

EFEITOS DO HORÁRIO DO DIA, LUMINOSIDADE AMBIENTAL E EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS E DE PERFORMANCE EM RATOS NADADORES

TIME OF DAY, ENVIRONMENT LUMINOSITY AND PHYSICAL EXERCISE EFFECTS ON INFLAMMATORY AND PERFORMANCE PARAMETERS OF SWIMMING RATS

Wladimir Rafael Beck^{*}
Lucas Dantas Maia Forte^{**}
Claudio Alexandre Gobatto^{***}

RESUMO

O modelo animal é utilizado em inferências de muitos mecanismos fisiológicos ao modelo humano, entretanto, investigações tem negligenciado o completo controle ambiental e cronobiológico. O objetivo deste estudo foi analisar respostas inflamatórias decorrentes do exercício físico realizado até a exaustão em intensidade individualmente determinada na transição aeróbia/anaeróbia em diferentes horários do dia e luminosidades ambientais. Ratos Wistar foram submetidos a dois tipos de luminosidade ambiental durante o período noturno: luminosidade padrão (LP; escuridão total) ou experimental (LE; >600nm; <15lux). Os animais foram avaliados pelo teste de lactato mínimo e então submetidos a um exercício exaustivo nesta intensidade (TE). Todos os procedimentos experimentais foram realizados às 12:00h (período de repouso) ou 20:00h (vigília). TE não sofreu influência do horário ou luminosidade, porém, ratos avaliados sob LP às 20:00h apresentaram menores valores para marcadores inflamatórios, mostrando a importância deste controle em experimentos que envolvam animais noturnos.

Palavras-chave: Cronobiologia. Performance. Ratos. Inflamação. Luminosidade ambiental.

INTRODUÇÃO

Animais de laboratório são largamente utilizados em investigações científicas devido à fácil manipulação e manutenção em biotério, além de proporcionar alto nível de controle ambiental e fisiológico, se caracterizando como um modelo estável e robusto. Contudo, para assegurar as vantagens ora elencadas, particularidades cronobiológicas devem ser firmemente consideradas, uma vez que a maioria das linhagens de ratos é possuidora de hábitos noturnos, caracterizados pelo alto consumo alimentar, temperatura corporal, frequência cardíaca e locomoção neste período do dia (KÖNCZÖL et al., 2012). Apesar disso, diversos experimentos simplesmente não observam tais

condições, aplicando rotinas experimentais no período diurno, sob iluminação clara. Esta prática pode promover interrupções no sono, o que é associado ao estresse oxidativo (OLIVEIRA et al., 2002), importantes modulações na temperatura corporal e consumo energético (EVERSON; BERGMANN; RECHTSCHAFFEN, 1989; EVERSON, 1995), além de patologias como obesidade (BJORVATN et al., 2007) e diabetes (CHAPUT et al., 2009). Alterações em parâmetros sanguíneos marcadores de inflamação tornam-se plausíveis neste contexto. Evidências do final dos anos 1970 já desestimulavam a aplicação de práticas experimentais durante o período de vigília sob luz clara, já que apenas a exposição por um minuto à luz clara durante o período

* Doutor. Pesquisador colaborador da Faculdade de Ciências Aplicadas da Universidade Estadual de Campinas, Limeira-SP, Brasil.

** Mestre. Discente do Programa de Pós-graduação em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo da Universidade Estadual de Campinas, Limeira-SP, Brasil.

*** Doutor. Professor Titular do Curso de Ciências do Esporte da Faculdade de Ciências Aplicadas da Universidade Estadual de Campinas, Limeira-SP, Brasil.

noturno (vigília do rato) é capaz de reduzir cerca de 30% a atividade da enzima n-acetiltransferase da glândula pineal (ILNEROVÁ et al., 1979). Tal condição poderia influenciar na produção e liberação da melatonina, causando dificuldades no controle do ritmo circadiano de inúmeras variáveis fisiológicas capazes de influenciar a adequada execução do exercício físico. Cabe destacar que o principal sincronizador circadiano do rato albino é a luminosidade ambiental (CLOUGH, 1982) e que esse animal possui alta fotossensibilidade devido ao número limitado de pigmentos em sua retina (SEMPLE-ROWLAND; DAWSON, 1987) e por possuir visão baseada em bastonetes (JACOBS; FENWICK; WILLIAMS, 2001). Não obstante, danos irreversíveis podem ocorrer na retina desses animais em função de exposições suficientes à luminosidade (HAM; MUELLER; SLINEY, 1976; WIELGUS et al., 2010), promovendo inevitavelmente altos níveis de estresse e consequente evolução para processos inflamatórios.

Dependendo do volume e da intensidade de esforço, o exercício físico pode ser considerado estímulo capaz de promover adaptações celulares e moleculares positivas ou negativas, por isso se caracteriza como um interessante modelo ao estudo de modulações inflamatórias agudas e crônicas e suas consequências no organismo. Apesar de modulações inflamatórias decorrentes à aplicação de exercício físico se situarem em um capítulo bem discutido na literatura especializada (PETERSEN; PEDERSEN, 2005; GLEESON et al., 2011), importantes investigações apresentam preocupantes ausências no controle da intensidade do exercício, horário do dia de sua aplicação e/ou condições de luminosidade ambiental, o que acreditamos que venha a contribuir para possíveis interpretações inapropriadas dos resultados. Mesmo que a literatura indique tendências para as consequências do exercício, horário e luminosidade sobre o processo inflamatório, esses efeitos são geralmente testados de maneira isolada, proporcionando uma visão unidirecional do fenômeno. A capacidade de intervenções em horários e luminosidade inadequadas causar estresse e indesejada inflamação é conhecida, contudo, pouco se sabe sobre a associação desses efeitos com o exercício físico e performance. Diante desse

contexto, esse estudo visa analisar respostas inflamatórias decorrentes do exercício físico realizado até a exaustão em intensidade individualmente determinada na transição aeróbia/anaeróbia em diferentes horários do dia e luminosidades ambientais.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Oitenta e quatro ratos *Wistar* albinos foram mantidos em gaiolas de polipropileno sob 22 ± 2 °C, 45 – 55% de umidade relativa do ar e ruídos abaixo de 85 decibéis. Os animais receberam ração padrão para roedores (70% carboidrato, 23,5% proteína, 6,5% gordura; Labina-Purina®, Purina 5008) e água à vontade, seguindo um ciclo claro/escuro de 12/12h com as luzes ligadas às 06:00h. A comissão de ética para pesquisa com uso de animais da Instituição aprovou o trabalho sob o número 018/2010, o qual seguiu rigorosamente a legislação nacional e as boas práticas e princípios metodológicos para experimentação animal.

Procedimentos experimentais

O experimento foi realizado em dois estágios (Figura 1). Inicialmente, aos 45 dias de idade, os ratos foram aleatoriamente distribuídos em dois grupos, expostos à luminosidade padrão (LP) ou luminosidade experimental (LE) para a adaptação do ambiente (AAM). Com a finalidade de investigar os animais durante seu período de sono e vigília, todos os procedimentos foram conduzidos às 12:00h (12) ou 20:00h (20). Aos 76 dias de idade os animais foram divididos em quatro grupos de acordo com a iluminação ambiental e horário do dia para as manipulações (LP12, LP20, LE12 e LE20). Troca de gaiolas para limpeza, adição de água e ração, adaptação ao meio líquido e ao exercício de natação foram conduzidos sob iluminação e horários conforme cada grupo. Dos 76 aos 89 dias de idade os animais foram submetidos a adaptação ao meio líquido e adaptação ao exercício de natação (AML), sendo aplicado o teste de lactato mínimo (TLM) aos 90 dias de idade, o que caracterizou o término do primeiro estágio experimental.

O segundo estágio se caracterizou pela divisão dos grupos em animais exercitados (E) ou controle

(C). Animais exercitados foram submetidos a grupo), enquanto os animais controle foram exercício de natação descrito adiante (n=11 por mantidos em repouso (n=10).

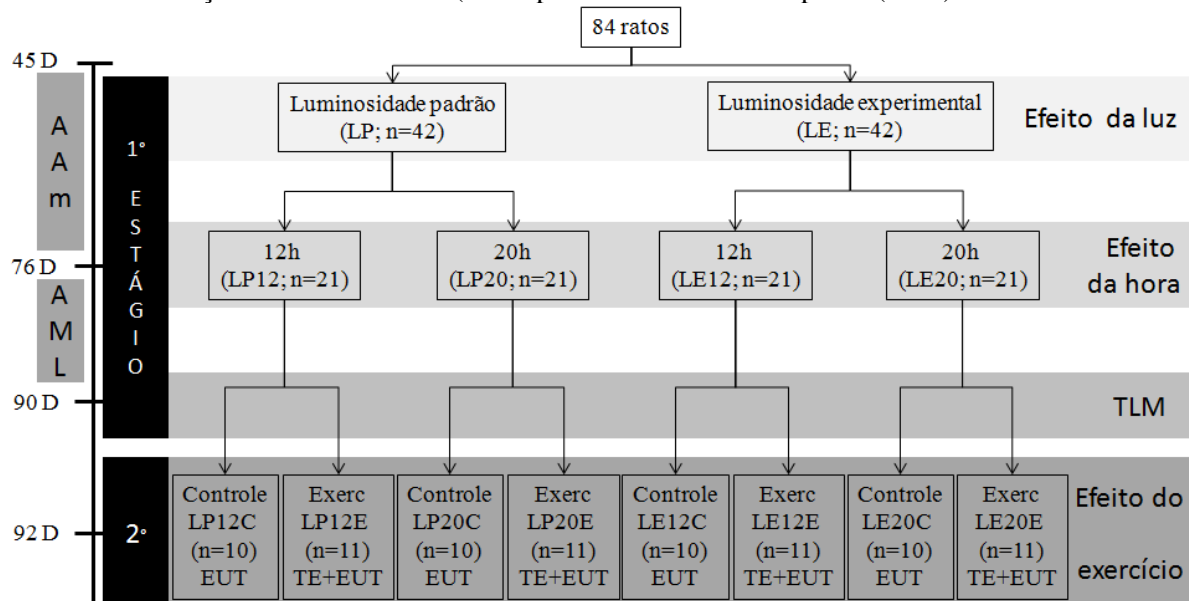


Figura 1 - Desenho experimental do estudo. AAm: adaptação ao ambiente; AML: adaptação ao meio líquido e ao exercício de natação; LP: luminosidade padrão; LE: luminosidade experimental; 12: 12:00h; 20: 20:00h; 45D: 45 dias de idade; 76 D: 76 dias de idade; 90 D: 90 dias de idade; 92 D: 92 dias de idade; EUT: eutanásia; TE: tempo e exaustão; TLM: teste de lactato mínimo; C: controle; E: exercitado.

Fonte: Os autores

Iluminação ambiental

Durante o período claro (das 06:00h às 18:00h), empregamos lâmpadas incandescentes (Phillips®, Soft, 100W, 2700K, 565-590nm, <60lux) para evitar a retinopatia fototóxica nos animais (SUN et al., 1993; SEMPLE-ROWLAND; DAWSON, 1987). No período escuro os animais LP foram mantidos em escuridão total enquanto os animais LE foram submetidos a uma iluminação constante de espectro vermelho (Rosco®, Supergel, Fire # 19, >600nm, <15lux). Todo o sistema de iluminação foi posicionado de tal forma que a distância entre o foco luminoso e os animais fosse semelhante, proporcionando a mesma iluminância.

Adaptação ao meio líquido e ao exercício de natação

A adaptação compreendeu 10 sessões de exposição à água e profundidade progressivas (5 a 20 minutos, 15, 50 e 100 cm), sem sobrecarga ou com até 2% da massa corporal (%mc). Os animais nadaram em tanque cilíndrico de PVC contendo água limpa a 31 ± 1 ° C, com diâmetro de 30 cm para nado

individual com a finalidade de manter o padrão de nado adequadamente contínuo.

O TLM foi aplicado conforme Beck, De Araujo e Gobatto (2012) e consistiu em três passos: 1) indução ao estado hiperlactacêmico com exercícios de alta intensidade; 2) intervalo passivo de recuperação para que o lactato produzido no músculo fosse transportado à corrente sanguínea; 3) fase incremental. Após ajuste polinomial de segunda ordem sobre os dados da fase incremental, a menor concentração de lactato foi considerada lactacidemia correspondente ao TLM (TLM[lac]), sendo tal ponto também interpolado ao eixo x para determinação a intensidade correspondente ao TLM (iTLM).

Após 48 hs da aplicação do TLM os animais foram submetidos a um exercício até a exaustão sob iTLM. Sob observação de dois experientes pesquisadores, o tempo de exaustão (TE) foi registrado do momento em que o animal foi introduzido ao tanque de natação à exaustão, determinada pelos seguintes critérios: a) o animal era incapaz de retornar à superfície durante um período de 15 segundos enquanto realizava esforços vigorosos; b) cessassem os movimentos

coordenados; c) ao se confirmar a atenuação dos reflexos conforme sugerido por Coop et al. (2010).

Coleta de material biológico e procedimentos analíticos

Amostras sanguíneas foram coletadas da porção distal da cauda dos ratos durante o TLM, antes ([lac]pré) e após ([lac]pós) TE. Após devidamente preparadas, as amostras foram submetidas à determinação da concentração de lactato pelo método enzimático por espectrofotometria contra a curva de calibração à 340nm, conforme descrito (ENGEL; JONES, 1978).

Imediatamente após o TE para os grupos exercitados ou no mesmo horário do dia para os grupos controle, os animais foram eutanasiados em câmara de gás carbônico e imediatamente submetidos à toracotomia para a coleta de amostra sanguínea via punção cardíaca. As amostras foram divididas em duas cotas: a) transferidas para um tubo contendo k3EDTA (fl Medical®, Torreglia, PD, Itália) utilizado para a contagem leucocitária; e b) centrifugada e armazenada em baixas temperaturas para posterior análise da proteína C-reativa (PCR).

A contagem leucocitária foi realizada por citometria de fluxo com semicondutor laser em contador automático (MAXM Coulter), cuja diferenciação permitiu a contagem específica de leucócitos totais (Leuc), linfócitos (Linf), monócitos (Mono) e neutrófilos (Neutr). A determinação da proteína C-reativa foi conduzida conforme instruções do kit comercial utilizado (IBL-America®, Rat C - reactiveprotein, IB66103, valor de referencia 300 ug/mL).

Procedimentos estatísticos

Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão. Os resultados foram submetidos aos testes de *Shapiro-Wilk* e *Levene*, nos conduzindo ao emprego da estatística paramétrica exceto para TE, o qual mesmo após tentativas de transformação via Log, raiz quadrada ou 1/x não apresentou curvatura gaussiana normal. O primeiro estágio do experimento utilizou análise de variância para determinar os efeitos principais de

luminosidade e horário do dia sobre iTLM, TLM[lac], [lac]pré e [lac]pós. O segundo estágio aplicou análise de variância para investigar os efeitos da luminosidade, horário do dia e exercício físico sobre Leuc, Linf, Mono e Neutr. Em ambos os estágios foi utilizado o teste de *Tukey* para *post hoc* quando necessário. TE foi analisado pelo teste de *Mann-Whitney* para luminosidade e horário do dia, sendo o teste de *Wilcoxon* para as comparações entre grupos. O nível de significância foi estabelecido em 5% ($p < 0,05$) para todas as análises.

RESULTADOS

Primeiro estágio

Dados descritivos referentes ao exercício físico (TLM e TE) estão apresentados na Tabela 1. Não foi identificado efeito significativamente estatístico para a luminosidade ($F = 3,36$; $p = 0,06$) ou horário do dia ($F = 1,13$; $p = 0,29$) sobre iTLM, além disso, não foram encontradas interações entre esses efeitos principais ($F = 1,09$; $p = 0,30$). Apesar de o horário do dia não influenciar no TLM[lac] ($F = 2,23$; $p = 0,14$), LE promoveu menores concentrações ($F = 38,14$; $p < 0,01$), resultando em interação não significativa ($F = 0,23$; $p = 0,63$).

Não foi encontrada influência da luminosidade sobre o TE ($p = 0,22$), assim como para horário do dia ($p = 0,32$), além de não ser encontrada diferença entre os grupos para esta variável ($p > 0,05$). LP promoveu maiores concentrações para [lac]pré ($F = 41,01$; $p < 0,01$), entretanto, não foi influenciada pelo horário do dia ($F = 0,010$; $p = 0,92$), sendo encontrada interação significativa entre esses efeitos principais ($F = 4,46$; $p = 0,04$). A concentração de lactato após o TE ([lac]pós) não foi alterada pela luminosidade ambiental ($F = 2,72$; $p = 0,11$) nem pelo horário do dia ($F = 0,19$; $p = 0,66$), apresentando ausência de interação entre os efeitos ($F = 0,26$; $p = 0,61$).

Segundo estágio

Os dados descritivos e de *post hoc* deste estágio estão apresentados nas Figuras 2 e 3. Foi encontrado efeito significativo da luminosidade apenas para Linf ($F = 6,84$; $p = 0,01$; $LE > LP$), Mono ($F = 31,89$; $p < 0,01$; LE

$> LP$) e Neutr ($F = 7,00$; $p < 0,01$; $LE < LP$), enquanto PCR e Leuc não sofreram alterações decorrentes a esse efeito principal ($F = 1,54$; $p = 0,22$ e $F = 0,32$; $p = 0,09$, respectivamente).

Tabela 1 - Resultados de intensidade (iTLM) e lactacidemia (TLM[lac]) correspondentes ao teste de lactato mínimo, tempo de exaustão sob iTLM (TE) e concentração de lactato pré ([lac]pré) e após ([lac]pós) TE para animais mantidos sob luminosidade padrão (LP) ou experimental (LE), avaliados às 12:00h (12) ou 20:00h (20), expressos em média \pm desvio padrão.

| | Teste de lactato mínimo | | Tempo de exaustão | | |
|-----------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------|--------------------------|-----------------|
| | iTLM (%mc) | LMT[lac] (mM) | TE (min) | [lac]pré (mM) | [lac]pós (mM) |
| LP12 (n=21) | 4,85 \pm 0,42 | 7,30 \pm 1,64 | 77,01 \pm 28,14 | 1,67 \pm 0,26 | 6,84 \pm 1,46 |
| LP20 (n=21) | 4,85 \pm 0,53 | 6,59 \pm 1,76 | 91,08 \pm 60,14 | 1,84 \pm 0,29 | 6,42 \pm 0,97 |
| LE12 (n=21) | 5,23 \pm 0,49 | 4,91 \pm 0,73 α | 46,56 \pm 28,10 | 1,32 \pm 0,29 α | 5,88 \pm 1,78 |
| LE20 (n=21) | 4,96 \pm 0,45 | 4,45 \pm 0,57 β | 82,85 \pm 54,67 | 1,14 \pm 0,23 β | 5,91 \pm 1,51 |

Diferenças significativas: α ($p < 0,05$) em relação a LP12; β ($p < 0,05$) em relação a LP20.

Fonte: Os autores.

Foram encontrados aumentos significativos de algumas contagens leucocitárias em função da hora do dia, sendo as contagens maiores às 12:00h para Leuc ($F = 59,42$; $p < 0,01$), Linf ($F = 38,46$; $p < 0,01$), Mono ($F = 42,6$; $p < 0,01$) e Neutr ($F = 22,39$; $p < 0,01$) quando comparadas com 20:00h, permanecendo

apenas PCR inalterada pelo horário do dia ($F = 1,45$; $p = 0,23$). Pudemos observar que a concentração de PCR foi aumentada pelo TE ($F = 6,97$; $p = 0,01$), assim como ocorreu para os Leuc ($F = 50,19$; $p < 0,01$), Linf ($F = 44,11$; $p < 0,01$), Mono ($F = 4,52$; $p = 0,04$) e Neutr ($F = 14,04$; $p < 0,01$).

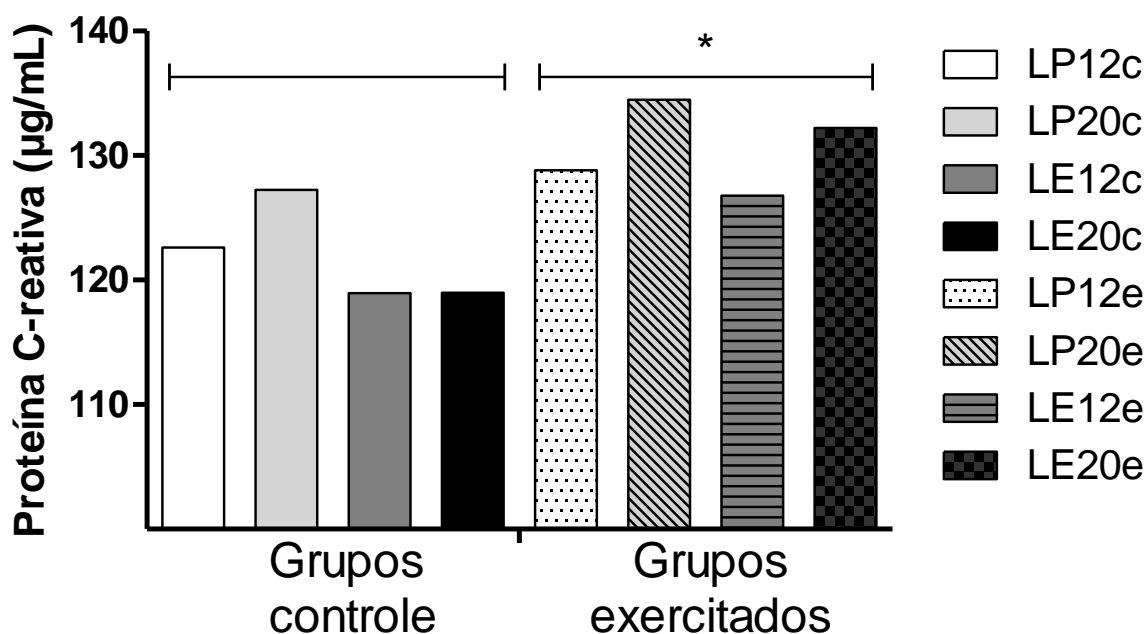


Figura 2 - Resultados de proteína C-reativa expressos em Média \pm desvio padrão. Diferenças significativas: * ($p < 0,05$; ANOVA) em relação aos grupos controle, expressando o efeito do exercício sobre a proteína C-reativa.

Fonte: Os autores.

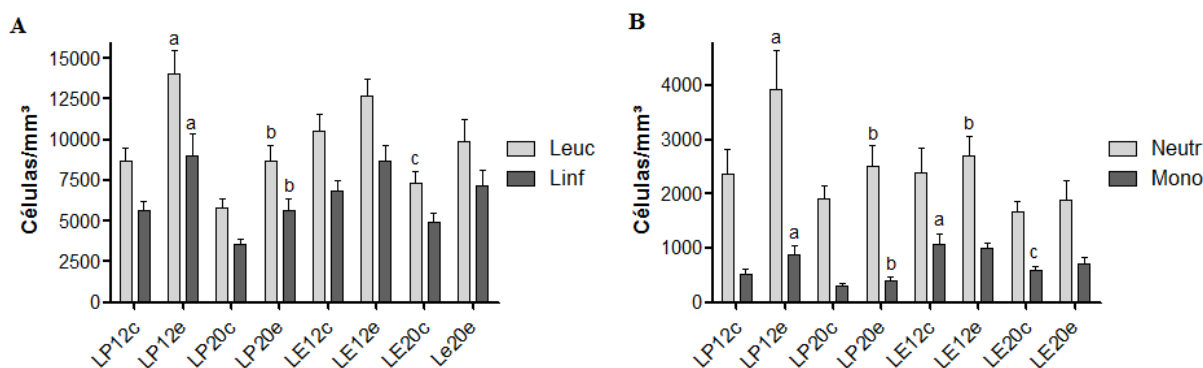


Figura 3 - A) Leucócitos (Leuc) e linfócitos (Linf); B) Neutrófilos (Neutr) e monócitos (Mono) de todos os grupos, apresentados em média \pm desvio padrão e resultados de post hoc. LP: luminosidade padrão; LE: luminosidade experimental; c: controle; e: exercitado; 12: 12:00h; 20: 20:00h; Diferenças significativas ($p < 0,05$): a: em relação a LP12c para a mesma variável; b: em relação a LP12e para a mesma variável; c: em relação a LE12c para a mesma variável.

Fonte: Os autores.

DISCUSSÃO

Dentre os principais achados deste estudo destaca-se a reduzida resposta inflamatória nos animais submetidos a experimentação noturna sob luminosidade padrão quando comparados com aqueles expostos ao exercício físico durante o período de sono e sob luminosidade experimental. Além disso, animais cronicamente expostos a manipulações diurnas ou luminosidade noturna apresentaram maiores contagens de células brancas sanguíneas, quadro indicador de horário ou condições ambientais inadequadas. Apesar disso, nossos dados não apontam influência do horário ou luminosidade sobre a tolerância ao esforço físico em ratos nadadores.

TLM e parâmetros de performance

Nossos resultados apontam que apesar de a iTLM não sofrer influência da luminosidade ou horário do dia, a TLM[lac] foi reduzida na LE. A iTLM traz consigo uma história de robustez, não sendo influenciada pelo conteúdo de glicogênio muscular em humanos saudáveis (TEGTBUR; BUSSE; BRAUMANN, 1993) nem ratos (VOLTARELLI; MELLO; GOBATO, 2004), assim como ocorre em ratos desnutridos (VOLTARELLI; GOBATO; MELLO, 2007). Contudo, os estudos ora citados mencionam sistematicamente menores concentrações de lactato em condições adversas, como ocorre em nosso estudo para os animais expostos à

LE. Essas condições podem causar aumento nas concentrações de hormônio adrenocorticotrópico (AGUILERA, 1994), conduzindo à liberação de adrenalina e corticosterona (AXELROD; REISINE, 1984). Como consequência, é descrito o aumento da atividade do metabolismo glicídico de repouso, consumindo maiores quantidades de glicogênio muscular (KOLATAJ; RYSINSKA; FLAK, 1992) e consequente redução dos estoques desse substrato para a continuidade do exercício. Tais condições parecem semelhantes às citadas por Voltarelli, Mello e Gobatto (2004) e Voltarelli, Gobatto e Mello, (2007) com respeito à TLM[lac].

Considerando todo o contexto ao qual nosso desenho experimental e seus efeitos principais envolve, acreditávamos que a tolerância ao exercício aeróbio (determinada diretamente pelo TE) poderia ser influenciada pela luminosidade ou pelo horário do dia em que fosse avaliada. Contudo, não foram encontradas diferenças significativas, apesar da representativa diferença que deve ser considerada quando se analisa o exercício proposto (HOPKINS, 2000). Além disso, investigações com Humanos reportam que o volume é um importante modulador de respostas inflamatórias (além da intensidade), fato que nosso estudo não identifica uma vez que não encontramos correlações significativas (teste de correlação produto-momento de *Pearson*) entre o tempo de exaustão e as variáveis inflamatórias estudadas. Esse resultado demonstra que o “estado de

exaustão” foi responsável pelas respostas inflamatórias e não o tempo necessário para atingir tal estado.

Parâmetros inflamatórios e exercício

O exercício físico é parcialmente responsável pelo dano tecidual, o qual promove respostas inflamatórias agudas que visam o reparo tecidual e adaptação do esforço realizado. Dentre os mecanismos que compõem tal processo podemos identificar a participação de células imunológicas, citocinas, proteínas e fluídos. A proteína C-reativa é uma molécula de resposta aguda associada a dano celular (BLACK; KUSHNER; SAMOLS, 2004), apresentando altas concentrações em curtos períodos de tempo após o estímulo (GABAY; KUSHNER, 1999). Contando com um válido e reprodutível protocolo para determinação da intensidade individual de esforço, nós mostramos que o exercício promoveu incrementos na concentração sanguínea de PCR, confirmando sua resposta aguda. Reforçando tal fato, a luminosidade e o horário do dia (efeitos crônicos) não mostraram capacidade de influenciar na concentração de PCR de forma significativa, conforme esperado.

O estresse causado pelo exercício físico promove aumento transitório da contagem de células brancas do sangue (NIEMAN; NEHLSSEN-CANNARELLA, 1994), geralmente associado ao aumento da liberação de catecolaminas (GABRIEL et al., 1992; SEELAENDER; KAZANTZIS; COSTA ROSA, 1999). Em estudos envolvendo o modelo Humano, a intensidade de esforço, duração e condição física do indivíduo avaliado são importantes nessas respostas (STRASNER et al., 1997; GLEESON et al., 1995; KENDALL et al., 1990), sendo o aumento das contagens de células brancas mais pronunciado em exercícios de longa duração devido a importante participação do cortisol (PEDERSEN et al., 1997; NIEMAN; PEDERSEN, 1999). Porém, nosso estudo aponta que as contagens de Leuc, Linf e Mono aumentaram significativamente devido à exaustão durante o exercício proposto em ratos, independentemente da duração, como citado acima.

Parâmetros inflamatórios e luminosidade

A contagem de células brancas do sangue são usualmente requeridas na prática clínica e interpretadas como parâmetros inflamatórios, sendo altas contagens em repouso comumente associadas a doenças e instalação ou presença de processos inflamatórios (MADJID et al., 2004). Isoladamente, modificações na luminosidade ambiental podem conduzir a modulações significativas sobre tais contagens, sendo observado aumento em Linf, Mono e Neutr para grupos expostos a LE. Tal fato provavelmente ocorra devido ao estresse adicional causado pela luz constante durante o período noturno, mesmo que esta possua adequado comprimento de onda e intensidade luminosa. Considerando que a luminosidade se caracterizou como um efeito crônico em nosso estudo, a PCR não foi significativamente alterada por tal efeito da mesma forma que ocorreu com o horário do dia.

Parâmetros inflamatórios e horário do dia

Nossos achados apontam que todas as contagens de células brancas apresentaram números maiores às 12:00h quando comparado com 20:00h, momento onde TE apresentou-se relativamente maior (porém, não significativamente). Associamos essas baixas contagens às 20:00h ao fato de as rotinas e manipulações diversas ocorrerem em período de vigília (TANAKA et al., 1990; IKEDA; SAGARA; INOUÉ, 2000), não causando interrupção do sono e promovendo menor estresse, como descrito por Pittendrigh e Daan (1976).

Nossa investigação provê importantes informações referentes à dependência de respostas inflamatórias em função do horário do dia e padrão de luminosidade, no entanto, nosso desenho experimental não é livre de críticas. Mensurações da temperatura corporal e da atividade espontânea provavelmente poderiam nos conduzir a afirmações mais consistentes, mesmo considerando que essas variáveis são muito bem descritas na literatura e apresentam considerável robustez (TANAKA et al., 1990; IKEDA; SAGARA; INOUÉ, 2000). Apesar disso, é necessária a condução de outros experimentos que avaliem marcadores de estresse e vias inflamatórias

incisivas com o intuito de proporcionar maior integridade às informações.

Sumariamente, os animais submetidos à luminosidade padrão e manipulados às 20:00h apresentaram contagens normais para as células brancas do sangue, o que associamos às condições ambientais e cronobiológicas adequadas. Os animais expostos à luminosidade experimental e avaliados às 12:00h apresentaram altas contagens de parâmetros inflamatórios mesmo quando não submetidos ao exercício físico, expressando condições experimentais estressantes. Diante disso, sugerimos firmemente que a realização

de experimentos envolvendo ratos e exercício físico sejam conduzidas durante o período de vigília do animal e sob iluminação adequada, para que parâmetros fisiológicos e de exercício físico não sejam influenciados negativamente.

AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) sob os protocolos 2010/13377-7, 2011/13226-1 e 2012/20501-1.

TIME OF DAY, ENVIRONMENT LUMINOSITY AND PHYSICAL EXERCISE EFFECTS ON INFLAMMATORY AND PERFORMANCE PARAMETERS OF SWIMMING RATS

ABSTRACT

Animal models are quite used for inferences to Human beings regarding many physiological mechanisms, however, current experiments have been neglected adequate control on environment and chronobiological interferences. The aim of this study was to analyze inflammatory responses owing physical exercise kept until exhaustion at aerobic/anaerobic transition intensity in different times of day and environmental luminosities. Wistar Rats were submitted to a two environmental luminosities during night period: standard luminosity (SL; total darkness) or experimental luminosity (EL; >600nm; <15lux). Animals were submitted to the lactate minimum test and then submitted to an exhaustive exercise at such intensity (TE). Overall experimental procedures were performed at 12:00h or 20:00h. TE were not influenced by time of day or environmental luminosity, nevertheless, were found reduced scores to inflammatory markers to rats assessed under SL at 20:00hs, showing the importance of such control in experiments involving nocturnal animals.

Keywords: Chronobiology. Performance. Rats. Inflammatory parameters. Luminosity.

REFERÊNCIAS

AGUILERA, G. Regulation of pituitary ACTH secretion during chronic stress. **Frontiers in Neuroendocrinology**, Philadelphia, v. 15, no. 4, p. 321-350, 1994.

AXELROD, J.; REISINE, T. D. Stress hormones: their interaction and regulation. **Science**, Washington D.C., v. 224, no. 4648, p. 452-459, 1984.

BECK, W. R.; DE ARAUJO, G. G.; GOBATTO, C. A. Methods of exercise intensity and lactataemia determination of lactate minimum test in rats. **Comparative Exercise Physiology**, Wageningen, v. 8, no. 2, p. 113-116, 2012.

BJORVATN, B. et al. The association between sleep duration, body mass index and metabolic measures in the Hordaland Health Study. **Journal of Sleep Research**, Malden, v.16, no. 1, p. 66-76, 2007.

BLACK, S.; KUSHNER, I.; SAMOLS, D. C. reactive Protein. **Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 279, no. 47, p. 48487-48490, 2004.

CHAPUT, J. P. et al. Sleep duration as a risk factor for the development of type 2 diabetes or impaired glucose tolerance: analyses of the Quebec Family Study. **Sleep Medicine**, Philadelphia, v. 10, no.8, p. 919-924, 2009.

CLOUGH, G. Environmental effects on animals used in biomedical research. **Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society**, Cambridge, v. 57, no. pt3, p. 487-523, 1982.

COOP, S. W. et al. Critical speed in the rat: implications for hindlimb muscle blood flow distribution and fibre recruitment. **Journal of Physiology**, Oxford, v. 588, no. pt24, p. 5077-5087, 2010.

ENGEL, P. C.; JONES, J. B. Causes and elimination of erratic blanks in enzymatic metabolic assays involving the use of NAD in alkaline hydrazine buffers: improved conditions for the assay of L-glutamate, L-lactate, and other metabolites. **Analytical Biochemistry**, Philadelphia, v. 88, no. 2, p. 475-484, 1978.

EVERSON, C. A. Functional consequences of sustained sleep deprivation in the rat. **Behavioral Brain Research**, Philadelphia, v. 69, no. 1-2, p. 43-54, 1995.

EVERSON, C.; BERGMANN, B. M.; RECHTSCHAFFEN, A. Sleep deprivation in the rat: III. Total sleep deprivation. **Sleep**, Darien, v. 12, no. 1, p. 13-21, 1989.

GABAY, C.; KUSHNER, I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. **The New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 340, no. 6, p. 448-454, 1999.

- GABRIEL, H. et al. Differential mobilization of leukocyte and lymphocyte subpopulations into the circulation during endurance exercise. **European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology**, Berlin, v. 65, no. 6, p. 529-534, 1992.
- GLEESON, M. et al. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. **Nature reviews immunology**, London, v.11, no. 0, p. 607-615, 2011.
- GLEESON, M. et al. Short-term changes in the blood leukocyte and platelet count following different durations of high-intensity treadmill running. **Journal of Sports Sciences**, London, v. 13, no. 2, p. 115-123, 1995.
- HAM, W. T. JR.; MUELLER, H. A.; SLINEY, D. H. Retinal sensitivity to damage from short wavelength light. **Nature**, London, v. 260, no.5547, p153-155, 1976.
- HOPKINS, W. G. Measures of Reliability in Sports Medicine and Science. **Sports Medicine**, New York, v. 30, no. 1, p. 1-15, 2000.
- IKEDA, M.; SAGARA, M.; INOUÉ, S. Continuous exposure to dim illumination uncouples temporal patterns of sleep, body temperature, locomotion and drinking behavior in the rat. **Neuroscience Letters**, Philadelphia, v. 279, no. 3, p. 185-189, 2000.
- ILNEROVÁ, H. et al. Effect of one minute exposure to light at night on rat pineal serotonin N-acetyltransferase and melatonin. **Journal of Neurochemistry**, Malden, v. 32, no. 2, p. 673-675, 1979.
- JACOBS, G. H.; FENWICK, J. A.; WILLIAMS, G. A. Cone-based vision of rats for ultraviolet and visible lights. **Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 204, no. pt14, p. 2439-2446, 2001.
- KENDALL, A. et al. Exercise and blood lymphocyte subset responses: Intensity, duration and subject fitness effects. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v. 69, no. 1, p. 251-260, 1990.
- KOLATAJ, A.; RYSINSKA, J.; FLAK, P. The influence of selection on reaction to stress in mice. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, Malden, v. 109, no. 2, p. 144-148, 1992.
- KÖNCZÖL, K. et al. Nesfatin-1 exerts long-term effect on food intake and body Temperature. **International Journal of Obesity**, London, v. 36, no. 12, p. 1514-1521, 2012.
- MADJID, M. et al. Leukocyte count and coronary heart disease. **Journal of the American College of Cardiology**, Washington, D.C, v. 44, no. 10, p. 1945-1956, 2004.
- MCARDLE, W. D.; MONTOYE, H. J. Reliability of exhaustive swimming in the laboratory rat. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v. 21, no. 4, p. 1431-1434, 1966.
- NIEMAN, D. C.; NEHLSSEN-CANNARELLA, S. L. The immune response to exercise. **Seminars in Hematology**, New York, v. 31, no. 2, p. 166-179, 1994.
- NIEMAN, D. C.; PEDERSEN, B. K. Exercise and immune function. Recent developments. **Sports Medicine**, New York, v. 27, no. 2, p. 73-80, 1999.
- OLIVEIRA, A. C. et al. Sleep deprivation reduces total plasma homocysteine levels in rats. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, Ottawa, v. 80, no. 3, p. 193-197, 2002.
- PEDERSEN, B. K.; BRUUNSGAARD, H.; KLOKKER, M. et al. Exercise-induced immunomodulation: possible roles of neuroendocrine factors and metabolic factors. **International Journal of Sports Medicine**, Kempten, v. 18, no. 1, p. S2-7, 1997.
- PETERSEN, A. M.; PEDERSEN, B. K. The anti-inflammatory effect of exercise. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v. 98, no. 4, p. 1154-1162, 2005.
- PITTENDRIGH, C. S.; DAAN, S. A. A. Functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. IV. Entrainment: pacemaker as clock. **Journal of Comparative Physiology**, New York, v. 106, no. 3, p. 291-331, 1976.
- SEELAENDER, M. C.; KAZANTZIS, M.; COSTA ROSA, L. F. B. P. The effect of adrenaline and Walker-256 tumour-induced cachexia upon Kupffer cell metabolism. **Cell Biochemistry and Function**, Malden, v. 17, no. 3, p. 151-156, 1999.
- SEMPLE-ROWLAND, S. L.; DAWSON, W. W. Retinal cyclic light damage threshold for albino rats. **Laboratory Animal Science**, Illinois, v.37, no. 3, p. 289-298, 1987.
- STRASNER, A. et al. Effects of exercise intensity on natural killer cell activity in women. **International Journal of Sports Medicine**, Kempten, v. 18, no.1, p. 56-61, 1997.
- SUN, J.H. et al. Reduction in pineal N-acetyltransferase activity and pineal and serum melatonin levels in rats after their exposure to red light at night. **Neuroscience Letters**, Philadelphia, v. 149, no. 1, p. 56-58, 1993.
- TANAKA, H. et al. Circadian variation of thermoregulatory responses during exercise in rats. **American Journal of Physiology: regulatory, integrative, and comparative physiology**, Bethesda, v. 258, no. 4, p. 836-841, 1990.
- TEGTBUR, U.; BUSSE, M. W.; BRAUMANN, K. M. Estimation of an individual equilibrium between lactate production and catabolism during exercise. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, Hagerstown, v.25, no. 5, p. 620-627, 1993.
- VOLTARELLI, F.; GOBETTO, C. A.; MELLO, M. A. R. Determination of metabolic transition by lactate minimum test in malnourished rats during swimming exercise. **Revista da Educação Física**, Maringá, v. 18, no. 1, p. 33-39, 2007.

VOLTARELLI, F.; MELLO, M. A. R.; GOBATTO, C. A.
Muscle glycogen and anaerobic threshold for swimmin
rats. **Motriz**, Rio Claro, v. 10, n. 1, p. 25-30, 2004.

WIELGUS, A. R.E. et al. Blue light induced A2E oxidation in
rat eyes – experimental animal model of dry AMD.
Photochemical and Photobiology Sciences, Cambridge, v. 9,
no. 11, p. 1505-1512, 2010.

Recebido em 13/03/2014

Revisado em 11/02/2015

Aceito em 20/02/2015

Endereço para correspondência: Laboratório de Fisiologia Aplicada ao Esporte, Faculdade de Ciências Aplicadas, Universidade Estadual de Campinas, Campus Limeira – SP. Rua Pedro Zaccaria, 1300, Jardim Santa Luiza, CEP 13484-350, Limeira, São Paulo. E-mail: cgobatto@uol.com.br