valores de Ccrit variaram de 3,7 a 7,1% do peso corporal, enquanto que o tempo de tolerância variou entre 350 e 2853 segundos. Foram encontradas fortes correlações entre os próprios indicadores (Ccrit, CNA e tempo de tolerância), sendo que todos atingiram significância estatística ($P < 0,05$). A Ccrit e o tempo de tolerância se correlacionaram com a porcentagem de fibras oxidativas ($r = 0,473$; $P = 0,035$ e $r = -0,473$; $P = 0,035$, respectivamente) e com a porcentagem de fibras glicolíticas ($r = -0,590$; $P = 0,006$ e $r = 0,590$; $P = 0,006$, respectivamente). A CNA apresentou correlação moderada com a porcentagem de fibras glicolíticas, porém não significativa ($r = 0,41$; $P = 0,1654$). Somente o tempo de tolerância se correlacionou com a área média das fibras do músculo sóleo ($r = 0,569$; $P = 0,009$). As demais variáveis apresentaram correlações fracas com a Ccrit e o tempo de tolerância. A partir dos resultados, pode-se concluir que o modelo de Ccrit para natação em ratos deve ser usado com cautela, uma vez que parece não estimar a intensidade do limiar anaeróbio. Além disso, as correlações com as variáveis morfofisiológicas indicam que nenhuma delas pode explicar sozinha o desempenho na intensidade da Ccrit.

Palavras-chave: Carga crítica. Desempenho. Medidas morfofisiológicas. Natação. Ratos Wistar.

CHIMIN, Patricia. **Relation among morphophysiological factors and performance indexes derived from critical load model in swimming Wistar rats.** 2009. 60p. Dissertation (Master's Degree in Physical Education) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

ABSTRACT

Critical Power test (CP) has been very used in the last few years, and a lot of studies seek to understand the real physiological meaning of its aerobic and anaerobic indexes. Exhaustion tests on the intensity of the aerobic index given by this CP model were done, however, the physiological variables measured during work were not stable, besides the subjects could not take long times of exercise, as expected. As there is not a consensus about the physiological variables that determine the time of exercise on the CP intensity, others variables, for example, morphophysiological that could be able to predict it, become important to better understand its meaning. So, the aims of the present study were: (1) verify the time to exhaustion on 100% of individual critical load (CL) intensity, and (2) verify if morphophysiological parameters correlate with performance and time to exhaustion in swimming. Twenty male Wistar rats, previously adapted to swimming exercise, were submitted to predictive tests to calculate CL and anaerobic swim capacity (ASC), by non-linear equation. Subsequently, they were submitted to an exercise bearing 100% of CL until exhaustion. Twenty four hours later, the animals were anaesthetize for blood and tissue collection and later analysis of hematocrit, red blood cells count, capillary-to-fiber relationship, soleus and gastrocnemius cross sectional area, fiber type and citrate synthase analysis. The results showed that the CL values varied from 3.7 to 7.1% of body mass, while time to exhaustion varied from 350 to 2853 seconds. Strong relationships were found among the own indexes (CL, ASC and time to exhaustion), and all of them presented statistical significance ($P < 0.05$). CL and time to exhaustion were correlated with proportion of oxidative fiber type ($r = 0.473$; $P = 0.035$ and $r = - 0.473$; $P = 0.035$, respectively) and with proportion of glycolytic fiber type ($r = - 0.590$; $P = 0.006$ and $r = 0.590$; $P = 0.006$, respectively). ASC presented moderate correlation with proportion of glycolytic fiber type, but it was not significant ($r = 0.41$; $P = 0.1654$). Only time to exhaustion was correlated with cross sectional area of soleus muscle ($r = 0.569$; $P = 0.009$). The others variables presented weak correlations with CL and time to exhaustion. From these results, we can conclude that CL model to swimming rats should be used carefully, since it does not seem to estimate the anaerobic threshold intensity. Besides, the correlations with the morphophysiological variables indicate that none of them can explain itself the performance at CL intensity.

Keywords: Critical load. Performance. Morphophysiological measures. Swimming. Wistar rats.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação gráfica do cálculo da Ccrit	28
Figura 2 – Demonstração dos capilares encontrados entre as fibras	31
Figura 3 – Demonstração da análise das imagens para o cálculo da área da fibra do músculo sóleo e do músculo gastrocnêmio	32
Figura 4 – Imagem demonstrativa de lâmina corada para a técnica de NADH- TR	33
Figura 5 – Sistema-teste de ciclóides	34
Figura 6 – Correlação de <i>Spearman</i> entre a Ccrit e o tempo de tolerância	38
Figura 7 – Correlação de <i>Spearman</i> entre o tempo de tolerância e a CNA.....	38
Figura 8 – Correlação de <i>Spearman</i> entre a Ccrit e a CNA.....	39
Figura 9 – Correlação de <i>Spearman</i> entre a Ccrit e a porcentagem de fibras oxidativas.....	39
Figura 10 – Correlação de <i>Spearman</i> entre a Ccrit e a porcentagem de fibras glicolíticas	40
Figura 11 – Correlação de <i>Pearson</i> entre o tempo de tolerância e a porcentagem de fibras oxidativas	40
Figura 12 – Correlação de <i>Pearson</i> entre o tempo de tolerância e a porcentagem de fibras glicolíticas.....	41
Figura 13 – Correlação de <i>Pearson</i> entre a CNA e a porcentagem de fibras glicolíticas	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados descritivos dos valores de Ccrit e de tempo de tolerância (n = 20).....	37
Tabela 2 – Valores dos coeficientes de correlação das comparações entre a Ccrit, tempo de tolerância, área médias das fibras do músculo sóleo e área média das fibras do músculo gastrocnêmio (μm^2)	42
Tabela 3 – Coeficientes de correlação das comparações entre Ccrit e tempo de tolerância com relação C/F, hematócrito (%) e número de hemácias	42

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

% Porcento

%pc Porcentagem do peso corporal

%pc*s Porcentagem do peso corporal por segundo

[la] Concentração de lactato sanguíneo

°C Graus Celsius

Acetil-CoA Acetilcoenzima A

C Carga

C/F Relação capilar por fibra

Ccrit Carga Crítica

cm Centímetro

CNA Capacidade de Nado Anaeróbio

CS Citrato Sintase

CTA Capacidade de Trabalho Anaeróbio

CV Coeficiente de variação

dias.semana⁻¹ Dias por semana

DP Desvio-padrão

DTNB Ácido 5,5-ditiobis(2-nitroenzóico)

EDTA Ácido etilenodiamino tetra-acético

g Gramas

h Hora

H.E. Hematoxilina e Eosina

HCL Ácido clorídrico

HK Hexoquinase

LACmin Lactato mínimo

Lan Limiar anaeróbio

MEEL Máximo Estado Estável de Lactato

MEELv Velocidade do Máximo Estado Estável de Lactato

mg Miligramas

ml Mililitros

ml O₂ min⁻¹.ml⁻¹ Mililitros de oxigênio por minuto por mililitros

mM Milimolar

mmol.l⁻¹ Milimol por litro

NADH-TR Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo – Tetrazolium Reductase

nm Nanometro

P Potência

P Significância estatística

PC Potência Crítica

pc Peso corporal

pH Potencial de hidrogênio

Pp Número de pontos que tocam a estrutura em estudo

Pt Número total de pontos do sistema teste

r Coeficiente de correlação

R² Coeficiente de determinação

s Segundos

Tlim Tempo limite

Tris Tris (Hidroximetil) Aminometano

VC Velocidade Crítica

V_{máx} Velocidade máxima

VO₂ Consumo de oxigênio

VO_{2máx} Consumo máximo de oxigênio

Vv Densidade de volume

μl Microlitro

μm Micrômetro

μm² Micrômetro ao quadrado

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 AVANÇOS EXPERIMENTAIS PARA DETERMINAÇÃO DO LIMAR ANAERÓBIO.....	16
2.2 POTÊNCIA CRÍTICA.....	17
2.3 RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DURANTE EXERCÍCIO NA INTENSIDADE DA PC	20
2.4 INDICADORES DE CAPACIDADE AERÓBIA	22
3 JUSTIFICATIVA	25
4 OBJETIVOS	26
4.1 OBJETIVO GERAL.....	26
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
5 MÉTODOS	27
5.1 ANIMAIS E TRATAMENTO	27
5.2 ADAPTAÇÃO AO MEIO LÍQUIDO	27
5.3 DETERMINAÇÃO DA CARGA CRTÍTICA (CCRIT) E DA CAPACIDADE DE NADO ANAERÓBIO (CNA)	28
5.4 INTENSIDADE DO EXERCÍCIO	29
5.5 COLETA DO MATERIAL.....	29
5.6 CONTAGEM DE HEMÁCIAS NO SANGUE.....	29
5.7 HEMATÓCRITO	29
5.8 ANÁLISES HISTOENZIMOLÓGICA E MORFOLÓGICA	30
5.9 PREPARO DOS CORTES HISTOLÓGICOS	30
5.10 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA	31
5.11 SOBRE AS IMAGENS OBTIDAS	32
5.12 PREPARO HISTOENZIMOLÓGICO DAS FIBRAS MUSCULARES.....	33
5.13 ESTUDO ESTEREOLÓGICO	34
5.14 ANÁLISE DA CITRATO SINTASE	35
5.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA	35

6 RESULTADOS	37
7 DISCUSSÃO	43
8 CONCLUSÕES	47
REFERÊNCIAS	48
ANEXOS	56
ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética.....	57
ANEXO B – Hematoxilina e Eosina.....	59
ANEXO C – NADH-TR (Nicotinamida Adenina Dinucleotídio – Tetrazolium Recuctase)	60

1 INTRODUÇÃO

A maleabilidade do músculo esquelético, a qual permite a remodelagem estrutural do músculo de acordo com alterações na demanda (energética, metabólica, etc), é um fenômeno particular do reino animal. Esta plasticidade é refletida pelos ajustes observáveis na força, resistência e velocidade de contração do músculo esquelético, como resultado da modificação da micro-estrutura muscular, em função da alteração na demanda ambiental. No entanto, há restrições impostas pela relação “custo-benefício” em que quanto maior ou mais complexo o órgão, maior será o “custo” para manutenção orgânica.

Uma teoria unificadora sobre as adaptações estruturais e o mecanismo molecular que conectam o estímulo único do exercício aos ajustes múltiplos que ocorrem após o impacto repetido do estresse muscular ainda não foi identificada ¹.

A partir disso, especula-se que se diferentes pessoas apresentam diferentes performances, mesmo sendo treinadas de maneira similar, essas poderiam apresentar algumas adaptações morfofisiológicas distintas. Uma boa maneira de se testar essa hipótese é realizando exercícios na intensidade do limiar anaeróbio (Lan), em que se espera manutenção por tempo prolongado, sem que haja acúmulo de lactato sanguíneo^{2,3}. A intensidade do Lan é uma boa carga para se testar essa hipótese, pois também já foi mostrado que no término do exercício nessa intensidade, havia estado estável nas respostas de todos os sistemas corporais estudados, a saber: cardiorespiratório, metabólico e equilíbrio ácido-base⁴. Além disso, ela respeita a individualidade biológica, e permite a “normalização” das cargas de trabalho.

Teste invasivos e não invasivos como os utilizados para determinação do máximo estado estável de lactato (MEEL) e potência crítica (PC), respectivamente, buscam encontrar essa intensidade. Poucos pesquisadores investigaram, em humanos, os tempos de tolerância determinados a partir do testes de potência crítica e encontraram resultados conflitantes em relação ao tempo de duração, que variou entre 20 e 40 minutos^{5,6,7}. Em em mamíferos, não foram encontrados estudos sobre o tempo de tolerância na intensidade de potência crítica.

Também já se buscou verificar se seriam fatores fisiológicos (por exemplo, concentração de lactato sanguíneo ([La]), piruvato, estado de reoxidação, concentrações de amônia, concentrações de bicarbonato, etc) que influenciariam a duração dos exercícios nessa intensidade⁸, porém, ainda não se identificou qual a causa fisiológica do término do exercício.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 AVANÇOS EXPERIMENTAIS PARA DETERMINAÇÃO DO LIMAR ANAERÓBIO

Com a necessidade de se compreender o metabolismo durante o exercício, diferentes testes e protocolos são utilizados. Com a possibilidade do uso de animais para realizar medidas invasivas, esses testes têm sido adaptados a eles.

Dentre os testes utilizados pode-se citar o teste do MEEL³, o teste do lactato mínimo (LACmin)⁹ e o teste de PC¹⁰.

O conceito de MEEL foi proposto primeiramente por Margaria *et al.*¹¹ e Saiki *et al.*¹², usando de cinco a oito cargas de exercícios constantes e independentes para determiná-lo. Esse teste consiste em realizar esforços durante determinado período de tempo (geralmente 30 minutos)³, em que a concentração de lactato sanguíneo não exceda um valor pré-determinado durante um intervalo de tempo. Em 2001, Gobatto *et al.*¹³ determinaram o MEEL na natação em ratos sedentários e treinados. O teste envolveu esforços contínuos e com apresentação aleatória das cargas equivalentes a 5, 6, 7, 8, 9 e 10% do peso corporal (pc), durante 20 minutos. Os animais realizaram uma carga por dia, em dias alternados. Notou-se que os ratos sedentários apresentavam MEEL a 5,5 mmol.l⁻¹ de lactato sanguíneo, com sobrecarga de 5 e 6% do pc. Com as outras cargas houve um aumento progressivo da concentração de lactato. Já os ratos treinados alcançavam o MEEL com uma sobrecarga de 8% do pc.

Tegtbur *et al.*⁹ desenvolveram um teste chamado de teste do LACmin para determinar o MEEL em humanos. O teste de LACmin consiste na realização de uma indução à acidose, por meio de exercício de curta duração e intensidade supramáxima, elevando a concentração sanguínea de lactato. Após oito minutos da indução à acidose, o protocolo de teste prevê o início de um protocolo incremental. Nas cargas inferiores a do MEEL, o lactato produzido durante a indução anaeróbia tende a ser oxidado, reduzindo a concentração no sangue. Quando a intensidade referente ao MEEL é atingida, a produção de lactato é igual sua remoção. Assim, cargas imediatamente mais intensas passam a produzir lactato em

relação à carga anterior, invertendo a fase da cinética. Portanto, o ponto mínimo que o lactato sanguíneo assume na curva em “U” da lactacidemia em função da intensidade de exercício, corresponde à intensidade do LACmin.

Em 2002, Voltarelli *et al.*¹⁴ adaptaram o teste de LACmin para ratos durante a natação. Este protocolo foi novamente adaptado e ajustado por Araujo *et al.*¹⁵. Após testar 4 diferentes protocolos de indução à acidose, os autores verificaram que o melhor protocolo de teste consiste em os animais realizarem dois esforços, com sobrecarga de 13% do pc, separados por repouso passivo de 30 segundos, sendo o primeiro esforço de 30 segundos e o segundo esforço até a exaustão, para elevação da [la]. Após 9 minutos de recuperação, os animais iniciaram o protocolo progressivo. O Lan foi obtido a $5,76 \pm 0,47 \text{ mmol.l}^{-1}$ de lactato sanguíneo, e não foi diferente do valor do MEEL (que ocorreu entre 4,5 e 5,5% do pc).

Estudos utilizando-se de meios não invasivos para se avaliar o desempenho também foram feitos. Dentre eles pode-se citar o teste de potência crítica.

2.2 POTÊNCIA CRÍTICA

Em experimento utilizando pequenos grupos musculares em diferentes cargas constantes que levavam a exaustão, Monod e Scherrer¹⁰ identificaram uma relação hiperbólica entre a potência realizada e o tempo até a exaustão. A partir daí, a assíntota dessa relação foi denominada PC, e representa a carga que teoricamente um grupo muscular pode manter sem que ocorra a fadiga.

PC é um conceito teórico que representa a maior potência proveniente de fontes energéticas aeróbias, e que pode ser mantida por tempo indeterminado. Desta forma, sugere-se que quando a carga é inferior ou igual a PC, não ocorre exaustão¹⁶. Um segundo parâmetro que pode ser estimado a partir da relação entre intensidade de exercício e tempo é a capacidade de trabalho anaeróbio (CTA). A CTA corresponde ao trabalho total realizado acima da PC proveniente das reservas energéticas intramusculares, incluindo glicogênio e o oxigênio vindo da mioglobina^{10,17}, representando desta forma uma medida da

capacidade anaeróbia do indivíduo^{18,19}.

Em uma tentativa de estender o conceito de PC para exercícios que envolviam grandes grupos musculares, Moritani *et al.*¹⁷ aplicaram o modelo de potência crítica em cicloergômetro. Foram realizados testes em que os sujeitos inspiravam concentrações normais de oxigênio e algumas concentrações menores, que permaneciam dentro de uma Bolsa de Douglas durante o exercício. Foi encontrado que quando os indivíduos realizavam o exercício inspirando gases com menores concentrações de oxigênio, houve uma concomitante redução na inclinação da relação potência e tempo, enquanto o intercepto não foi alterado. A partir daí, foi evidenciado a natureza aeróbia do parâmetro PC. Além do cicloergômetro, o conceito de PC foi aplicado em exercício na esteira²⁰, no caiaque²¹ e na natação²². Como nessas modalidades a variável que indica a intensidade é a velocidade, o parâmetro aeróbio estimado é chamado velocidade crítica (VC).

Três equações matemáticas equivalentes têm sido utilizadas para estimar a PC e CTA. As três equações são: $T_{lim} = CTA / (P - PC)$ – não linear; $P = PC + (CTA \cdot 1 / T_{lim})$ – linear potência-1/tempo e $P = CTA + (PC \cdot T_{lim})$ – linear trabalho-tempo²³. Gaesser *et al.*²⁴ compararam as estimativas de PC a partir das três equações, e verificaram que cada equação fornece uma estimativa diferente dos parâmetros. Dessa forma, os dados devem ser tratados respeitando-se a alocação das variáveis como dependentes e independentes.

A utilização do modelo de potência crítica é atrativa porque estima os parâmetros PC e CTA utilizando apenas um ergômetro e um cronômetro. Apesar dessa fácil aplicabilidade, surge uma consideração acerca da duração dos testes e sobre as cargas a serem utilizadas. Como a PC é significativamente influenciada pela duração dos testes preditivos, então, sugere-se que ela deve ser calculada a partir de uma ampla duração de testes para que a inércia aeróbia seja minimizada^{19,25}. A inércia aeróbia refere-se ao atraso do metabolismo aeróbio em se ajustar ao seu valor de estado estável, sendo caracterizada pelo aumento exponencial do consumo de oxigênio (VO_2) no início do exercício.

Vários estudos compararam os resultados nos testes de PC com o MEEL, que é considerado um método “padrão ouro” para determinação da transição de exercício aeróbio-anaeróbio^{13,26,27,28}. Além disso, a PC é altamente relacionada com o consumo máximo de oxigênio ($VO_{2máx}$)^{20,29,30} e com o limiar ventilatório¹⁷.

Na tentativa de verificar a relação entre a VC e a velocidade do

máximo estado estável de lactato (MEELv), Smith e Jones³¹ submeteram oito sujeitos do sexo masculino a um protocolo incremental para determinação do $\dot{V}O_{2\text{máx}}$ e do $\dot{V}O_{2\text{máx}}$, e mais oito sessões subseqüentes para a determinação da VC e da MEELv. Não foi encontrada diferença significativa entre os parâmetros analisados, sugerindo que essas variáveis ocorrem na mesma faixa de intensidade. Porém, o intervalo de confiança (95%) demonstrou baixa concordância entre elas. Apesar de não ter sido encontrada diferença significativa, houve uma tendência de a VC superestimar a MEELv.

Dekerle *et al.*³² investigaram se a VC da natação correspondia a MEELv. Para isso oito nadadores participaram do estudo. O protocolo foi realizado dentro de 14 dias, em que os sujeitos realizaram um teste máximo de 400m para estimar a velocidade máxima ($V_{\text{máx}}$); três a quatro testes submáximos (75-90% $V_{\text{máx}}$) para determinar a MEELv, e quatro testes exaustivos (95, 100, 105 e 110% da $V_{\text{máx}}$) para o cálculo da VC. O principal resultado encontrado foi que a VC parece não representar a velocidade máxima que pode ser mantida durante a natação por um longo período de tempo, sem aumento concomitante na concentração de lactato.

Em 2002, Marangon *et al.*³³ submeteram ratos Wistar sedentários a quatro testes de natação com cargas (C) contínuas de 9, 11, 13 e 15% do pc, distribuídas aleatoriamente e em dias consecutivos, nadando em cada uma delas até a exaustão. Com isso, foram verificados os tempos-limite (T_{lim}) em cada intensidade e aplicados à equação $C = C_{\text{crit}} + CTA \cdot 1/T_{\text{lim}}$, em que a carga crítica (C_{crit}) correspondeu ao y-intercepto e a CTA ao coeficiente angular da reta de regressão. Para a verificação do MEEL em 20 minutos, os animais nadaram em quatro intensidades contínuas baseadas nos resultados anteriormente obtidos (90% da C_{crit} , 100% da C_{crit} , $T_{\text{lim}20}$ e $T_{\text{lim}15}$). Os autores observaram que o MEEL correspondeu à intensidade de carga crítica.

Em 2005, Billat *et al.*³⁴ verificaram se a VC poderia ser utilizada como indicador de desempenho e se havia diferenças entre três diferentes linhagens de animais e entre os gêneros. O protocolo utilizado foi semelhante ao usado para humanos consistindo de quatro cargas em dias diferentes. O procedimento descrito no estudo demonstrou que a VC pode ser aplicada a modelos animais. Os autores não encontraram diferenças significativas entre a VC e o MEEL na intensidade estimada a 75% do $\dot{V}O_{2\text{máx}}$, porém houve diferença entre as linhagens mas não

entre os gêneros.

A determinação da Ccrit em modelos animais é relevante, pois permite que os conhecimentos sejam aplicados em humanos. Eles também permitem procedimentos invasivos que possibilitam o entendimento de mecanismos celulares e moleculares relacionados ao exercício. Além disso, com a adaptação do modelo animal para estudo de doenças endócrino-metabólicas, o desenvolvimento de testes representam uma importante conquista para a avaliação acurada dos esforços feitos por esses animais, e como consequência, uma avaliação das respostas fisiológicas ao exercício.

2.3 RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DURANTE EXERCÍCIO NA INTENSIDADE DA PC

Poucos estudos têm analisado as respostas fisiológicas na intensidade da PC. O tempo até a exaustão na PC tem sido reportado entre 10 e 60 minutos, dependendo em parte do modelo de exercício e da amostra de sujeitos^{5,8,35,36,37}. A identificação de um marcador de intensidade no qual o exercício é sustentável por tempo prolongado é útil para prescrição de treinamento ou para acessar mudanças após intervenções. Portanto, o tempo até que a exaustão voluntária ocorra tem sido considerado um indicador relevante da habilidade do atleta sustentar o exercício. No entanto, os fatores fisiológicos determinantes desse tempo de tolerância são pouco conhecidos.

Numerosos estudos têm examinado o conceito de PC em relação ao tempo de tolerância, mas poucos examinaram as respostas fisiológicas nesta intensidade. O primeiro estudo a verificar essas respostas foi de Housh *et al.*⁵. Os autores investigaram o VO_2 , a frequência cardíaca e a resposta do lactato plasmático no limiar de fadiga (similar a PC), e estimaram o tempo que podia ser tolerado nessa intensidade. Os resultados encontrados não suportaram a validade do limiar de fadiga como uma intensidade que poderia ser mantida por longo período de tempo sem que ocorresse fadiga, pois houve aumento dos índices avaliados e o tempo de tolerância no exercício permaneceu entre 10 e 17 minutos.

Em 2002, Brickley *et al.*³⁶ recrutaram homens treinados que realizaram testes preditivos para o cálculo da PC individual, e em uma outra ocasião,

esses indivíduos realizaram um exercício até a exaustão na intensidade da PC, todos realizados em cicloergômetro. Foram analisados a frequência cardíaca, o VO_2 e a [la] durante todo o teste. Todas as variáveis aumentaram com o passar do tempo sem sinais de estado estável, e o tempo de permanência no exercício variou entre 20 e 40 minutos.

Com isso, os autores refutaram a afirmação que a PC é uma intensidade que pode ser mantida por “longo período de tempo”¹⁰ e corroboraram o estudo de Jenkins e Quigley³⁸ em que o exercício na intensidade da PC pode somente ser mantido por aproximadamente 30 minutos, em média.

Baron *et al.*⁸ também verificaram as respostas fisiológicas do exercício realizado até a exaustão na intensidade da PC em ciclistas. Eles encontraram que o tempo de tolerância nessa intensidade foi em média de 22 minutos, dentro da faixa reportada previamente³⁶.

O exercício até a exaustão na PC foi associado com mudanças na [la], na relação lactato/piruvato, concentração de amônia, variáveis respiratórias, entre outras; e dessa forma suporta a idéia de que a PC não representa uma intensidade de exercício estável.

Em 2006 Okudan *et al.*³⁷ investigaram as relações entre a PC, potência aeróbia máxima e Lan, além de verificarem se o tempo de exercício até a exaustão na intensidade da PC poderia ser usado como um índice para determinação de *endurance*.

Os autores encontraram que a PC foi menor que a carga correspondente ao $VO_{2máx}$, mas foi maior que a carga correspondente ao Lan. Também encontraram que o tempo de exercício nessa intensidade foi em média 21 minutos e não foi correlacionado tanto com o $VO_{2máx}$, quanto com o Lan. Os autores concluíram que a partir dessa falta de correlação entre esses parâmetros, a CP não pode ser usada como um índice para determinação da performance.

A partir desses estudos, uma definição mais apropriada para a PC seria “a maior intensidade não estável que pode ser mantida por um período de tempo que exceda 20 minutos, mas geralmente não mais que 40 minutos”, assim como já foi observado por Brickley *et al.*³⁶.

Como ainda não há um consenso sobre as variáveis fisiológicas que determinam o tempo de exercício na intensidade da PC, outras variáveis, como, por exemplo, variáveis morfofisiológicas que sejam capazes de predizê-la, tornam-se

importantes para o melhor entendimento de seu significado.

2.4 INDICADORES DE CAPACIDADE AERÓBIA

As estruturas dos humanos e animais são desenhadas de forma a serem econômicas, ou seja, devem ser ajustadas à sua demanda funcional. Isso sugere uma relação “custo-benefício” em que quanto maior o órgão, maior será o “custo” em termos de construção e manutenção orgânica.

Basicamente, nenhuma estrutura extra é formada e/ou mantida a menos que seja requerida para satisfazer às necessidades funcionais do organismo³⁹. Essa relação foi vista, primeiramente, em estudo sobre a relação entre estrutura e função do sistema respiratório dos mamíferos, e tem sido estabelecido como uma hipótese de desenho econômico desde então⁴⁰. Esse desenho ótimo significa um ajuste fino entre estrutura e função. Como resultado, uma característica estrutural torna-se um fator que passa a determinar, juntamente com outras, o desempenho funcional. Para se testar essa hipótese, a relação com o $VO_{2máx}$ tem sido usada em todos os modelos de variação (comparação intra-e interespecies de diferentes tamanhos e desempenhos).

Tem sido demonstrado que as características morfométricas estão relacionadas com a potência aeróbia⁴¹.

O músculo esquelético representa cerca de 50% de toda a massa corporal na maioria dos mamíferos, dependendo do seu tamanho. Durante o repouso, a musculatura é responsável por somente uma fração do gasto energético, já durante o exercício, cerca de 90% do oxigênio e do fluxo sanguíneo são redistribuídos para os membros ativos^{42,43,44}. A entrega de oxigênio para os músculos deve ocorrer de maneira específica ao tipo de fibra, volume de mitocôndria, densidade capilar e concentração de enzimas oxidativas.

Poole e Mathieu-Costello⁴⁵ observaram que ratos treinados em corrida apresentaram maior relação de capilares por fibra muscular nos músculos sóleo e plantar que os ratos sedentários. Verificaram também que a relação de capilares por fibra e o volume mitocondrial foram significativamente correlacionados para ambos os músculos, suportando a hipótese que o leito capilar dos músculos é

desenhado primeiramente para atender ao requerimento de oxigênio da fibra. O treinamento também aumentou a atividade da enzima citrato sintase (CS).

Hoppeler⁴⁶ analisou o $VO_{2máx}$ durante a corrida e estimou o volume mitocondrial da musculatura esquelética de oito espécies de mamíferos (alcançando em tamanho desde o rato até o cavalo), e mostrou que a mitocôndria consumia $4,56 \pm 0,61 \text{ ml O}_2 \text{ min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$ de volume mitocôndrial, e a fração da fibra muscular ocupada pela mitocôndria foi usada para descrever sua capacidade oxidativa. Com isso o autor pôde concluir que a capacidade oxidativa do músculo é linearmente dependente do volume absoluto de mitocôndrias que contém.

A capacidade de entrega de oxigênio para as células pode ser modificada tanto pelo aumento da densidade capilar quanto pela alteração da composição sanguínea (concentração de hemoglobina). Conley *et al.*⁴⁷ e Kayar *et al.*⁴⁸ compararam espécies “atléticas” com “não-atléticas” cujo $VO_{2máx}$ diferia em até 2,5 vezes. Foi encontrado que o volume dos capilares era maior em espécies atléticas, assim como também foi verificado que elas possuíam hematócrito 1,8 vezes maior que as espécies não atléticas.

Em estudo de revisão, Weibel *et al.*⁴¹ concluíram que as mitocôndrias e os capilares sanguíneos juntos determinavam a capacidade aeróbia do músculo entre várias espécies de mamíferos. Já Rivero *et al.*⁴⁹ verificaram que o fator que determina o sucesso na corrida em cavalos é a composição e o tamanho das fibras musculares.

Howlett *et al.*⁵⁰ tentaram explicar as diferenças intrínsecas na capacidade de endurance na corrida em ratos selecionados para baixa e alta capacidade de corrida ao longo de sete gerações. Dentre várias diferenças, os autores identificaram que a concentração de algumas enzimas, como a CS e β -hidroxiacil-CoA desidrogenase, eram 40% maiores nos animais selecionados para alta capacidade de *endurance*, enquanto que fosfofrutoquinase foi significativamente maior nos animais com baixa capacidade para corrida. Já a concentração de hexoquinase (HK) foi a mesma para ambos os grupos. Segundo os autores, essa maior concentração de enzimas oxidativas nos animais com alta capacidade de corrida, proporcionou uma maior capacidade para utilizar oxigênio.

Em contraste, Fueger *et al.*⁵¹ verificaram se a capacidade de realizar exercício era dependente da atividade da HK II. A partir de manipulação genética, os autores desenvolveram camundongos que expressavam 50% menos de HK II,

outros que expressavam 3 vezes a mais que o normal, e testaram também animais sem qualquer manipulação. Ao realizar o teste de *endurance* (corrida em esteira a aproximadamente 75% do $VO_{2máx}$), os autores verificaram que os animais que possuíam maior expressão da HK II apresentaram maior habilidade para sustentar o exercício de intensidade moderada do que os animais com menor atividade. Essa maior atividade enzimática, ou seja, a maior fosforilação da glicose a tornou mais acessível ao músculo, e foi um determinante crítico para o desempenho.

Examinando os potenciais processos para o melhoramento das vias metabólicas, principalmente após estímulos repetidos, foi observado que ocorriam regulações específicas nos processos oxidativos do músculo esquelético. Schmitt *et al.*⁵² verificaram que no músculo tibial anterior de biatletas havia uma melhora nos níveis de transcrição gênica para fatores envolvidos com a mobilização de gorduras (lipase hormônio sensível, lipoproteína lipase), comparado com sujeitos sedentários. A combinação desses ajustes nos passos sequenciais da cascata de oxigênio nos grupos musculares recrutados, é visto refletir um nível de coordenação local, o qual contribui para melhorias sistêmicas no caminho do oxigênio com o treinamento de *endurance*¹.

3 JUSTIFICATIVA

A maioria dos estudos que verificam os indicadores de capacidade aeróbia tem seu foco no $VO_{2máx}$ e na produção de lactato, que são índices válidos, porém necessitam de equipamentos específicos e de alto custo para sua determinação. Dessa forma, o desenvolvimento de testes não invasivos e de fácil aplicação auxiliam na avaliação e prescrição de exercícios.

O teste de PC tem sido muito usado nos últimos anos, e vários estudos vêm buscando compreender o real significado fisiológico de seus índices aeróbio e anaeróbio. Testes realizados até exaustão na intensidade do índice aeróbio obtido pelo modelo de PC foram realizados. Entretanto, as variáveis fisiológicas medidas durante os esforços (VO_2 , $[la]$, relação lactato/piruvato, concentração de amônia, variáveis respiratórias, entre outras) não se mantiveram em estado estável, além dos sujeitos não suportarem longos períodos de tempo (em média 30 minutos) como seria esperado.

Dessa forma, uma alternativa para entender o real significado fisiológico dos índices aeróbio e anaeróbio obtidos pelo modelo de PC, seria estabelecer relações entre eles e variáveis morfofisiológicas (como por exemplo, tipo e tamanho de fibras, componentes sanguíneos, atividade enzimática, entre outros). Em tese, indicadores da função aeróbia devem se relacionar à PC e ao tempo limite nesta intensidade. Devido à dificuldade da estimativa das variáveis morfofisiológicas em seres humanos, seria mais adequada a aplicação do protocolo de pesquisa em modelo animal, uma vez que já foi demonstrado que o modelo PC pode ser aplicado em ratos Wistar.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente estudo foi verificar as possíveis relações entre fatores morfofisiológicos e indicadores da Ccrit durante natação em ratos Wistar.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar o tempo de tolerância na intensidade de 100% da Ccrit individual;
- Verificar se os índices morfofisiológicos têm alguma relação com o desempenho e o tempo de tolerância na natação.

5 MÉTODOS

5.1 ANIMAIS E TRATAMENTO

Foram utilizados 20 ratos machos da linhagem Wistar, com 60 dias de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, que foram mantidos em gaiolas coletivas (cinco ratos por gaiola), a 25°C em uma sala com iluminação das 6:00 às 18:00 h. Os animais foram alimentados com dieta comercial para roedores e também receberam água *ad libitum* durante todo o experimento. Os procedimentos adotados nesta investigação foram aprovados pelo comitê de ética da instituição (Protocolo: 023/2007 – adendo ao parecer 042/2007 – Anexo A).

5.2 ADAPTAÇÃO AO MEIO LÍQUIDO

Todos os animais foram submetidos à adaptação ao meio líquido, que foi realizado em tanque medindo 60 cm de profundidade, por um período de duas semanas, sendo cinco dias.semana⁻¹. A primeira semana de adaptação foi realizada sem colocação de carga, sendo que a profundidade da água e o tempo foram aumentados progressivamente. Já na segunda semana, os animais nadaram com incrementos de 2% do pc e com o tempo sendo ainda progressivamente aumentado, porém não ultrapassando os 10 minutos. A temperatura da água foi mantida a $31 \pm 1^\circ\text{C}$, tanto durante a adaptação quanto nos testes de determinação da carga crítica (Ccrit) e durante o exercício na intensidade equivalente a 100% da Ccrit. A proposta da adaptação teve por objetivo reduzir os efeitos do estresse do animal ao contato com o meio líquido, sem promover alterações fisiológicas relacionadas a treinamento.

5.3 DETERMINAÇÃO DA CARGA CRÍTICA (CCRIT) E DA CAPACIDADE DE NADO ANAERÓBIO (CNA)

Inicialmente os animais foram submetidos a um protocolo composto por quatro testes de natação em intensidades distintas, suportando cargas mantidas continuamente, que foram distribuídas entre 7 a 13% do pc atadas ao dorso (adaptado de Marangon *et al.* ³³). Os testes foram realizados em quatro dias consecutivos, sendo uma carga por dia. Para cada carga houve o registro, em segundos, do tempo individual de exaustão (Tlim), caracterizado como a não manutenção da atividade na água (mais de 5 segundos abaixo da superfície) e mudança no padrão de nado dos animais. As cargas foram selecionadas para que o tempo de duração entre a carga mais leve e a mais intensa permanecesse entre 1 e 20 minutos. Como na avaliação em humanos, a Ccrit e a CNA foram determinadas a partir da relação entre intensidade do exercício (C- Carga) e Tlim por meio da função hiperbólica: $Tlim = CNA / (C - Ccrit)$, em que a Ccrit é a assíntota da hipérbole e a CNA grau de curvatura da hipérbole ²³ (figura 1).

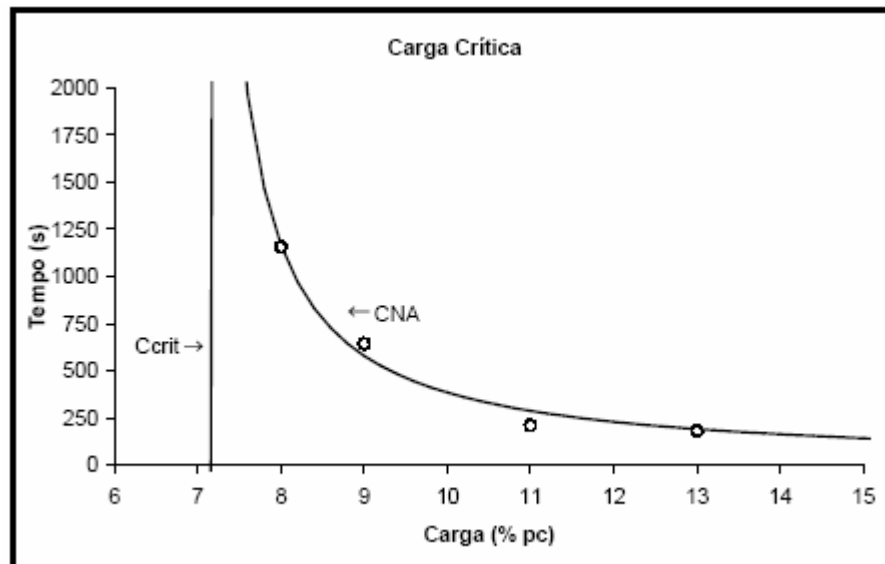


Figura 1 – Representação gráfica do cálculo da Ccrit.

5.4 INTENSIDADE DO EXERCÍCIO

Após realizar o teste de Ccrit, os animais foram colocados para nadar na intensidade equivalente a 100% da Ccrit individual até a exaustão. Vinte e quatro horas após esse exercício, os animais foram eutanasiados.

5.5 COLETA DO MATERIAL

Para coleta do material, os animais foram sacrificados por meio de anestesia com pentobarbital sódico (Hypinol® 3%, 4 mg/100g pc, intravenosa), e em seguida se realizou laparotomia mediana para a coleta de sangue (3 ml) da veia cava inferior e remoção de tecidos.

5.6 CONTAGEM DE HEMÁCIAS NO SANGUE

O sangue foi coletado da veia cava inferior do animal e colocado em tubos de vidro contendo EDTA 10% para evitar a coagulação. A contagem das hemácias foi realizada em câmaras de Neubauer, a partir de amostras de sangue diluídas na proporção de 1:20 em líquido de Hayem. Para diluição, foram utilizadas pipetas conta glóbulos de Thomas. As células foram contadas em microscópio óptico usando-se objetiva de 40x.

5.7 HEMATÓCRITO

O hematócrito foi analisado a partir do sangue coletado e estocado, pela técnica do microhematócrito. O sangue foi colocado em tubos capilares não heparinizados com uma das extremidades seladas. Após cinco minutos na

centrífuga, os capilares foram retirados e a leitura foi feita através da escala própria.

5.8 ANÁLISES HISTOENZIMOLÓGICA E MORFOLÓGICA

O músculo sóleo direito foi congelado em nitrogênio líquido e estocado em freezer a $- 80^{\circ}\text{C}$ para posterior homogeneização e preparação histoenzimológica, e os músculos sóleo e gastrocnêmio esquerdos foram estocados em formol até a preparação histológica.

5.9 PREPARO DOS CORTES HISTOLÓGICOS

Amostras dos músculos sóleo e gastrocnêmio esquerdos de cada animal foram coletadas, abertas, lavadas em solução salina, fixadas em *bouin*, desidratadas em série de concentrações crescentes de álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina, para realização de cortes de $7\ \mu\text{m}$ posteriormente corados com Hematoxilina e Eosina (H.E.).

A partir dos cortes corados com H.E., foram evidenciados aspectos morfológicos gerais dos tecidos estudados. A partir dos cortes com H.E., foi feita também a contagem do número de capilares em relação aos de fibras, somente no músculo sóleo, obtendo-se assim um coeficiente referido como relação capilar por fibra (C/F) (figura 2).

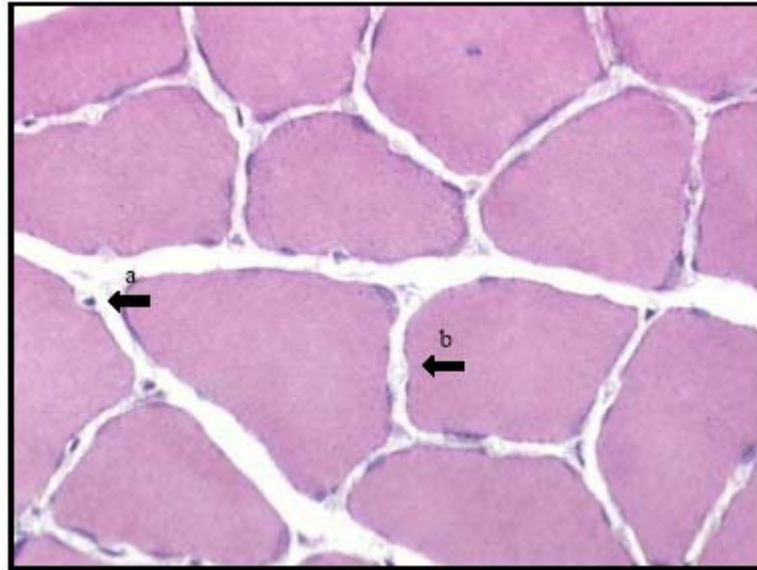


Figura 2 – Demonstração dos capilares encontrados entre as fibras do músculo sóleo. a – capilar com hemácia em seu interior, b – capilar sem hemácia em seu interior.

5.10 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

Para se averiguar o trofismo das fibras musculares, foram utilizados os cortes corados pela técnica H.E. descrita acima. Foram capturadas imagens das lâminas confeccionadas, e analisadas através do software *Image-Pro® Plus, version 4.5.0.29 for Windows*. Para cada lâmina, foram fotografadas 4 imagens diferentes, para a realização da mensuração das áreas musculares, identificadas pelo *software*.

Para cada lâmina, referente a um único músculo, buscou-se identificar 100 fibras musculares (25 fibras por imagem), as quais foram selecionadas manualmente, com o auxílio do *mouse* para mensuração das respectivas áreas⁵³. Os dados numéricos foram transferidos para o *software Microsoft® Excel – 2002*.

5.11 SOBRE AS IMAGENS OBTIDAS

Para a captura das imagens das fibras musculares foram utilizadas lentes para um aumento de 330 vezes (microscópio óptico). Além disso, buscou-se evitar que a mesma área fosse fotografada duas vezes.

Realizou-se a calibração do programa para compilação dos dados (medidas em micrômetros) e prontamente iniciou-se a mensuração das fibras visualizadas integralmente. Todas as lâminas confeccionadas proporcionaram uma eficiente definição das células musculares e não houve dificuldade para diferenciação destas, como pode ser observado na figura 2. Além disso, o programa oferece uma tabela onde todos os dados foram armazenados e posteriormente transferidos para o programa *Excel*, constando a área de cada fibra muscular identificada, como exemplificado na figura 3.

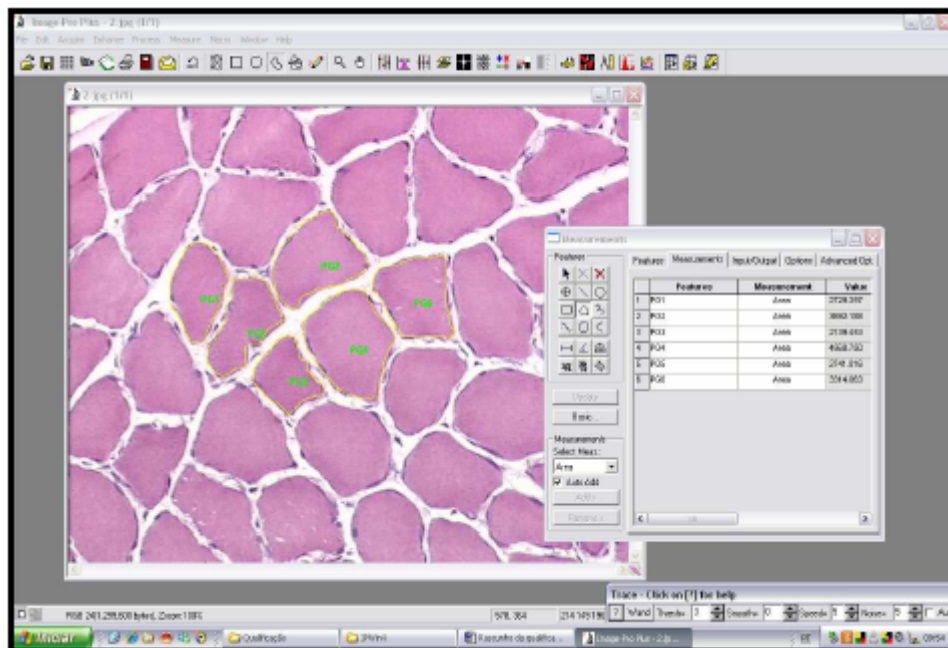


Figura 3 – Demonstração da análise das imagens para o cálculo da área da fibra do músculo sóleo e do músculo gastrocnêmio, H.E. 330x.

5.12 PREPARO HISTOENZIMOLÓGICO DAS FIBRAS MUSCULARES

Para o estudo das fibras musculares, o sóleo direito do animal foi retirado e então coberto com talco para a preservação do tecido, de acordo com técnica de Moline e Glenner⁵⁴ e congelado em nitrogênio líquido. Os músculos foram mantidos a -80°C até preparação histoenzimológica.

Durante a preparação, o músculo foi mantido em criostato (LEICA CM – 1850 – Alemanha) a temperatura de -21°C . Os blocos de tecidos musculares foram fixados em suportes metálicos do criostato através de pequenas quantidades de adesivo (OCT – Tissue Tek Compound), e posteriormente foram realizados cortes transversais com $7\ \mu\text{m}$ de espessura.

Após o preparo das lâminas, elas foram coradas pelo método da Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo – Tetrazolium Reductase (NADH-TR), conforme técnica de Pearse⁵⁵ modificada por Dubowitz e Brooke⁵⁶, em que foi analisado o metabolismo oxidativo e glicolítico (figura 4).

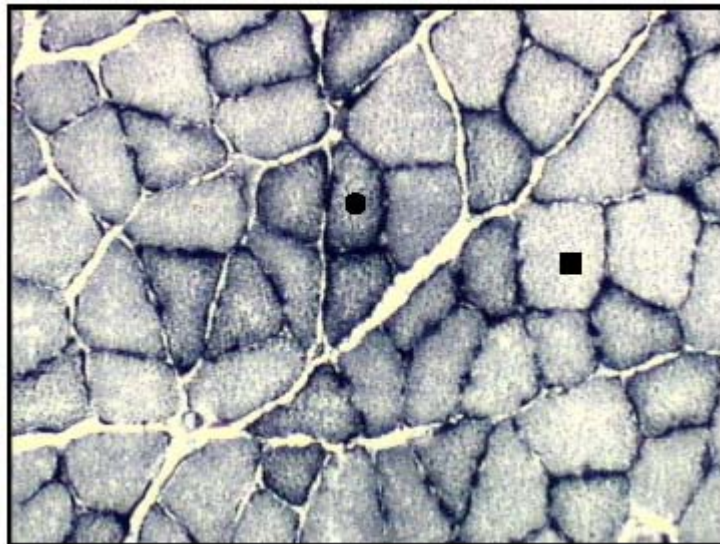


Figura 4 – Imagem demonstrativa de lâmina corada para a técnica de NADH-TR.

● - fibra oxidativa, ■ - fibra glicolítica.

Como a classificação das fibras com intensidade de coloração intermediária de NADH-TR é arbitrária^{57,58}, as fibras foram classificadas somente

como oxidativas e glicolíticas.

Os procedimentos necessários para a coloração das lâminas por este método e pelo método do H.E. estão descritos no anexo (B e C).

5.13 ESTUDO ESTEREOLÓGICO

A quantificação da densidade do volume (V_v) de fibras oxidativas e glicolíticas do músculo sóleo foi realizada através de objetiva de 10x e sistema de vídeo-microscópio, composto por microscópio acoplado a um sistema de imagem e monitor. Para cada animal, foram estudados 5 cortes histológicos (corados com NADH- TR) em um campo microscópico aleatório. Foram capturadas 15 imagens de cada músculo, sempre com o cuidado de não fotografar duas vezes a mesma área. A contagem de pontos foi realizada através do sistema-teste de ciclóides^{59,60} (figura 5).

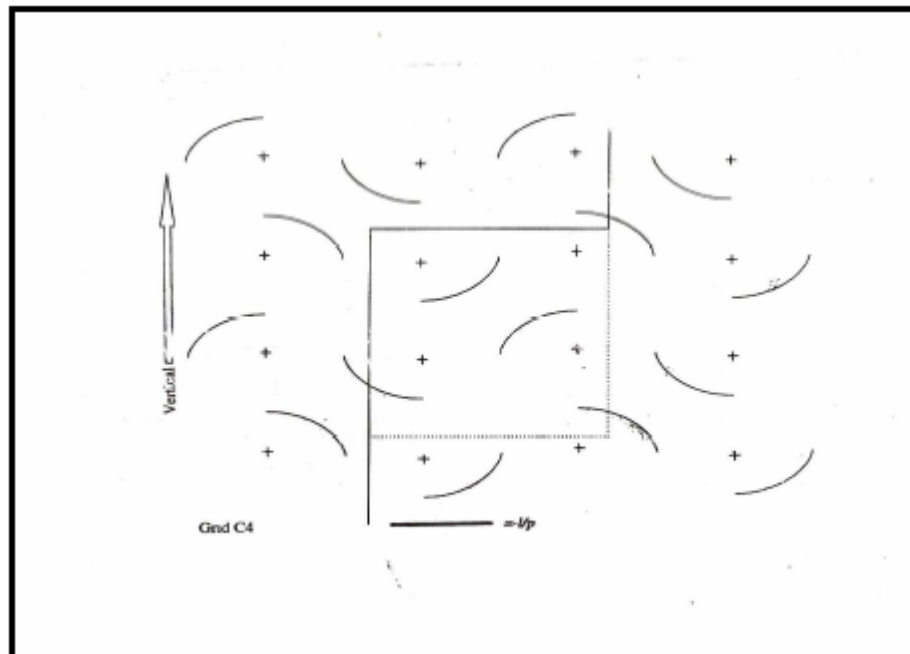


Figura 5 – Sistema-teste de ciclóides.

Vv foi calculada a partir da fórmula:

$$Vv = \frac{Pp}{Pt} \%$$

onde: Pp é o número de pontos que tocam a estrutura em estudo (fibras musculares);

Pt é o número total de pontos do sistema-teste (igual a 16) multiplicado pelo número de campos (15 campos).

As proporções dos tipos de fibra estão apresentadas em porção numérica (o número específico do tipo de fibra/número total de fibras contadas).

5.14 ANÁLISE DA CITRATO SINTASE

Para determinar a atividade máxima da CS, o músculo sóleo foi homogenizado por 20 s em gelo, usando um homogenizador de tecidos (Ultra-Turrax T8, Ika-Werke, Staufen, Alemanha) na solução de extração específica.

O tampão de extração continha 0,5 mM de Tris-HCL e 1,0 mM de EDTA, pH 7,4, e o tampão da substância analisada continha Tris/aminometano (100 mM), DTNB (0,2 mM), acetil-CoA (0,1 mM), e Triton X-100 (0,1% Vv), pH 8,1. A reação foi iniciada pela adição de 10 µl do extrato do tecido e 50 µl do ácido oxaloacético (concentração final de 10 mM). A absorbância a 412 nm (25°C) foi espectrofotometricamente medida durante 5 min como já descrito anteriormente⁶¹. A atividade da enzima foi expressa com base de mg de proteína.

5.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A normalidade dos dados foi verificada por meio do teste de *Shapiro-Wilk*. Para verificar as relações entre as variáveis histológicas e morfológicas com os parâmetros do modelo de Ccrit e o tempo até a exaustão, foi aplicado o coeficiente

de correlação de *Pearson* quando os dados foram paramétricos, e o coeficiente de correlação de *Spearman* quando os dados foram não-paramétricos. A significância foi fixada em $P < 0,05$. O software utilizado foi o SPSS 13.0 *for Windows*.

6 RESULTADOS

Para todos os animais, os testes preditivos para a determinação da Ccrit resultaram em exaustão entre 2 e 20 minutos. O modelo hiperbólico usado para a determinação da Ccrit obteve excelente ajuste dos dados ($R^2 = 0,98 \pm 0,02$).

Os animais apresentaram valores de Ccrit que variaram entre 3,7 e 7,1 % pc. Já os tempos de tolerância variaram entre 350 e 2853 s. Os valores mínimo, máximo e médio, assim como o coeficiente de variação entre os animais estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1 – Dados descritivos dos valores de Ccrit e de tempo de tolerância (n = 20).

	Valor mínimo	Valor máximo	Média (DP)	CV (%)
Ccrit (%pc)	3,7	7,1	4,3 (1,4)	31
Tempo (s)	350	2853	1328 (670)	50

DP – desvio-padrão, CV – coeficiente de variação

A Ccrit e o tempo até a exaustão dos animais apresentaram correlação negativa ($r = - 0,724$; $P = 0,000$) (figura 6).

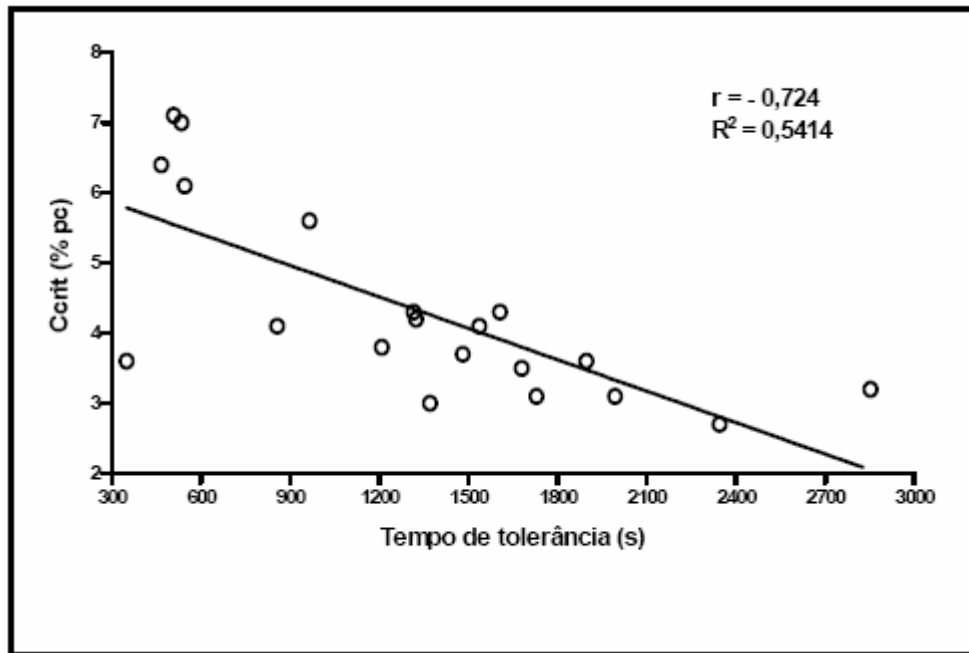


Figura 6 – Correlação de *Spearman* entre a Ccrit e o tempo de tolerância ($P = 0,000$).

Também foi encontrada correlação entre o tempo de tolerância e a CNA, que representa as reservas anaeróbias do organismo ($r = 0,699$; $P = 0,001$) (figura 7). Houve correlação negativa entre Ccrit e a CNA ($r = -0,847$; $P = 0,000$), indicando que quanto menor a capacidade aeróbia do animal, maior sua reserva anaeróbia (figura 8).

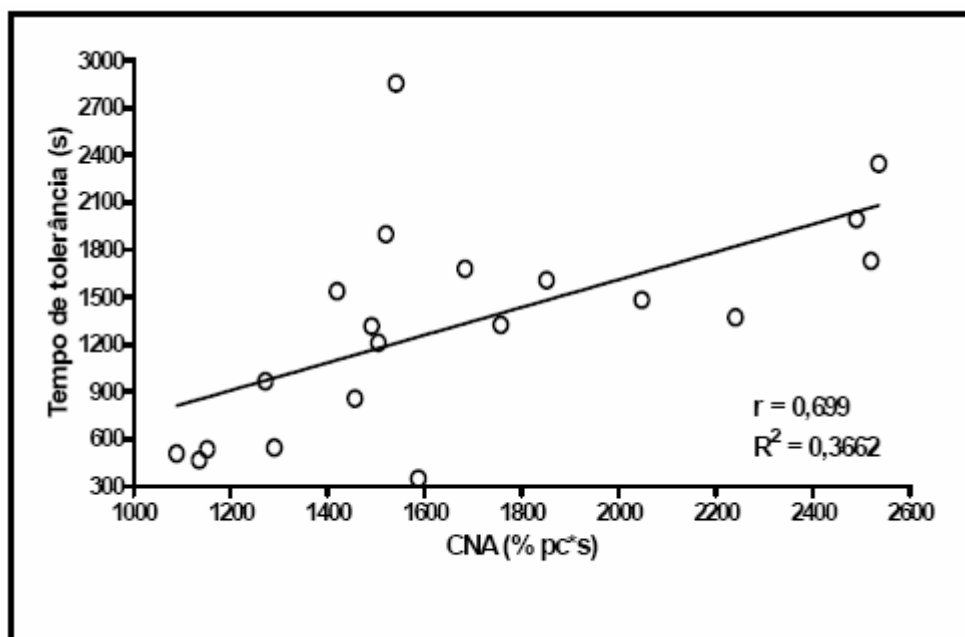


Figura 7 – Correlação de *Spearman* entre o tempo de tolerância e a CNA ($P = 0,001$).

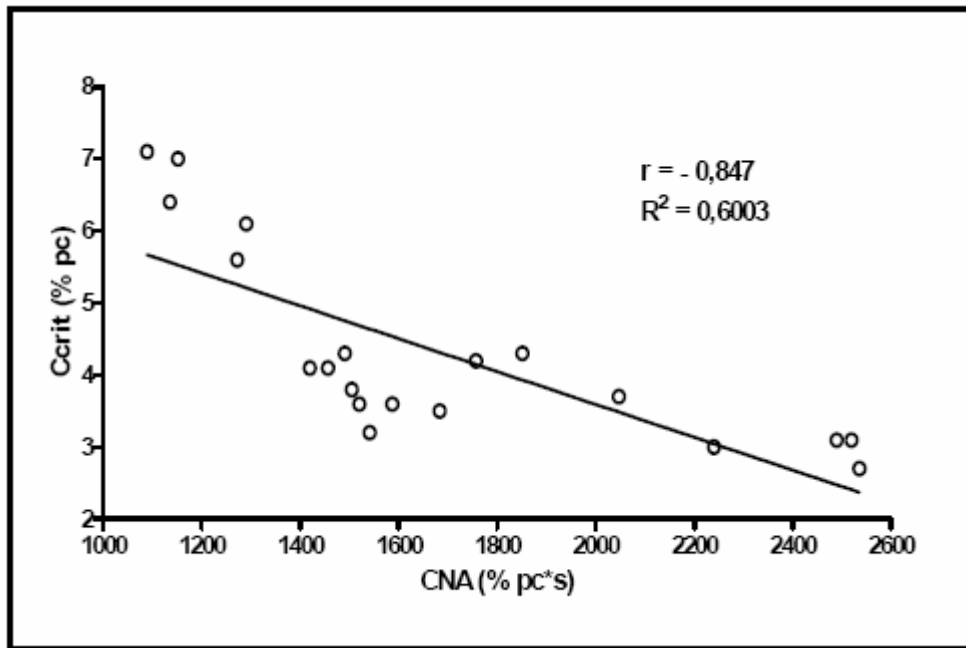


Figura 8 – Correlação de *Spearman* entre a Ccrit e a CNA ($P = 0,000$).

As figuras 9 e 10 apresentam as correlações significantes entre a porcentagem de fibras oxidativas e glicolíticas com a Ccrit, sendo a última negativa ($r = 0,473$; $P = 0,035$ e $r = -0,473$; $P = 0,035$, respectivamente). A atividade da CS não apresentou correlação com a Ccrit e também com o tempo até a exaustão ($r = 0,279$; $P = 0,234$ e $r = -0,255$; $P = 0,278$, respectivamente).

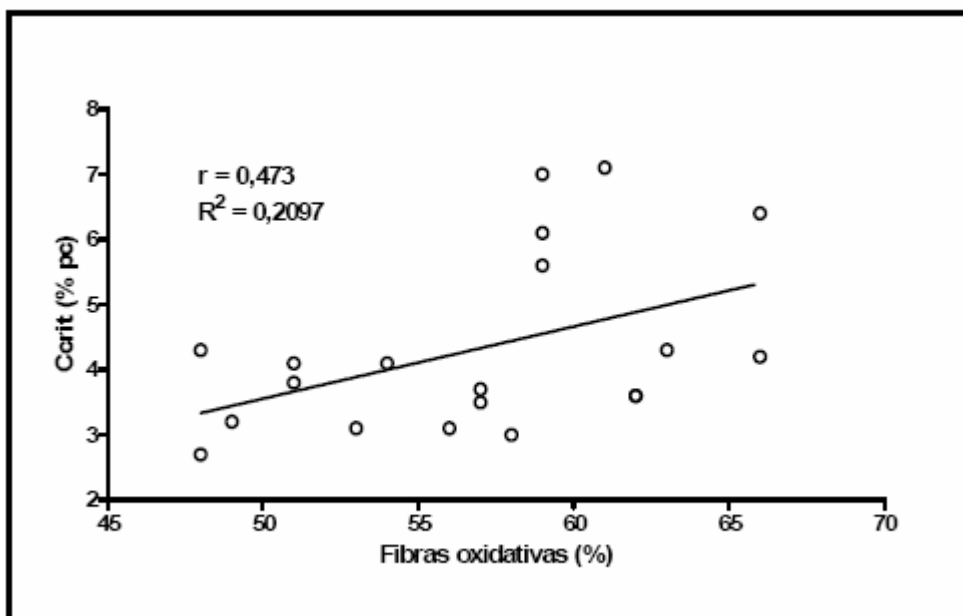


Figura 9 – Correlação de *Spearman* entre a Ccrit e a porcentagem de fibras oxidativas ($P = 0,035$).

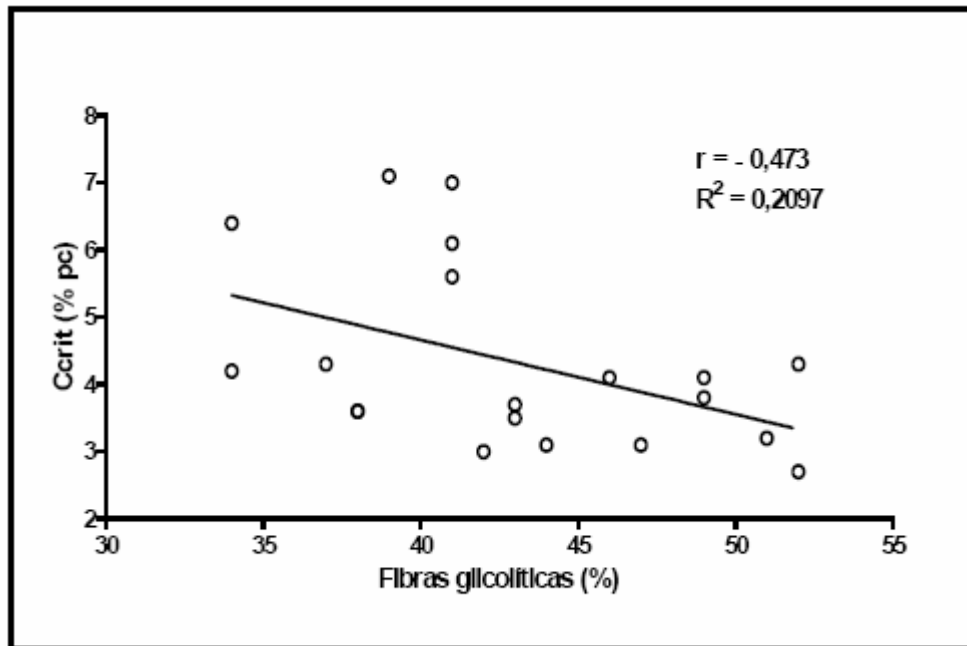


Figura 10 – Correlação de *Spearman* entre a Ccrit e a porcentagem de fibras glicolíticas ($P = 0,035$).

As porcentagens de fibras também apresentaram correlações significativas com o tempo de tolerância. Mas em relação ao tempo, as fibras oxidativas apresentaram correlação negativa, enquanto as fibras glicolíticas apresentaram correlação positiva ($r = -0,590$; $P = 0,006$ e $r = 0,590$; $P = 0,006$, respectivamente) (figuras 11 e 12).

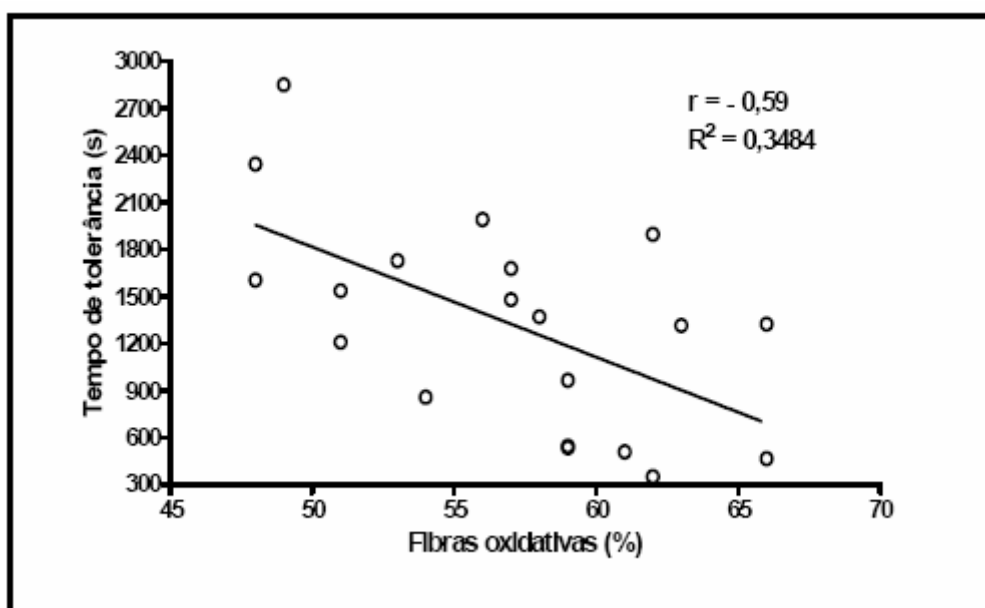


Figura 11 – Correlação de *Pearson* entre o tempo de tolerância e a porcentagem de fibras oxidativas ($P = 0,006$).

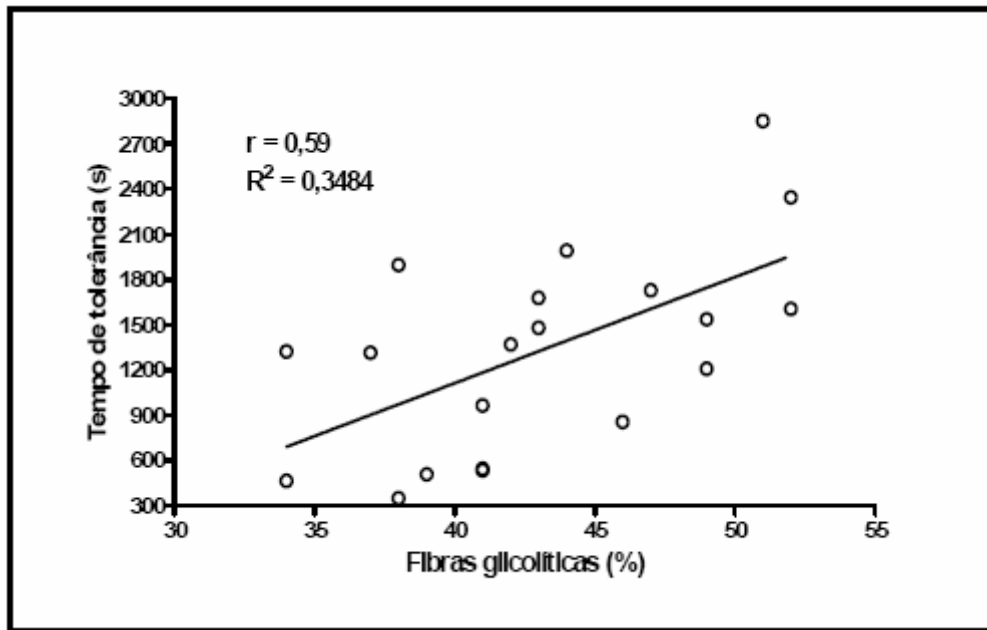


Figura 12 – Correlação de *Pearson* entre o tempo de tolerância e a porcentagem de fibras glicolíticas ($P = 0,006$).

A CNA e a porcentagem de fibras glicolíticas correlacionaram-se positivamente, porém a mesma não foi significativa (figura 13).

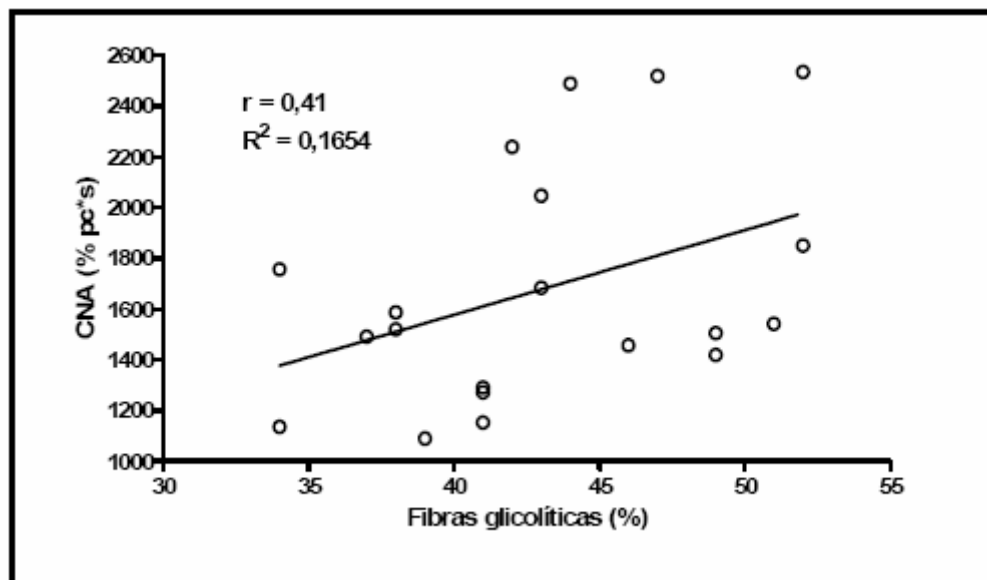


Figura 13 – Correlação de *Pearson* entre a CNA e o tempo de tolerância ($P = 0,075$).

Em relação à hipertrofia muscular, a área das fibras do músculo sóleo apresentaram correlação significativa com o tempo de tolerância, já em

relação à Ccrit não houve correlação. A área das fibras do músculo gastrocnêmio apresentaram correlação não significativa com o tempo de tolerância e porém não apresentou correlação com a Ccrit (tabela 2).

Tabela 2 – Valores dos coeficientes de correlação das comparações entre Ccrit, tempo de tolerância, área média das fibras do músculo sóleo e área média das fibras do músculo gastrocnêmio (μm^2).

	r
Ccrit x área do sóleo [#]	- 0,275
Ccrit x área do gastrocnêmio [#]	- 0,188
tempo x área do sóleo ^{&}	0,569*
tempo x área do gastrocnêmio ^{&}	0,434

[#] - coeficiente de correlação de *Spearman*, [&] - coeficiente de correlação de *Pearson*.

* $P = 0,009$.

O parâmetro C/F no músculo sóleo não apresentou correlação tanto com a Ccrit quanto com o tempo de tolerância, porém o número de hemácias foi inversamente correlacionado com a Ccrit e diretamente correlacionado com o tempo até a exaustão (tabela 3). O hematócrito não apresentou correlação com ambas as variáveis.

Tabela 3 – Coeficientes de correlação das comparações entre Ccrit e tempo de tolerância com relação C/F, hematócrito (%) e número de hemácias.

	C/F	Hematócrito	Hemácias
Ccrit (%)	0,170	- 0,290	- 0,691*
Tempo (s)	0,135	0,269	0,648*

* $P < 0,05$.

7 DISCUSSÃO

O presente estudo correlacionou os índices morfofisiológicos com o desempenho (Ccrit) e o tempo de tolerância nessa intensidade durante a natação em ratos Wistar. Os principais achados deste estudo foram as correlações encontradas entre os próprios parâmetros (Ccrit *versus* CNA, Ccrit *versus* tempo de tolerância, CNA *versus* tempo de tolerância). Esses resultados não corroboram os pressupostos do modelo de carga crítica para natação em ratos Wistar. Além disso, também foram encontradas algumas correlações os índices morfofisiológicos e os parâmetros da Ccrit.

Segundo um dos pressupostos do modelo de Ccrit, não deve haver correlação entre a Ccrit e o tempo de tolerância, pois ela representa a intensidade do Lan³³, e como no presente estudo essa intensidade foi individualizada, a carga interna imposta deveria ser a mesma para todos os animais; logo, esperava-se que os tempos de tolerância fossem dispersos de tal forma a não se observar relação entre a Ccrit e o tempo tolerado. A correlação inversa encontrada entre a Ccrit e o tempo de tolerância contesta esse pressuposto, sugerindo que alguns dos animais se exercitaram em intensidade acima do Lan.

Vários estudos realizados em humanos^{5,6,38} e em animais^{62,63} já observaram que a intensidade da PC superestima a intensidade do Lan. Ao analisar a correlação entre a Ccrit e o tempo até a exaustão, observa-se novamente que essa intensidade superestimou a intensidade correspondente ao Lan para alguns animais. Nossos resultados estão de acordo com os encontrados por Poole *et al.*^{30,64} em que o tempo até exaustão atingido em potências acima da PC foi inversamente relacionado com a taxa metabólica que foi excedida.

A Ccrit representa o maior limite para a estabilidade do VO₂⁶⁴; porém a partir dos resultados do presente estudo, especula-se que nessa intensidade não houve um estado estável, levando o VO₂ ao máximo para alguns animais, daí a correlação inversa entre a Ccrit e o tempo de tolerância. Esse fato corrobora os estudos de Billat *et al.*⁶⁵ que encontraram correlação inversa entre a potência (e velocidade) do VO_{2máx} e o tempo de tolerância em atletas de diferentes modalidades, assim como Fernandes *et al.*^{66,67} verificaram em nadadores.

Outro resultado que não atendeu aos pressupostos do conceito de

PC foi a correlação inversa e significativa entre a Ccrit e a CNA. A CNA é matematicamente definida como uma reserva energética intramuscular disponível previamente ao exercício^{10,17}; logo, ela deve ser independente da Ccrit. Da mesma forma, o tempo de tolerância na Ccrit não deve sofrer influência da CNA, ou seja, deve ser independente da CNA⁶⁸, o que não foi observado pelo presente estudo. Houve correlação positiva e significativa entre a CNA e o tempo de tolerância na Ccrit. Dessa forma, a partir dos nossos resultados, ficou clara a dependência dos parâmetros analisados com a CNA.

Vários pesquisadores já se propuseram comparar a PC com os limiares metabólicos^{6,17} e as respectivas respostas fisiológicas nessa intensidade de exercício^{5,8,36}. Os estudos não ofereceram evidências suficientes para aceitar ou rejeitar a PC como uma potência que pode ser mantida por longo período de tempo ou como um índice de *endurance*. Portanto, a investigação de outros mecanismos que podem estar envolvidos com a manutenção desse exercício torna-se importante. Isso mostra a importância e originalidade do presente estudo.

A Ccrit apresentou correlação positiva e significativa com a porcentagem de fibras oxidativas dos animais, enquanto que a correlação com a porcentagem de fibras glicolíticas foi negativa, o que indica que a Ccrit é um parâmetro aeróbio, e corrobora os trabalhos de Moritani *et al.*¹⁷, Gaesser e Wilson²⁹, Poole *et al.*³⁰, Hughson *et al.*²⁰ entre outros.

Apesar da correlação entre a porcentagem de fibras oxidativas e a Ccrit, a atividade da CS não apresentou a mesma relação. Esse resultado não era esperado, uma vez que, segundo Howlett *et al.*⁵⁰, uma das características que difere os animais com alta e baixa capacidade para a realização de exercício, é a atividade 40% maior dessa enzima. Possivelmente, a baixa proporção de fibras oxidativas, como também a idade dos nossos animais, pode ter influenciado esse resultado. Sakuma *et al.*⁶⁹ mostraram que a transformação das fibras tipo II para as fibras tipo I no músculo sóleo de ratos ocorre ao longo do desenvolvimento do animal e difere entre os segmentos proximal, medial e distal. A partir dessa diferença no desenvolvimento, sugere-se que as mitocôndrias musculares presentes nesses animais não estavam totalmente desenvolvidas.

Já em relação ao tempo de tolerância, o resultado foi inverso. A correlação entre a porcentagem de fibras oxidativas e o tempo de tolerância foi negativa e significativa, e entre a porcentagem de fibras glicolíticas foi positiva e

significante, indicando que a intensidade de exercício realizado no presente estudo não foi totalmente aeróbia. Uma correlação de $-0,47$ entre o tempo de tolerância e a proporção de fibras tipo I do músculo sóleo também foi encontrada por Totsuka *et al.*⁷⁰ em quatro linhagens diferentes de camundongos ao se exercitarem na esteira. A diferença entre o presente estudo e o de Totsuka *et al.*⁷⁰ foi a forma de exercício, sendo um em cargas retangulares e outro protocolo incremental, respectivamente. Mais uma vez, há uma indicação que a Ccrit superestimou a intensidade do Lan para alguns animais, ao observar os resultados de Totsuka *et al.*⁷⁰, pois ao aplicar um exercício incremental, eles encontraram a mesma correlação inversa entre os parâmetros tempo de tolerância e proporção de fibras oxidativas.

Um dos resultados que podemos destacar foi a correlação direta entre a CNA e a porcentagem de fibras glicolíticas. Essa correlação indica que os animais com a maior porcentagem de fibras glicolíticas apresentaram maiores valores de CNA. Apesar dessa correlação ter sido fraca e não significativa, ela acrescenta robustez à idéia de que a CNA é um indicador anaeróbio, o que reforça os dados dos estudos de Nebelsick-Gullett *et al.*⁷¹, Jenkins e Quigley⁷², Miura *et al.*^{73,74}, que encontraram correlações entre indicadores anaeróbios e a CTA, porém, muitas delas também não foram significantes.

Não foram encontradas correlações entre a Ccrit e a área da fibra muscular, tanto do músculo sóleo quanto do músculo gastrocnêmio. Nossos resultados são semelhantes aos de Maughan e Nimmo⁷⁵, realizados em humanos e Garland *et al.*⁷⁶, realizados em camundongos, que também não encontraram correlação entre a área transversal das fibras da coxa e a força realizada; e entre as fibras do músculo gastrocnêmio e a velocidade máxima de *sprint*, respectivamente. Essa falta de correlação indica que outros fatores são responsáveis pela determinação da Ccrit.

Já entre o tempo de tolerância e as áreas das fibras musculares houve correlação direta,, sendo a correlação com a área da fibra do músculo sóleo, significativa. Isso indica que a demanda funcional pode ter influência no diâmetro da fibra, pois para se manter a força por período prolongado de tempo, há necessidade de mais unidades motoras, como mostrado por Barnard *et al.*⁷⁷. Esse resultado era esperado, pois para a manutenção de uma carga ao longo do tempo, é preciso que haja grande número de elementos contráteis. Assim como o presente estudo, Rivero *et al.*⁴⁹ e Totsuka *et al.*⁷⁰ também encontraram que cavalos e camundongos que

suportaram maiores tempos na corrida foram os que apresentaram maiores áreas transversais das fibras dos músculos.

Vários estudos indicam que a capacidade aeróbia de um músculo deve estar relacionada com o suprimento capilar que ele comporta^{45,47}. No presente estudo, tanto a Ccrit, que é um parâmetro aeróbio, quanto o tempo de tolerância, não se correlacionaram com a relação C/F do músculo sóleo, o que corrobora o estudo de Maxwell *et al.*⁷⁸ que não encontraram relações entre a capacidade oxidativa do fluxo sanguíneo e a capilaridade de todo o músculo. Esperavam-se algumas correlações entre esses índices, pois, além da função de entrega de nutrientes para o metabolismo aeróbio, os capilares também têm papel de remover os produtos do metabolismo anaeróbio. Entretanto, esse resultado deve ser visto com cautela, pois o uso de somente um índice para se verificar o fluxo sanguíneo não é fidedigno, como foi mostrado por Hudlika *et al.*⁷⁹, o que pode ser uma explicação para a falta de correlação encontrada no presente estudo. Índices como densidade capilar, tortuosidade do leito capilar e a área capilar também devem avaliadas em estudos futuros.

Variáveis sanguíneas têm sido reportadas por estarem diretamente relacionadas com o consumo de oxigênio, portanto, esperava-se que os valores de hematócrito se correlacionassem com a Ccrit e com o tempo de tolerância. Porém, no presente estudo, os valores de hematócrito não apresentaram correlação com esses parâmetros. Conley *et al.*⁴⁷ e Kayar *et al.*⁴⁸ verificaram que espécies atléticas apresentaram hematócrito que diferia em até 1,8 vezes, porém, nos animais do presente estudo essa diferença não foi encontrada. Logo, o valor de hematócrito não parece ser um dos determinantes do desempenho entre animais da mesma espécie.

A correlação inversa e significativa encontrada entre a Ccrit, e direta e significativa encontrada entre o tempo de tolerância e o número de hemácias não era esperada, já que quanto melhor o metabolismo aeróbio do animal, maior deveria ser o aporte de oxigênio, e não o contrário. Porém, outros fatores também interferem na concentração das variáveis hematológicas, como por exemplo, o volume plasmático.

Schumacher *et al.*⁵² não encontraram qualquer correlação entre variáveis hematológicas, como a contagem de células vermelhas, e o $VO_{2máx}$ estabelecido em atletas de várias modalidades, além de encontrar baixos níveis de hemácias em atletas treinados em *endurance*. Logo, somente a contagem de hemácias não parece ser um bom índice para a análise de parâmetros aeróbios.

8 CONCLUSÕES

A partir dos resultados do presente estudo pode-se concluir que o modelo de Ccrit para natação em ratos deve ser usado com cautela, uma vez que parece não estimar a intensidade do Lan. O tempo de tolerância na Ccrit apresentou-se dentro da faixa já reportada na literatura. Os índices morfofisiológicos apresentaram correlações fracas a moderadas, indicando que nenhum deles pode responder sozinho pelo desempenho na intensidade da Ccrit. Porém, eles forneceram indicativos de que a Ccrit é um parâmetro aeróbio e a CNA um parâmetro anaeróbio; além de indicar que a intensidade do exercício (representado pelo tempo de tolerância) não parece ser uma intensidade totalmente aeróbia.

REFERÊNCIAS

1. Flück M. Functional, structural and molecular plasticity of mammalian skeletal muscle in response to exercise stimuli. **J Exp Biol**, 2006; 209: 2239-2248.
2. Booth FW, Thomason DB. Molecular and cellular adaptations of muscle in response to exercise: perspectives of various models. **Physiol Rev**, 1991; 71(4): 541-585.
3. Beneke R. Methodological aspects of maximal lactate steady state – implications for performance testing. **Eur J Appl Physiol**, 2003; 89(1): 95-99.
4. Baron B, Noakes TD, Dekerle J, Moullan F, Robin S, Matran R et al. Why does exercise terminate at the maximal lactate steady state intensity? **Br J Sports Med**, 2008; 42(10):528-533.
5. Housh TJ, Johnson GO, McDowell SL,; Housh DJ, Pepper M. Physiological responses at the fatigue threshold. **Int J Sports Med**, 1991; 12(3): 305-308.
6. McLellan TM, Cheung KSY. A comparative evaluation of the individual anaerobic threshold and the critical power. **Med Sci Sports Exerc**, 1992; 24(5): 543-550.
7. Billat VL, Slawinski J, Bocquet V, Chassaing P, Demarle A, Koralsztein JP. Very short (15s-15s) interval-training around the critical velocity allows middle-aged runners to maintain VO_{2max} for 14 minutes. **Int J Sports Med**, 2001; 22(3): 201-208.
8. Baron B, Dekerle J, Robin S, Nevriere L, Dupont L, Matran R, et al. Physiological responses during exercise performed to exhaustion at critical power. **J Hum Mov Stu**, 2005; 49: 169-180.
9. Tegtbur U, Busse MN, Braumann KR. Estimation of individual equilibrium between lactate production and catabolism during exercise. **Med Sci Sports Exerc**, 1993; 25(5): 620-627.
10. Monod H, Scherrer J. The work capacity of synergic muscle group. **Ergonomics**, 1965; 8: 329-338.

11. Margaria R, Cerretelli P, Mangili F. Balance and kinetics of anaerobic energy released during strenuous exercise in man. **J Appl Physiol**, 1963; 19: 623-628.
12. Saiki H, Margaria R, Cuttica F. Lactic acid production in submaximal work. **Int Z Angew Physiol**, 1967; 24(1): 57-61.
13. Gobatto CA, Mello MAR, Sibuya CY, Azevedo JRM, Santos LA, Kokubun E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. **Comp Bio Physiol A Mol Integr Physiol**, 2001; 130(1): 21-27.
14. Voltarelli FA, Gobatto CA, Mello MAR. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. **Braz J Med Biol Res**, 2002; 35(11): 1389-1394.
15. Araujo GG, Papoti M, Manchado FB, Mello MAR, Gobatto CA. Protocols for hyperlactatemia induction in the lactate minimum test adapted to swimming rats. **Comp Biol Physiol Part A**, 2007; 148: 888-892.
16. Clingeleffer A, McNaughton LR, Davoren B. The use of critical power as a determination for establishing the onset of blood lactate accumulation. **Eur J Appl Physiol**, 1994; 68(2): 182-187.
17. Moritani T, Nagata A, deVires HA, Muor M. Critical power as a measure of physical work capacity and anaerobic threshold. **Ergonomics**, 1981; 24(5): 339-350.
18. Housh DJ, Housh TJ, Bauge SM. A methodological consideration for determination of critical power and anaerobic work capacity. **Res Q Exerc Sport**, 1990; 61(4): 406-409.
19. Bishop D, Jenkins DG, Howard A. The critical power function is dependent on the duration of the predictive exercise tests chosen. **Int J Sports Med**, 1998; 19(2): 125-129.
20. Hughson RL, Orok CJ, Staudt LE. A high velocity treadmill test to assess endurance running potential. **Int J Sports Med**, 1984; 5(1): 23-25.
21. Ginn EM, Mackinnon LT. The equivalence of onset of blood lactate accumulation, critical power and maximal lactate steady state during kayak ergometry. Abstract. **Proc First IOC World Congress on Sport Sci**, 1989, 34.

22. Wakayoshi K, Ikuta K, Yoshida T, Udo M, Moritani T, Mutoh Y et al. Determining and validity of critical velocity as an index of swimming performance in the competitive swimmers. **Eur J Appl Physiol**, 1992; 64(2): 153-157.
23. Hill DW. The critical power concept. **Sports Med**, 1993; 16(4): 237-254.
24. Gaesser GA, Carnevale TJ, Garfinkel A, Walter DO, Womack CJ. Estimation of critical power with nonlinear and linear models. **Med Sci Sports Exerc**, 1995; 27(10): 1430-1438.
25. Jenkins DG, Kretek K, Bishop D. The duration of predicting trials influences time to fatigue at critical power. **J Sci Med Sports**, 1998; 1(4): 213-218.
26. Beneke R. Anaerobic threshold, individual anaerobic threshold, and maximal lactate steady state in rowing. **Med Sci Sports Exerc**, 1995; 27(6): 863-867.
27. Billat VL, Sirvent P, Py G, Koralsztein JP, Mercier J. The concept of maximal lactate steady state. A bridge between biochemistry, physiology and sport science. **Sports Medicine**, 2003; 33(6): 407-426.
28. Manchado FB, Gobatto CA, Contarteze RVL, Papoti M, Mello MAR. Maximal lactate steady state in running rats (online). **J Exerc Physiol**, 2005; 8(5): 29-35.
29. Gaesser GA, Wilson LA. Effects of continuous and interval training on the parameters of the power-endurance time relationship for high-intense exercise. **Int J Sports Med**, 1988; 9(6): 417-421.
30. Poole DC, Ward SA, Gardner GW, Whipp BJ. Metabolic and respiratory profile of the upper limit for prolonged exercise in man. **Ergonomics**, 1988; 31: 1265-1279.
31. Smith CGM, Jones AM. The relationship between critical velocity, maximal lactate steady state velocity and lactate turnpoint velocity in runners. **Eur J Appl Physiol**, 2001; 85(1-2): 19-26.
32. Dekerle J, Pelayo P, Clipet B, Depretz S, Lefevre T, Sidney M. Critical swimming speed does not represent the speed at maximal lactate steady state. **Int J Sports Med**, 2005; 26(7): 524-530.

33. Marangon L, Gobatto CA, Mello MAR, Kokubun E. Utilization of a hyperbolic model for the determination of critical load in swimming rats. **Med Sci Sports Exerc**, 2002; 34(5): S149-S149.
34. Billat VL, Mouisel E, Roblot N, Melki J. Inter – and intrastrain variation in mouse critical running speed. *J Appl Physiol*, 2005; 98(4): 1258-1263.
35. Pepper ML, Housh TJ, Johnson GO. The accuracy of the critical velocity test for predicting time to exhaustion during treadmill running. **Int J Sports Med**, 13(2): 121-124.
36. Brickley G, Doust J, Williams CA. Physiological responses during exercise to exhaustion at critical power. **Eur J Appl Physiol**, 2002; 88(1-2): 146-151.
37. Okudan N, Gökbel H. The ventilatory anaerobic threshold is related to, but is lower than, the critical power, but does not explain exercise tolerance at this workrate. **J Sports Med Phys Fitness**, 2006; 46: 15-19.
38. Jenkins DG, Quigley B. M. Blood lactate in trained cyclists during cycle ergometry at critical power. **Eur J Appl Physiol**, 1990; 61(3-4): 278-283.
39. Taylor CR, Weibel ER. Design of the mammalian respiratory system I. Problems and strategy. **Resp Physiol**, 1981; 44(1): 1-10.
40. Weibel ER, Taylor R, Hoppeler H. The concept of symmorphosis: A testable hypothesis of structure-function relationship. **Proc Natl Acad Sci**, 1991; 88(22): 10357- 10361.
41. Weibel ER, Bacigalupe LD, Schimitt B, Hoppeler H. Allometric scaling of maximal metabolic rate in mammals: muscle aerobic capacity as determinant factor. **Resp Physiol Neurobiol**, 2004; 140(2): 115-132.
42. Hoppeler H, Billeter R. Conditions for oxygen and substrate transport in muscles in exercising mammals. **J Exp Biol**, 1991; 160: 263-283.
43. White CR, Seymour RS. Allometric scaling of mammalian metabolism. **J Exp Biol**, 2005; 208(pt 9): 1611-1619.

44. Weibel ER, Hoppeler H. Exercise-induced maximal metabolic rate scales with muscle aerobic capacity. **J Exp Biol**, 2005; 208(pt 9): 1635-1644.
45. Poole DC, Mathieu-Costello O. Relationship between fiber capillarization and mitochondrial volume density in control and trained rat soleus and plantaris muscle. **Microcirculation**, 1996; 3(2): 175-186.
46. Hoppeler H. The different relationship of VO_{2max} to muscle mitochondria in humans and quadrupedal animals. **Respir Physiol**, 1990; 80(2-3): 137-146.
47. Conley KE, Kayar SR, Roesler K, Hoppeler H, Weibel ER, Taylor CR. Adaptive variation in the mammalian respiratory system in relation to energetic demand: IV Capillaries and their relationship to oxidative capacity. **Respir Physiol**, 1987; 69(1): 166- 170.
48. Kayar SR, Hoppeler H, Jones JH, Longworth K, Armstrong R, Laughlin MH et al. Capillary blood transit time in muscles in relation to body size and aerobic capacity. **J Exp Biol**, 1994; 194: 69-81.
49. Rivero JLL, Serrano AL, Henckel P, Agüera E. Muscle fiber type composition and fiber size in successfully and unsuccessfully endurance-raced horses. **J Appl Physiol**, 1993; 75(4): 1758-1766.
50. Howlett RA, Gonzalez NC, Wagner HE, Fu Z, Britton SL, Koch LG, et al. Skeletal muscle capillarity and enzyme activity in rats selectively bred for running endurance. **J Appl Physiol**, 2003; 94:1682-1688.
51. Fueger PT, Shearer J, Krueger TM, Posey KA, Bracy DP, Heikkinen S, et al. Hexokinase II protein content is a determinant of exercise endurance capacity in the mouse. **J Physiol**, 2005; 566(pt 2): 533-541.
52. Schmitt B, Flück M, Decombaz J, Kreis R, Boesch C, Wittwer M, et al. Transcriptional adaptations of lipid metabolism in tibialis anterior muscle of endurance-trained athletes. **Physiol Genomics**, 2003; 15: 148-157.
53. McGuigan MRM, Kraemer WJ, Deschenes MR, Gordon SE, Kitaura T, Scheet T et al. Statistical Analysis of fiber area in human skeletal muscle. **Can J Appl Physiol**, 2002; 27(4): 415-422.

54. Moline SW, Glenner GG. Ultra rapid tissue freezing in liquid nitrogen. **J Histochem Cytochem**, 1964; 12: 777-778.

55. Pearse AGE. In: **Histochemistry**: theoretical and applied. 3^a ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1972, 921-961.

50. Howlett RA, Gonzalez NC, Wagner HE, Fu Z, Britton SL, Koch LG, et al. Skeletal muscle capillarity and enzyme activity in rats selectively bred for running endurance. **J Appl Physiol**, 2003; 94:1682-1688.

51. Fueger PT, Shearer J, Krueger TM, Posey KA, Bracy DP, Heikkinen S, et al. Hexokinase II protein content is a determinant of exercise endurance capacity in the mouse. **J Physiol**, 2005; 566(pt 2): 533-541.

52. Schmitt B, Flück M, Decombaz J, Kreis R, Boesch C, Wittwer M, et al. Transcriptional adaptations of lipid metabolism in tibialis anterior muscle of endurance-trained athletes. **Physiol Genomics**, 2003; 15: 148-157.

53. McGuigan MRM, Kraemer WJ, Deschenes MR, Gordon SE, Kitaura T, Scheet T et al. Statistical Analysis of fiber area in human skeletal muscle. **Can J Appl Physiol**, 2002; 27(4): 415-422.

54. Moline SW, Glenner GG. Ultra rapid tissue freezing in liquid nitrogen. **J Histochem Cytochem**, 1964; 12: 777-778.

55. Pearse AGE. In: **Histochemistry**: theoretical and applied. 3^a ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1972, 921-961.

63. Machado FB, Gobatto CA, Contarteza RVL, Papoti M, Mello MAR. Máxima fase estável de lactato é ergômetro dependente em modelo experimental utilizando ratos. **Rev Bra Med Esporte**, 2006; 12: 259-262.

64. Poole DC, Ward SA, Whipp BJ. The effect of training on the metabolic and respiratory profile of high-intensity cycle ergometer exercise. **Eur J Appl Physiol**, 1990; 59: 421-429.

65. Billat V, Faina M, Sardella F, Marini C, Fanton F, Lupo S, et al. A comparison of time to exhaustion at VO_{2max} in elite cyclists, kayak paddlers, swimmers and runners. **Ergonomics**, 1996; 39(2): 267-277.

66. Fernandes RJ, Cardoso CS, Soares SM, Ascensão A, Colaço PJ, Villas-Boas, JP. Time limit and VO₂ slow component at intensities corresponding to VO_{2max} in swimmers. *Int J Sports Med*, 2003; 24: 576-581.
67. Fernandes RJ, Keskinen KL, Colaço P, Querido AJ, Machado LJ, Morais PA, et al. Time limit at VO_{2max} velocity in elite crawl swimmers. *Int J Sports Med*, 2008; 29: 145- 150.
68. Vanderwalle H, Vautier JF, Kachouri M, Lechevalier J-M, Monod H. Work-exhaustion time relationships and critical power concept. *J Sports Med Phys Fitness*, 1997; 37: 89- 102.
69. Sakuma K, Yamaguchi A, Ohmori H, Katsuta S. Nonuniform changes in fibre types in the soleus muscle of the developing rat. *Eur J Appl Physiol*, 1995; 70: 132-137.
70. Totsuka Y, Nagao Y, Horii T, Yonekawa H, Imai H, Hatta H, et al. Physical performance and soleus muscle fiber composition in wild-derived and laboratory inbred mouse strains. *J Appl Physiol*, 2003; 95: 720-727.
71. Nebelsick-Gullett LJ, Housh TJ, Johnson GO, Bauge SM. A comparison between methods of measuring anaerobic work capacity. *Ergonomics*, 1988; 31(10): 1413-1419.
72. Jenkins DG, Quigley BM. The influence of high-intensity exercise training on the Wlim–Tlim relationship. *Med Sci Sports Exerc*, 1993; 25(2): 275-282.
73. Miura A, Sato H, Sato H, Whipp BJ, Fukuba Y. The effect of glycogen depletion on the curvature constant parameter of the power-duration curve for cycle ergometry. *Ergonomics*, 2000; 43(1): 133-141.
74. Miura A, Endo M, Sato H, Sato H, Barstow TJ, Fukuba Y. Relationship between the curvature constant parameter of the power-duration curve and muscle cross-sectional area of the thigh for cycle ergometry in humans. *Eur J Appl Physiol*, 2002; 87(3): 238- 244.
75. Maughan RJ, Nimmo MA. The influence of variations in muscle fibre composition on muscle strength and cross-sectional area in untrained males. *J Physiol*, 1984; 351: 299- 311.

76. Garland T JR, Gleeson TT, Aronovitz BA, Richardson CS, Dohm MR. Maximal sprint speeds and muscle fiber composition of wild and laboratory house mice. **Physiol Behav**, 1995; 58(5): 869-876.

77. Barnard RJ, Edgerton VR, Furukawa T, Peter JB. Histochemical, biochemical and contractile properties of red, white and intermediate fibers. **Am J Physiol**, 1971; 220: 410-414.



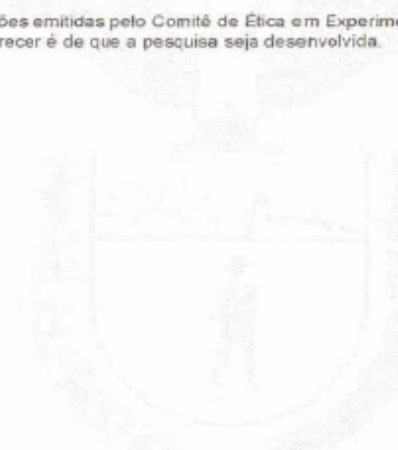

78. Maxwell LC, White TP, Faulkner JA. Oxidative capacity, blood flow, and capillarity of skeletal muscles. **J Appl Physiol**, 1980; 49(4): 627-633.

79. Hudlicka O, Hoppeler H, Uhlmann. Relationship between the size of the capillary bed and oxidative capacity in various cat skeletal muscles. **Eur J Physiol**, 1987; 410: 369-375.

80. Schumacher YO, Schmid A, Grathwohl D, Bültermann D, Berg A. Hematological indices and iron status in athletes of various sports and performances. **Med Sci Sports Exerc**, 2002; 34(5): 869-875.

ANEXOS

ANEXO A – Parecer do comitê de ética.

 Universidade Estadual de Maringá Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação					
Parecer emitido após reunião realizada em		7 / 8 / 2007	Parecer nº	042/2007	
Pesquisador:		Solange Marta Franzói de Moraes		Setor:	DCM
Título:		Protocolo nº 023/2007			
Relação ente fatores morfofisiológicos e indicadores de desempenho derivados do modelo de velocidade crítica em ratos wistar					
Entrada:	27/6/2007	Início:	1/8/2007	Término:	31/12/2007
Situação do Projeto:	Aprovado				
Relatório Final:	Aguarda finalização do projeto				
Considerações e Parecer: Avaliando as respostas às indagações emitidas pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal em primeira apreciação e consideradas esclarecedoras, o parecer é de que a pesquisa seja desenvolvida.					
					
 Dr. ^a Vilma Angélica Presidente do CEAE/UEM					
Artigo 10 da Resolução nº 032/2006-CEP: Os projetos analisados serão enquadrados em uma das seguintes categorias: I - aprovado; II - pendente, quando o CEAE considerar o protocolo e o projeto como aceitáveis, porém com problemas no protocolo, no projeto ou em ambos, e houver recomendação de uma revisão específica, ou solicitação de modificação ou informação relevante, que deverá ser atendida em até 60 dias, após o recebimento da comunicação, pelo coordenador do projeto; III - arquivado, quando o protocolo permanecer pendente, transcorridos 30 dias, após o prazo previsto no Inciso II do recebimento da comunicação; IV - não aprovado					
www.ppg.uem.br - e-mail: ceea@uem.br					



Universidade Estadual de Maringá
 Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
 Comitê de Condução Ética no Uso de Animais em Experimentação



Parecer emitido após reunião realizada em 6 /5 /2008 Parecer nº ADENDO

Pesquisador: Solange Marta Franzói de Moraes

Setor: DCM

Título:

Protocolo nº 023/2007

Relação ente fatores morfofisiológicos e indicadores de desempenho derivados do modelo de velocidade crítica em ratos wistar

Entrada: 27/6/2007

Início: 1/8/2007

Término: 31/12/2007

Situação do Projeto: **Aprovado com Recomendação**

Relatório Final: **Aguarda finalização do projeto**

Considerações e Parecer:

ADENDO AO PARECER 042/2007

Ao analisar a proposição de acréscimo de metodologia ao Projeto de pesquisa "Relação entre fatores morfológicos e indicadores de desempenho derivados do modelo de velocidade crítica em ratos wistar", protocolo 023/2007, constata-se que as proposições são aceitáveis, exceto a via de administração do anestésico que de acordo com a Resolução 876/2008 – CFMV, deve ser via intravenosa, proibindo a administração intraperitoneal. Assim, o parecer é favorável aos acréscimos de metodologia, desde que respeitadas as restrições em relação à via de administração do anestésico.



[Handwritten Signature]
 Drª Vânia Antunes
 Presidente do CEAE/UEM

Artigo 10 da Resolução nº 032/2006-CEP: Os projetos analisados serão enquadrados em uma das seguintes categorias:

I - aprovado;

II - pendente, quando o CEAE considerar o protocolo e o projeto como aceitáveis, porém com problemas no protocolo, no projeto ou em ambos, e houver recomendação de uma revisão específica, ou solicitação de modificação ou informação relevante, que deverá ser atendida em até 60 dias, após o recebimento da comunicação, pelo coordenador do projeto;

III - arquivado, quando o protocolo permanecer pendente, transcorridos 30 dias, após o prazo previsto no Inciso II do recebimento da comunicação;

IV - não aprovado

ANEXO B – Hematoxilina e Eosina

Colocar as lâminas prontas na estufa até derreter a parafina

15 minutos em xilol – desparafinar

20 minutos em xilol II – desparafinar

2 minutos em álcool 100% I

2 minutos em álcool 100% II

2 minutos em álcool 90% Álcool 80% (até ficar branco)

1 minuto em super cola

deixar secar

2 minutos em álcool 10%

2 minutos em água destilada

40 segundos em Hematoxilina lavar 4x

10 minutos na água

20 segundos em Eosina lavar 1x

Passar em álcool 90%

5 segundos em álcool 100% I

5 segundos em álcool 100% II

passar em xilol-álcool

5 minutos em xilol II

Xilol –emblocar até montar as lâminas

Montar as lâminas com Permont

Anexo C – NADH -TR (Nicotinamida Adenina Dinucleotídio – Tetrazolium Recuctase)

1 – Incubação dos cortes durante 30 minutos à 37°C, no seguinte meio:

NADH-Diaforase	8,0 mg
Nitro-Blue_Tetrazolium (NBT)	10,0 mg
Tampão Tris 0,2M pH 7,4	10,0 ml

2 – Lavagem dos cortes em água destilada

3 – Fixação durante 5 minutos em formol a 5% tamponado (pH 7,0)

4 – Lavagem em água destilada

5 – Desidratação, diafanização e montagem com Permount