

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Fisiologia e Biofísica

**Participação do sistema endocanabinoide central na
termorregulação durante as atividades físicas
espontânea e forçada**

Paulo Marcelo de Andrade Lima

Belo Horizonte
2016

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Fisiologia e Biofísica

**Participação do sistema endocanabinoide central na
termorregulação durante as atividades físicas
espontânea e forçada**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do título de doutor em Ciências Biológicas: Farmacologia.

Orientador: Dr. Cândido C. Coimbra

Paulo Marcelo de Andrade Lima

Belo Horizonte
2016

Trabalho realizado no Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Apoio financeiro: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

*Ao Prof. Cândido,
por sua conduta ética,
sabedoria e paciência enquanto orientador.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Cândido Celso Coimbra, um dos principais protagonistas na realização deste sonho. Ao senhor dedico esta tese. Obrigado por sua generosidade, paciência e sabedoria ao me orientar durante estes quase 7 anos de convivência. Sou grato pela sua preocupação com o meu crescimento acadêmico e pelas oportunidades que me proporcionou, mostrando-me que consigo vencer desafios que não imaginava ser capaz.

A minha família, especialmente aos meus pais, Roberto e Cerise, pelo amor que me é concedido e por todo apoio emocional e financeiro. Já se passam 11 anos em que a distância física nos separa, mas reconhecemos que a saudade vale a pena em prol dos objetivos que pretendo atingir.

Ao Departamento de Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, lugar que se tornou a minha segunda casa em todos estes anos. Se estende a todos os professores envolvidos no Programa de Pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia que contribuíram com a minha formação acadêmica; aos funcionários da secretaria do Programa de Pós-Graduação, pela competência e disponibilidade; aos bioteristas, por nos ajudar a cuidar dos animais; e aos funcionários dos serviços gerais, por nos permitir um ambiente de trabalho limpo e adequado.

Aos professores Samuel Penna Wanner, Jacqueline Isaura Alvarez Leite, Virgínia Soares Lemos, Vanessa Pinho da Silva e seus respectivos orientandos, Cletiana, Rachel, Josiane e Albená, pela confiança e oportunidade que me deram em colaborar com seus projetos de pesquisa.

Ao CNPq, por intermédio da população brasileira, pela concessão da bolsa de estudos, e à Fapemig e Capes pelo financiamento do nosso projeto de pesquisa.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo, Frederico, Helton, Lucas, Henrique, Quézia, Gleisy, Fernanda, Cristina, Roberta, Nayara, Laísa,

Juneo e Patrícia, pelo convívio sempre amigável, familiar e, principalmente, divertido. Espero que todos se tornem uma “borboleta” de muito sucesso!

Aos amigos de outros laboratórios, companheiros desde a época do Mestrado, Ana Flávia (Flavonete), Pedro (Gobiroba), Rosária e Talita, pela cumplicidade, “socorros” prestados, momentos de descontração... Torço pelo sucesso profissional e pessoal de vocês tão quanto o que desejo para mim!

A Simone, técnica do Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo, pela sua competência e preocupação em manter um ambiente de trabalho organizado e estruturado para o desenvolvimento de nossas pesquisas.

A família Ponto da Dança! Por inúmeras vezes, acho que só não me joguei do 4º andar do ICB porque sabia que teria um compromisso com vocês ao final do dia. Brincadeiras à parte, Belo Horizonte ficou melhor depois que os conheci. #osambavaidominaromundo!

A Deus, que me permitiu encontrar todas estas pessoas, fazendo esta trajetória valer a pena!

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização dessa tese.

RESUMO

Introdução: O sistema endocanabinoide (SEC) apresenta papel importante na regulação da temperatura corporal (Ti) e modula diversos comportamentos que poderiam influenciar na termorregulação, dentre os quais, o comportamento locomotor. Ademais, o SEC é ativado por demanda e tem sido demonstrado que os níveis de endocanabinoides, central e periférico, estão aumentados durante o exercício físico, um importante estressor térmico. Porém, ainda não está estabelecido se os efeitos térmicos mediados pelo SEC estão relacionados aos seus efeitos comportamentais (e vice-versa), bem como, se a sua ativação participa dos ajustes termorregulatórios requeridos durante o exercício físico.

Objetivo: O objetivo do presente estudo visa investigar a participação da anandamida (AEA) central sobre as respostas termorregulatórias em duas situações distintas de atividades físicas: durante a atividade locomotora espontânea (ALE) e durante o exercício físico forçado.

Metodologia: Ratos adultos da linhagem Wistar receberam injeções centrais de AEA e veículo, tanto em condições basais (em dois momentos do ritmo circadiano: fases de menor e de maior ALE e, conseqüentemente, de Ti), quanto previamente ao iniciarem um exercício progressivo de corrida em esteira até a fadiga. Para o protocolo de atividade espontânea, foram coletados registros contínuos e simultâneos de Ti e ALE; para o protocolo de atividade forçada, foram coletados registros de Ti e temperatura da pele da cauda (Tc – usado como parâmetro de avaliação da capacidade de dissipação de calor), e foram avaliados também o desempenho físico e o recrutamento neuronal hipotalâmico após o exercício. Por fim, para investigar se a ativação recorrente e crônica do SEC altera a expressão de seus componentes na fase adulta, ratos Wistar recém-desmamados (21 dias) foram submetidos a um protocolo de treinamento físico ou alimentados com dieta palatável durante 8 semanas e, ao final, foram quantificadas a expressão do receptor canabinoide do tipo CB₁ e da enzima NAPE-PLD (enzima responsável pela síntese de AEA) no cérebro destes animais.

Resultados: Administração central de AEA, em condições basais durante o ritmo circadiano, induziu aumento potente e persistente da Ti nas duas fases do ciclo,

conseguindo inclusive sobrepor o aumento da T_i comumente encontrada na fase escura. Este aumento da T_i ocorreu de forma independente de mudanças sobre o comportamento locomotor e ingestão alimentar. Porém, este efeito térmico da AEA parece alterar o perfil de locomoção dos animais, levando à uma redução da atividade espontânea, possivelmente como um mecanismo de resposta adaptativa frente ao aumento pronunciado da T_i . Por outro lado, durante o exercício físico forçado, a administração de AEA não alterou as respostas termorregulatórias; porém aumentou a expressão de c-Fos em núcleos hipotalâmicos (como o núcleo paraventricular do hipotálamo – PVN – e área pré-óptica medial – mPOA) e melhorou o desempenho físico dos animais. O treinamento físico e a dieta palatável apresentaram efeitos mais pronunciados em regiões cerebrais envolvidas no controle autonômico da temperatura corporal, onde reduziram a expressão do receptor CB_1 principalmente no hipotálamo e a expressão da enzima NAPE-PLD na área pré-óptica.

Conclusões: Os resultados do presente estudo demonstram que a maior biodisponibilidade de AEA central, por meio da sua administração intracerebroventricular, induz aumento da T_i em condições de repouso, e esta resposta térmica pode ocorrer de forma independente de mudanças comportamentais. Por outro lado, os ajustes termorregulatórios durante o exercício físico forçado não são alterados pela AEA; porém, os animais apresentaram melhor desempenho físico e maior recrutamento neuronal hipotalâmico, o que poderia ter contribuído para este efeito ergogênico não relacionado à termorregulação. Por fim, a indução para ativação recorrente do SEC altera a expressão de seus componentes centrais, sendo o hipotálamo a área mais responsiva aos tratamentos, onde tanto o treinamento físico, quanto o uso de dieta palatável, reduziram a expressão do receptor CB_1 e da enzima NAPE-PLD.

Palavras-chaves: anandamida, termorregulação, atividade locomotora, exercício físico.

ABSTRACT

Introduction: The endocannabinoid system (ECS) plays an important role on regulation of body temperature (T_b) and also modulates several behaviors that interfere on thermoregulation, such as locomotion. In addition, the ECS is activated by demand and it has been shown that both central and peripheral endocannabinoids levels are increased during exercise, an important thermal stressor. However, it remains unclear whether the thermal effects mediated by the ECS are related to their behavioral effects, and if their activation participates in thermoregulatory adjustments during exercise.

Aim: The aim of this study was to investigate the role of central anandamide (AEA) on thermoregulatory responses in two distinct experimental models of physical activities: during spontaneous locomotor activity (SLA) and forced physical exercise.

Methods: Adult Wistar rats received intracerebroventricular injections of AEA and vehicle, both in resting condition (in the two phases of higher and smaller SLA and, consequently, of T_b), as well as before a progressive treadmill exercise until fatigue. During the spontaneous activity protocol, T_b and SLA were collected continuously and simultaneously; during the forced activity protocol, T_b and skin tail temperature (T_t – used to determine the heat dissipation ability) were recorded. Physical performance and hypothalamic neuronal recruitment after exercise were also evaluated. Finally, to investigate whether recurrent activation of ECS alters the expression of its components in adulthood, weanling Wistar rats (21 days) underwent a physical training protocol or were with fed palatable diet for 8 weeks. After such period, the expression of the CB₁ receptor and NAPE-PLD (enzyme responsible for the AEA synthesis) in the brains were quantified.

Results: Central AEA treatment in resting condition during the circadian rhythm induced a potent and persistent increase in T_b in the two phases of the cycle, getting even which overlapped the characteristic hyperthermia of the dark phase. This increase in T_b occurred independently of changes on locomotor behavior and food intake. However, this thermal effect of AEA appears to alter the locomotor behavior profile, leading to a reduction of spontaneous activity, possibly as an adaptive mechanism in response to pronounced hyperthermia. On the other hand, during the

forced physical exercise, AEA treatment did not alter the thermoregulatory responses, but increased c-Fos expression in hypothalamic nuclei (such as the paraventricular nucleus of the hypothalamus – PVN – and medial preoptic area – mPOA), and improved physical performance. Physical training and palatable diet showed more pronounced effects in brain regions involved in autonomic control of the Tb, where the expression of CB₁ receptor and of NAPE-PLD enzyme were reduced mainly in the hypothalamus and the preoptic area.

Conclusions: The results of this study show that increased bioavailability of AEA central, through its intracerebroventricular administration, induces an increase in Tb during resting condition, and its thermal response can occur independently of behavioral changes. On the other hand, the thermoregulatory adjustments during forced exercise are not affected by the AEA. However, the animals show improved physical performance and increased hypothalamic neuronal recruitment, which could have contributed to this ergogenic effect, not related to thermoregulation. Finally, induction of recurrent ECS activation alters the expression of its components, being the hypothalamus the more responsive area, where both the physical training and palatable diet reduced the expression of CB₁ receptor and NAPE-PLD.

Key-words: anandamide, thermoregulation, locomotor activity, physical exercise.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura química dos principais endocanabinoides.

Figura 2. Principais vias biossintéticas da AEA e 2-AG.

Figura 3. Hidrólises da AEA e 2-AG via ação das enzimas FAAH e MAGL, respectivamente.

Figura 4. Sinalização mediada pela ativação de receptores canabinoides.

Figura 5. Respostas termorregulatórias em ratos submetidos ao exercício de corrida submáximo até a fadiga, em ambiente temperado.

Figura 6. Representação esquemática do protocolo experimental elaborado para avaliação do efeito da administração i.c.v. de AEA sobre a ALE e resposta térmica em condições basais.

Figura 7. Representação esquemática do protocolo experimental elaborado para avaliação do efeito da administração i.c.v. de AEA sobre o desempenho físico e sua relação com os ajustes termorregulatórios e recrutamento neuronal hipotalâmico induzido pelo exercício de corrida em esteira.

Figura 8. Efeito da administração i.c.v. de AEA, às 10 h, sobre a temperatura corporal interna durante o ritmo circadiano.

Figura 9. Comparação do efeito da administração i.c.v. de AEA, às 10 h, entre valores médios de temperatura corporal interna em 3 diferentes fases do ritmo circadiano.

Figura 10. Efeito da administração i.c.v. de AEA, às 10 h, sobre a atividade locomotora espontânea durante o ritmo circadiano.

Figura 11. Comparação do efeito da administração i.c.v. de AEA, às 10 h, entre os valores médios de atividade locomotora espontânea em 3 diferentes fases do ritmo circadiano.

Figura 12. Efeito da administração i.c.v. de AEA, às 10 h, sobre a temperatura corporal interna nos primeiros 60 min após o tratamento.

Figura 13. Efeito da administração i.c.v. de AEA, às 10 h, sobre a atividade locomotora espontânea nos primeiros 60 min após o tratamento.

Figura 14. Correlações entre Ti e ALE durante as fases do ritmo circadiano sem efeito térmico induzido pelo tratamento às 10 h.

Figura 15. Comparações entre os efeitos mediados pelos tratamentos com veículo e 10 µg de AEA, às 10 h, sobre as correlações entre Ti e ALE.

Figura 16. Efeito da administração i.c.v. de AEA, às 10 h, sobre a ingestão alimentar diária.

Figura 17. Efeito da administração i.c.v. de AEA, às 19 h, sobre a temperatura corporal interna durante o ritmo circadiano.

Figura 18. Efeito da administração i.c.v. de AEA, às 19 h, sobre os valores médios de temperatura corporal interna em 3 diferentes fases do ritmo circadiano.

Figura 19. Efeito da administração i.c.v. de AEA, às 19 h, sobre a atividade locomotora espontânea durante o ritmo circadiano.

Figura 20. Efeito da administração i.c.v. de AEA, às 19 h, sobre os valores médios de atividade locomotora espontânea em 3 diferentes fases do ritmo circadiano.

Figura 21. Efeito da administração i.c.v. de AEA, às 19 h, sobre a temperatura corporal interna nos primeiros 60 min após o tratamento.

Figura 22. Efeito da administração i.c.v. de AEA, às 19 h, sobre a atividade locomotora espontânea nos primeiros 60 min após o tratamento.

Figura 23. Correlações entre Ti e ALE durante as fases do ritmo circadiano sem efeito térmico induzido pelo tratamento às 19 h.

Figura 24. Comparações entre os efeitos mediados pelos tratamentos com veículo e 10 µg de AEA, às 19 h, sobre as correlações entre Ti e ALE.

Figura 25. Efeito da administração i.c.v. de AEA, às 19 h, sobre a ingestão alimentar diária.

Figura 26. Efeito da administração i.c.v. de 10 µg de AEA sobre as respostas termorregulatórias induzidas pelo exercício progressivo de corrida em esteira.

Figura 27. Efeito da administração i.c.v. de 20 µg de AEA sobre as respostas termorregulatórias induzidas pelo exercício progressivo de corrida em esteira.

Figura 28. Correlações entre o tempo de exercício e as variáveis termorregulatórias.

Figura 29. Efeito da administração i.c.v. de 20 µg de AEA sobre a expressão da proteína c-Fos induzida pelo exercício no PVN.

Figura 30. Efeito da administração i.c.v. de 20 µg de AEA sobre a expressão da proteína c-Fos induzida pelo exercício na mPOA.

Figura 31. Efeito da administração i.c.v. de 20 µg de AEA sobre a expressão da proteína c-Fos induzida pelo exercício no SON.

Figura 32. Evolução do ganho de peso corporal em ratos controle e submetidos ao tratamento com dieta palatável ou treinamento físico.

Figura 33. Efeito do treinamento físico sobre o desempenho físico.

Figura 34. Efeito do treinamento físico e dieta palatável sobre a expressão de receptores CB₁ em diferentes regiões cerebrais.

Figura 35. Efeito do treinamento físico e dieta palatável sobre a expressão da enzima NAPE-PLD em diferentes regiões cerebrais.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Esquematização do protocolo de treinamento físico.

Tabela 2. Composição nutricional das dietas controle e palatável.

Tabela 3. Efeito da administração i.c.v. de 10 µg de AEA sobre os parâmetros termorregulatórios e de desempenho físico durante o exercício progressivo de corrida em esteira.

Tabela 4. Efeito da administração i.c.v. de 20 µg de AEA sobre os parâmetros termorregulatórios e de desempenho físico durante o exercício progressivo de corrida em esteira.

Tabela 5. Caracterização da distribuição lipídica e perfil bioquímico em ratos controle e submetidos ao tratamento com dieta palatável ou treinamento físico.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- Δ^9 -THC → Δ^9 -tetrahydrocannabinol.
- 2-AG → 2-araquidonoilglicerol.
- 3V → terceiro ventrículo cerebral.
- AEA → anandamida.
- ALE → atividade locomotora espontânea.
- BDNF → fator neurotrófico derivado do cérebro.
- DAG → 1,2-diacilglicerol.
- DAGL → diacilglicerol lipase.
- FAAH → amida hidrolase de ácido graxo.
- GAPDH → gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase.
- GPCR → receptor acoplado à proteína G.
- i.c.v. → intracerebroventricular.
- i.p. → intraperitoneal.
- MAGL → monoacilglicerol lipase.
- NAPE → N-araquidonoil-fosfatidiletanolamina.
- NAPE-PLD → N-acil-fosfatidiletanolamina-fosfolipase D.
- NAT → N-acetiltransferase.
- PLC → fosfolipase C.
- POA → área pré-óptica.
- PPAR → receptor ativado por proliferadores de peroxissoma.
- PVN → núcleo paraventricular do hipotálamo.
- SEC → sistema endocanabinoide.
- SNC → sistema nervoso central.
- SON → núcleo supra-óptico.
- Tc → temperatura da pele da cauda.
- Ti → temperatura corporal interna.
- TRPV1 → receptor de potencial transitório vaniloide do tipo 1.
- VCLD → ventrículo cerebral lateral direito.

SUMÁRIO

1 – Introdução e Justificativa.....	18
2 – Revisão Bibliográfica.....	20
2.1 – Sistema endocanabinoide – Contexto geral.....	20
2.1.1 – Receptores canabinoides.....	20
2.1.2 – Endocanabinoides.....	21
2.1.3 – Síntese e inativação dos endocanabinoides.....	22
2.1.4 – Sinalização mediada pela ativação dos receptores canabinoides.....	24
2.2 – Atividade física e Sistema endocanabinoide.....	25
2.3 – Termorregulação e Sistema endocanabinoide.....	28
3 – Objetivos.....	33
4 – Materiais e Métodos.....	35
4.1 – Cuidados éticos.....	35
4.2 – Animais.....	35
4.3 – Procedimentos gerais.....	35
4.3.1 – Familiarização ao exercício na esteira.....	35
4.3.2 – Treinamento físico.....	36
4.3.3 – Procedimentos cirúrgicos.....	37
4.3.3.1 – Implante da cânula-guia no ventrículo cerebral lateral direito.....	37
4.3.3.2 – Implante do sensor de temperatura e atividade locomotora na cavidade peritoneal.....	38
4.4 – Protocolos experimentais.....	38
4.4.1 – Avaliação do efeito da administração intracerebroventricular de AEA sobre a atividade locomotora espontânea e resposta térmica em condições basais.....	38

4.4.2 – Avaliação do efeito da administração intracerebroventricular de AEA sobre o desempenho físico e sua relação com os ajustes termorregulatórios e recrutamento neuronal hipotalâmico induzido pelo exercício de corrida em esteira.....	40
4.4.3 – Efeito do treinamento físico e dieta palatável sobre a expressão cerebral de receptores CB ₁ e da enzima NAPE-PLD.....	41
4.5 – Ensaio biológicos.....	43
4.5.1 – Ensaio imunohistoquímico para quantificação da proteína c-Fos.....	43
4.5.2 – Western Blotting para análise da expressão do receptor CB ₁ e da enzima NAPE-PLD no cérebro.....	44
4.5.3 – Quantificação dos níveis plasmáticos de insulina, leptina e glicose.....	45
4.6 – Análise estatística.....	45
5 – Resultados.....	47
5.1 – Efeito da administração i.c.v. de AEA sobre a atividade locomotora espontânea e resposta térmica em condições basais.....	47
5.2 – Efeito da administração i.c.v. de AEA sobre o desempenho físico, ajustes termorregulatórios e recrutamento neuronal hipotalâmico durante o exercício forçado.....	62
5.3 – Efeito do treinamento físico e dieta palatável sobre a expressão cerebral de receptores CB ₁ e NAPE-PLD.....	71
6 – Discussão.....	76
7 – Conclusões.....	87
8 – Referências bibliográficas.....	88
9 – Anexo.....	101

1 – INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Atividade física pode ser definida como qualquer movimento corporal, produzido pelos músculos esqueléticos, que resulta em gasto energético maior do que os níveis de repouso. O exercício físico (um de seus principais componentes), por sua vez, consiste de uma atividade física planejada, estruturada e repetitiva que objetiva melhorar ou manter o desempenho de uma ou mais capacidades físicas.

É bem estabelecido que o exercício físico induz mudanças na atividade comportamental e que, através da liberação de mediadores químicos, levam ao que chamamos de “recompensas neurobiológicas”, na qual incluem sensação de bem-estar, analgesia, diminuição da ansiedade e melhora do humor. Os mecanismos que são a base destas mudanças ainda não estão totalmente elucidados, mas o sistema endocanabinoide (SEC) vem-se demonstrando como um mediador importante destas respostas.

O SEC é representado pelos receptores canabinoides, seus ligantes endógenos e as enzimas que participam das vias metabólicas para a síntese e degradação dos endocanabinoides. Vários estudos em humanos confirmaram que os níveis de endocanabinoides séricos são aumentados durante a prática de atividade física e, como são compostos altamente lipofílicos que conseguem atravessar a barreira hematoencefálica, estão implicados nas funções relativas ao controle motor, cognitivo, emocional e de recompensa. Além disso, estudos utilizando modelos animais demonstraram que o SEC está também diretamente relacionado à condição motivacional para realizar uma atividade física voluntária.

Além da sua participação sobre o comportamento emotivo (ansiedade, depressão, fobias), função cognitiva e mecanismos de recompensa, o SEC apresenta também um papel importante no controle do movimento, postura e coordenação motora e na regulação de funções autonômicas dos sistemas neuroendócrino e cardiovascular que, em conjunto, podem influenciar na regulação da temperatura corporal. De fato, estudos comprovaram a participação do SEC na termorregulação; porém ainda não é conhecido se os efeitos térmicos induzidos pelo SEC estão relacionados aos efeitos comportamentais também mediados por este sistema, e vice-versa.

Ainda neste contexto, o exercício físico aumenta a produção de calor metabólico, dependendo da sua intensidade, duração e do ambiente na qual o indivíduo o realiza, induzindo aumento da temperatura corporal interna. Em resposta a esta hipertermia, que pode levar à ameaça da homeostase corporal, o organismo apresenta mecanismos compensatórios para ajudar a dissipar este calor produzido. Além disso, o aumento da temperatura corporal é considerado um dos fatores limitantes do desempenho físico, uma vez que diminui a motivação para a continuidade do exercício e assim, aumenta a percepção de fadiga, o que tende a ser um mecanismo de defesa que ocorre antes que o sistema atinja um limite fisiológico que possa gerar riscos à integridade do indivíduo. Sabendo-se que o SEC é ativado durante a atividade física e que participa de mecanismos termorregulatórios, é plausível sugerir também que o SEC possa participar de ajustes térmicos durante o exercício físico e, conseqüentemente, modular o desempenho.

Sendo assim, uma vez que o SEC é ativado por demanda e que, ao ser ativado, participa da regulação da temperatura corporal e comportamento locomotor, tais fatos nos levaram a investigar se os efeitos térmicos induzidos pelo SEC são dependentes de mudanças sobre este comportamento; e se a ativação do SEC durante o exercício físico forçado é importante para os ajustes termorregulatórios que, por sua vez, pode modular o desempenho físico.

2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – SISTEMA ENDOCANABINOIDE – CONTEXTO GERAL

O sistema endocanabinoide (SEC) consiste de um sistema de sinalização endógeno constituído pelos receptores canabinoides, seus ligantes endógenos e as enzimas que catalisam sua biossíntese e degradação [1, 2].

Sua denominação deriva-se do nome da planta *Cannabis sativa* (um arbusto da família *Moraceae*, popularmente conhecida como marijuana ou maconha), visto que, tanto o seu principal composto químico, o Δ^9 -tetra-hidrocanabinol (Δ^9 -THC), quanto os ligantes endógenos (endocanabinoides) atribuídos a este sistema, induzem seus efeitos ao se ligarem aos mesmos receptores celulares (receptores canabinoides) e induzirem as mesmas cascatas intracelulares de sinalização. Daí a denominação *endo-*, de endógeno, e *-canabinoide*, de *Cannabis* [3-5].

2.1.1 – Receptores canabinoides

Os receptores canabinoides pertencem à família dos receptores de membrana acoplados à proteína G (GPCR; do inglês, *G-protein-coupled-receptor*). Em 1988, o primeiro receptor canabinoide foi identificado através da descoberta de sítios de ligação para o Δ^9 -THC no cérebro de ratos [6] e, em 1990, foi clonado e caracterizado [7]. Em 1993, esse receptor foi denominado CB₁, pois neste mesmo ano, um segundo receptor foi identificado em células do sistema imune e designado como CB₂ [8].

A sequência de aminoácidos do receptor CB₁ é relativamente conservada em diversas espécies. Comparado aos humanos, receptores CB₁ em macacos, ratos e camundongos apresentam homologia de 100%, 97% e 97%, respectivamente. Os receptores CB₂ possuem cerca de 50% de homologia com os receptores CB₁ [9-11].

Dentre os GPCR, os receptores CB₁ são os mais abundantes identificados no sistema nervoso central (SNC) e sua distribuição relaciona-se com seus principais efeitos fisiológicos. Assim, a maior expressão encontrada no córtex, hipocampo, núcleos da base e cerebelo está em conformidade com sua participação mais comumente associada à modulação da memória, cognição, movimento e nocicepção. Vale ressaltar que a distribuição dos receptores CB₁ no cérebro é ampla, sendo

também encontrado em regiões do tronco encefálico (principalmente núcleo parabraquial, locus coeruleus e núcleos da rafe), amígdala e regiões do diencéfalo (principalmente área pré-óptica e núcleos hipotalâmicos) [12-15]. Devido à expressão predominante do receptor CB₁ no cérebro, ele é geralmente referido como o receptor canabinoide cerebral, porém pode ser encontrado também em órgãos periféricos, tais como coração, pulmão, intestino, fígado, pâncreas, testículos e ovários [16-19].

Em contraste com o receptor CB₁, o receptor CB₂ é primariamente expresso em células do sistema imune na periferia e sua ativação resulta em um fenótipo imunossupressor. São encontrados principalmente em células T, B, NK e macrófagos, e em órgãos como o baço, amígdalas, medula óssea e timo [8, 16, 18, 20, 21].

2.1.2 – Endocanabinoides

Com a descoberta dos receptores canabinoides e as evidências de que o fitocanabinoide Δ^9 -THC liga-se especificamente a receptores com estrutura proteica e desencadeia eventos de sinalização, passou-se a buscar compostos endógenos que poderiam eventualmente funcionar como neurotransmissor ou hormônio ao se ligarem nos receptores CB₁ e CB₂.

Em 1992, o primeiro ligante endógeno dos receptores canabinoides foi isolado em cérebro de porcos; uma etanolamina do ácido araquidônico, nomeada anandamida (AEA). Esta é uma palavra derivada do sânscrito, que significa “êxtase, felicidade ou extrema alegria” [22]. Três anos mais tarde, um segundo endocanabinoide, 2-araquidonoilglicerol (2-AG), foi isolado em intestino de cães [23]. Outros compostos endógenos com capacidade de se ligarem aos receptores canabinoides têm sido descobertos [24-27], agrupando-os como endocanabinoides (Figura 1).

A AEA e o 2-AG são os endocanabinoides mais bem caracterizados e estudados até o momento. Ambos os endocanabinoides são agonistas dos receptores CB₁ e CB₂, sendo a AEA um agonista parcial dos receptores CB₁ e que se liga fracamente aos receptores CB₂, enquanto que o 2-AG possui afinidade similar para ambos os tipos de receptores [28-30]. Além dos receptores canabinoides, AEA e 2-AG também podem se ligar a outros receptores incluindo os PPARs (do inglês, *nuclear peroxisome proliferator-activated receptors* ou receptores ativados por proliferadores de peroxissoma) e, no caso da AEA, ainda pode funcionar como agonista dos

receptores TRPV1 (do inglês, *transient receptor potential vanilloid-1* ou receptor de potencial transitório vaniloide do tipo 1) [31-35].

Os endocanabinoides, por apresentarem características lipofílicas, não são armazenados em vesículas como neurotransmissores tradicionais, mas sim, são sintetizados “por demanda”; isto é, são sintetizados e liberados “quando e onde” necessários. Conseqüentemente, a regulação da sinalização dos endocanabinoides é intimamente controlada pela sua síntese, liberação, captação e degradação durante um estímulo ativador [1, 36].

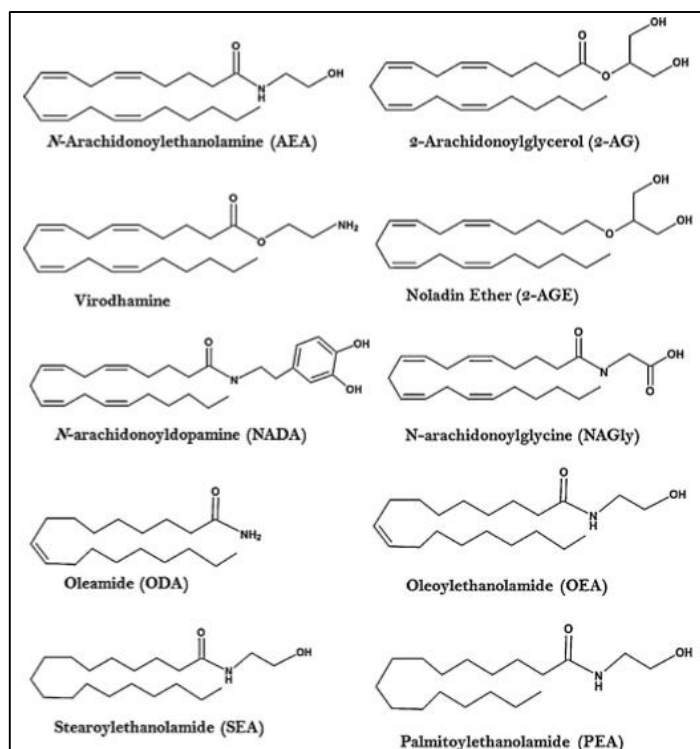


Figura 1. Estrutura química dos principais endocanabinoides [2].

2.1.3 – Síntese e inativação dos endocanabinoides

Apesar de apresentarem vias biossintéticas diferentes, a AEA e o 2-AG têm como precursor comum os fosfolipídios de membrana. A via clássica para a síntese da AEA inicia-se pela ativação da enzima N-aciltransferase (NAT) – induzida pelo aumento intracelular de cálcio via despolarização celular ou mobilização intracelular –, que catalisa a transferência do ácido araquidônico da fosfatidilcolina para a fosfatidiletanolamina, formando o precursor N-araquidonil-fosfatidiletanolamina (NAPE) que, ao sofrer ação da N-acil-fosfatidiletanolamida-fosfolipase D seletiva (NAPE-PLD),

também ativada por cálcio, leva à hidrólise da ligação fosfodiéster da NAPE, liberando AEA (Figura 2) [2, 37, 38].

A síntese do 2-AG inicia-se pela remoção do grupamento inositol do fosfatidilinositol formando a 1,2-diacilglicerol (DAG) (etapa catalisada pela fosfolipase C, PLC) seguida de desacetilação via ação da diacilglicerol-lipase (DAGL; Figura 2) [2, 37, 38].

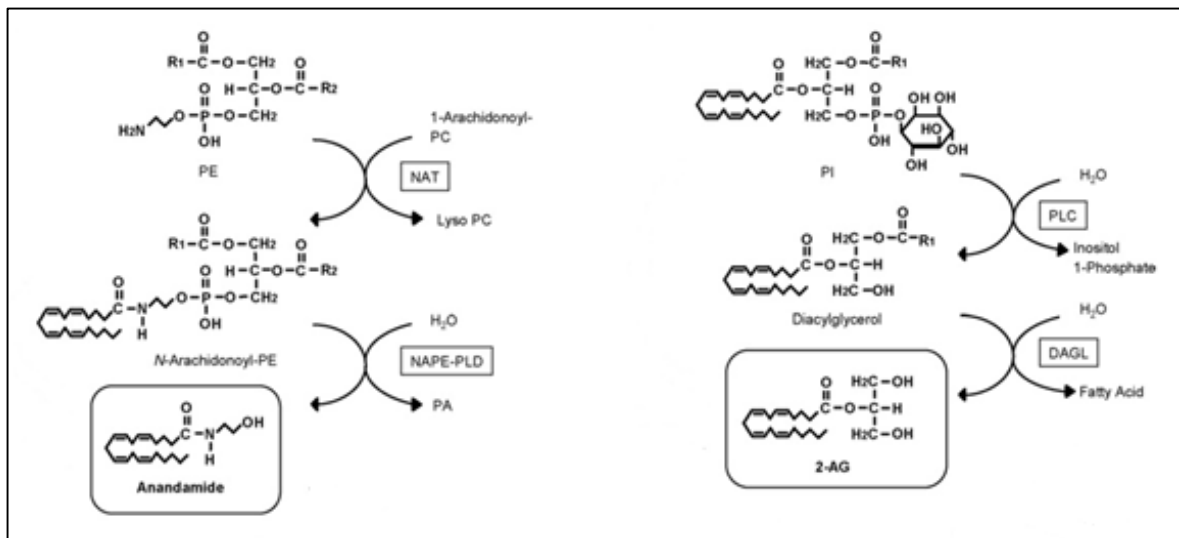


Figura 2. Principais vias biossintéticas da AEA e 2-AG (Adaptado de [38]).

Tanto a AEA quanto o 2-AG têm suas ações interrompidas por processo de captação neuronal, seguida de seu metabolismo no meio intracelular. Essa etapa parece ocorrer por simples difusão e/ou através de processo facilitado por uma proteína transportadora [2, 37, 39].

Ambos os endocanabinoides são rapidamente metabolizados em compostos inativos que poderão ser reciclados e utilizados para nova síntese de endocanabinoides ou outros compostos endógenos. A enzima FAAH (do inglês - *fatty acid amide hydrolase* ou amida hidrolase de ácido graxo) metaboliza tanto a AEA, quanto o 2-AG, e promove a hidrólise destes endocanabinoides à ácido araquidônico e etanolamida. O 2-AG ainda pode ser hidrolisado via ação enzimática da MAGL (do inglês - *monoacylglycerol lipase* ou monoacilglicerol lipase) liberando ácido araquidônico e glicerol (Figura 3) [2, 37, 39].

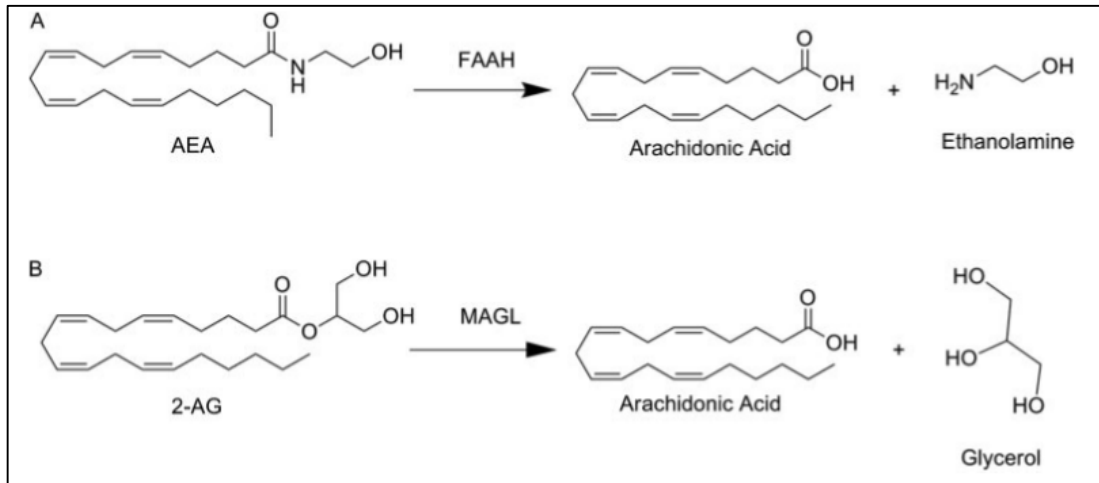


Figura 3. Hidrólises da AEA e 2-AG via ações das enzimas FAAH e MAGL, respectivamente [39].

Além da hidrólise, a inativação da AEA e do 2-AG ainda pode ser induzida via oxidação enzimática mediada por cicloxigenases e lipoxigenases [2, 39].

2.1.4 – Sinalização mediada pela ativação dos receptores canabinoides

Os endocanabinoides agem como neurotransmissores, porém uma característica peculiar do SEC é sua atuação como mensageiros cerebrais retrógrados, isto é, diferente da sequência usual, o estímulo começa no neurônio pós-sináptico. A excitação neuronal pós-sináptica leva à despolarização e ao influxo de íons cálcio que estimulam as fosfolipases dando início a síntese dos endocanabinoides. Esses são liberados na fenda sináptica e ativam os receptores CB₁ nos terminais pré-sinápticos neuronais [40-43].

O mecanismo de transdução de sinais desses receptores canabinoides envolve vias com a participação da proteína G_{i/o}. Dessa forma, a ativação desses receptores regulam a atividade da adenilato-ciclase (ao qual inibe) e de proteínas quinases – MAPK, FAK, ERK, JNK – (as quais estimulam). No caso específico dos receptores CB₁, a modulação ainda se faz sobre canais iônicos, podendo inibir canais para cálcio ativados por voltagem (canais para cálcio tipo N- ou P/Q-) e estimular canais para potássio (Figura 4) [2, 9, 18, 42].

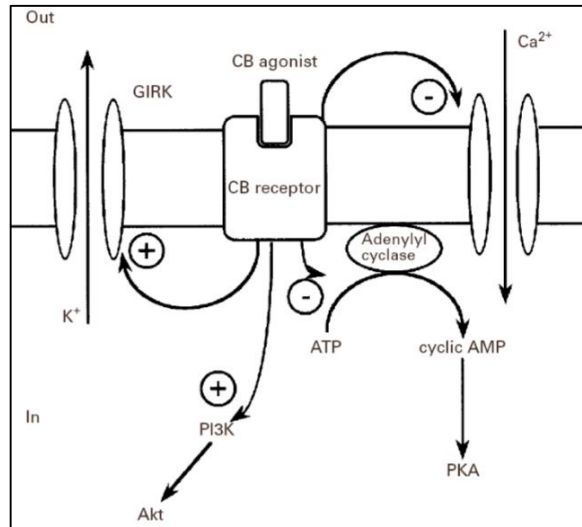


Figura 4. Sinalização mediada pela ativação de receptores canabinoides (Adaptado de [44])

Como consequência, a ativação dos receptores canabinoides causa um efeito pré-sináptico inibitório ao induzir hiperpolarização celular suprimindo a liberação de neurotransmissores tanto excitatórios, quanto inibitórios.

2.2 – ATIVIDADE FÍSICA E SISTEMA ENDOCANABINOIDE

A atividade física consiste de qualquer movimento corporal, produzido pelos músculos esqueléticos, que resulta em gasto energético maior do que os níveis de repouso. O exercício físico (um de seus principais componentes), por sua vez, consiste de uma atividade física planejada, estruturada e repetitiva que objetiva melhorar ou manter o desempenho de uma ou mais capacidades físicas [45].

Os primeiros estudos avaliando uma possível relação entre o exercício físico e o SEC se basearam nos efeitos psicoativos relatados por usuários após o uso recreacional da maconha que se assemelhavam às “recompensas neurobiológicas” (referidas como “*runner’s high*”) relatadas por indivíduos após a prática de atividade física moderada e intensa. Estes relatos incluíam a sensação de bem-estar, analgesia, diminuição da ansiedade e melhora do humor [46-54]. Dessa forma, tem sido sugerido que um dos mecanismos envolvidos nesses efeitos positivos relatados após a prática de atividade física, poderia ser mediado, pelo menos em parte, pela ativação do SEC.

Em 2003, pela primeira vez, foi demonstrado que o SEC é ativado pelo exercício físico. Estudantes fisicamente ativos do sexo masculino, após serem submetidos ao exercício sob intensidade moderada (70 – 80% da frequência cardíaca máxima) em esteira ou bicicleta ergométrica por 50 minutos apresentaram aumentos nos níveis plasmáticos de AEA. Estes resultados sugeriram que a ativação do SEC poderia ser um possível mecanismo envolvido nos efeitos recompensadores do exercício devido a capacidade da AEA atravessar a barreira hematoencefálica e a densa concentração de receptores canabinoides em regiões cerebrais implicadas nas funções relativas ao controle motor, cognitivo, emocional e de recompensa [55].

A partir deste estudo, no ano seguinte, Dietrich e McDaniel (2004), em uma revisão bibliográfica, também propuseram o papel do SEC na contribuição das sensações de bem-estar relacionadas ao exercício físico e, ainda, uma possível participação na melhoria do desempenho físico por atletas [47]. Porém, até o presente momento, nenhum estudo confirmou esta última hipótese.

Quase uma década após, novos grupos retomaram as pesquisas envolvendo a relação entre SEC e atividade física, reforçando a hipótese de que o exercício induz ativação do SEC.

Em 2012, Raichlen e colaboradores concluíram que o aumento de AEA sérica é dependente da intensidade do exercício, uma vez que somente em exercício de corrida de intensidade moderada (~ 70 – 85% da frequência cardíaca máxima ajustada pela idade) induzia tal resposta. Levando em consideração que os efeitos positivos nas mudanças psicológicas induzidas pelo exercício físico reportadas por corredores são dependentes da intensidade – em geral, seguindo a “*U-shaped curve*”, onde melhores efeitos são verificados em níveis médios de intensidade e, efeitos mínimos acontecem em intensidades baixas e altas –, os autores reforçaram a hipótese de que o SEC poderia estar relacionado com os mecanismos de recompensa neurobiológico associados à prática de atividade física [56].

No mesmo ano, Heyman e colaboradores (2012) também encontraram aumento nos níveis circulantes de AEA após uma sessão de corrida à 55 e 75% da capacidade de trabalho máxima, sendo que o aumento relativo comparado aos valores basais foi superior na maior intensidade de exercício. De forma interessante, foi verificado também uma correlação positiva entre as concentrações de AEA e BDNF (do inglês, *brain-derived neurotrophic factor* ou fator neurotrófico derivado do cérebro) circulante. O BDNF é a principal neurotrofina responsável pela plasticidade cerebral

induzida pelo exercício e pelo efeito antidepressivo induzido pela ativação do SEC. Isto sugere que o exercício agudo representaria um estressor fisiológico apto a aumentar os níveis circulantes de AEA e que o BDNF poderia ser um dos mecanismos pelos quais a AEA influenciaria na neuroplasticidade e nos efeitos antidepressivos do exercício [57].

Feuerecker e colaboradores (2012) também verificaram que atletas, logo após completarem uma competição de aventura de longa duração envolvendo condições extremas de altitudes, apresentaram aumento nos níveis plasmáticos de AEA, quando comparados aos seus valores basais. Neste estudo, tanto a caminhada em ambiente normóxico (< 2.100 m; 4 – 4,5 h), quanto em ambiente hipóxico (> 3.000 m; 3,5 – 5,5 h), promoveram aumentos de 2 e 3 vezes, respectivamente, nos níveis séricos de AEA [58].

Ao exemplo dos seres humanos, outras espécies de mamíferos também apresentam características naturais de realização de exercício regulares, os chamados mamíferos cursoriais. Para testar a hipótese de que a sinalização do SEC induzida pelo exercício poderia ser responsável pela motivação do comportamento locomotor nestas espécies, Raichlen e colaboradores (2012) investigaram o efeito da atividade de 30 min de corrida ou caminhada sob os níveis séricos de AEA e 2-AG em 3 diferentes espécies: humanos e cães (mamíferos cursoriais) e furões (mamíferos não-cursoriais). Foi verificado que, para apenas os humanos e cães, mas não para os furões, a atividade proposta promoveu aumento nos níveis séricos de AEA. Além disso, em humanos, os níveis aumentados de AEA relacionaram-se diretamente com a pontuação de efeitos psicológicos positivos relatados pelos participantes após a realização da atividade [59].

Ainda neste contexto da participação do SEC sobre as recompensas neurobiológicas induzidas pelo exercício, os trabalhos mais recentes utilizando animais, confirmaram que a antinocicepção induzida pelo exercício é, ao menos em parte, mediada pela ativação do SEC. Foi verificado que tanto o exercício de corrida quanto o exercício de força aumentam os níveis periféricos de AEA e 2-AG. Além disso, as sessões de exercício induziram aumento na expressão de receptores CB₁ no cérebro, bem como a taxa de ativação desses neurônios na substância cinzenta periaquedutal (importante região envolvida nas vias nociceptivas). Vale ressaltar ainda que, de maneira geral, bloqueios central e periférico com antagonistas CB₁ e CB₂ preveniram o aumento do limiar nociceptivo induzido pelo exercício, enquanto que

drogas inibidoras das enzimas que degradam a AEA e 2-AG potencializaram e prolongaram o tempo de antinocicepção induzida pelo exercício [60, 61].

Todos estes estudos investigaram a provável participação do SEC sobre os efeitos comportamentais induzidos pelo exercício físico. Porém, até o momento, não há relatos se a ativação do SEC poderia induzir ajustes fisiológicos requeridos durante a atividade física que, dessa forma, pudesse influenciar no desempenho físico. Além disso, a maioria destes trabalhos ficaram restritos à confirmação da ativação periférica do sistema, não havendo estudos sobre as vias centrais envolvidas nestas respostas. Assim, modelos animais de experimentação poderão auxiliar neste entendimento.

Os trabalhos realizados em modelos animais estão restritos ao estudo de exercício físico no contexto de atividade voluntária e o SEC parece estar diretamente relacionado à condição motivacional para realização do exercício proposto [62].

Foi demonstrado que o bloqueio do receptor CB₁ diminui a atividade voluntária na roda [63] e reduz o comportamento operante de realizar o exercício voluntário [64]. Animais *knock-out* para o receptor CB₁ são hipoativos e apresentam desempenho menor na roda quando comparados à linhagem selvagem [65]. Por outro lado, o livre acesso à roda de atividade eleva a expressão de mRNA para o receptor CB₁ e o conteúdo total de AEA no hipocampo, sem alterar a atividade hidrolítica da enzima FAAH, refletindo o aumento potencial da biossíntese de AEA [66, 67].

2.3 – TERMORREGULAÇÃO E SISTEMA ENDOCANABINOIDE

Os organismos homeotérmicos, em que podemos incluir os seres humanos e demais mamíferos, possuem a capacidade de manter a temperatura corporal interna (Ti) dentro de limites estreitos de variação, mesmo quando expostos a ambientes extremos de temperatura. Como organismos endotérmicos, os seres humanos geram seu próprio calor a partir do metabolismo corporal e este calor é conservado devido à baixa condutividade térmica do organismo [68, 69].

Grandes variações na Ti podem ser suficientes para alterar diversas propriedades moleculares, tais como atividade enzimática, capacidade de difusão, fluidez da membrana, e conseqüentemente, prejudicar o funcionamento celular. Essas perturbações podem resultar em perda da coordenação motora, confusão mental, inconsciência, disfunções cardiovasculares e respiratórias e, eventualmente, em

morte [70, 71]. Assim, a termorregulação é crítica para a sobrevivência dos mamíferos e pode ser mantida por processos comportamentais e autonômicos.

Os eventos comportamentais são bastante diversificados e representa uma ação coordenada que promove uma condição ótima de troca de calor entre o ambiente e o corpo. No caso de humanos, entre os exemplos, podemos citar a invenção de vestimentas, a construção de abrigos, o uso de fogo e eletricidade para fornecimento de calor; em animais, esses mecanismos também são variados e característicos de cada espécie (construção de ninhos, alteração da atividade locomotora, ingestão de alimentos, ajustes posturais e escolha da temperatura ambiente de preferência) [72].

O sistema termorregulatório autonômico pode ser dividido em 3 componentes: um componente sensório aferente, um componente integrador e um componente de comando eferente. O centro termorregulatório no cérebro recebe informações provenientes de diversas vias neuronais sensórias aferentes, incluindo a temperatura ambiente através termorreceptores da pele, temperatura visceral através de fibras termossensórias da cavidade abdominal e temperatura central através de neurônios termossensíveis no cérebro e medula espinhal. Essas informações centrais e periféricas, juntamente com outros parâmetros homeostáticos (i.e., osmolaridade dos fluidos teciduais, atividade do sistema imune, variação circadiana, ritmo sazonal, apetite, sono) são integradas no centro termorregulatório que, por sua vez, promove sinais de comando para efetores periféricos [73].

Em mamíferos, a área pré-óptica (POA), localizada na região rostral do hipotálamo, tem sido apresentada como principal centro termorregulatório, uma vez que integra as informações aferentes e regula o redirecionamento de fluxo sanguíneo e a termogênese induzida pelo tecido adiposo marrom e tremor muscular. Em resumo, a manutenção da T_i é resultado do balanço entre a produção e a dissipação de calor pelo organismo, as quais são controladas pela ativação ou inibição dos efetores termorregulatórios; assim, diminuição da T_i ativa os mecanismos de produção de calor e inibe os mecanismos de perda de calor, enquanto que seu aumento leva às respostas contrárias [73-75].

Inúmeros estudos têm demonstrado que a modulação experimental do SEC pode induzir modificações na temperatura corporal. Há décadas, o efeito hipotérmico induzido pela estimulação do SEC está estabelecido na literatura; porém, recentemente há evidências de um efeito dual sobre a regulação da T_i , que é dependente da via de administração e dose utilizada. Em geral, aceita-se que a

estimulação periférica do SEC induza hipotermia, enquanto que, centralmente, doses baixas promovam aumento, enquanto que doses maiores levam à redução da Ti.

Os trabalhos iniciais avaliando o papel de canabinoides sobre a Ti datam da década de 60. Em um consenso geral, estudos demonstram que administração de Δ^9 -THC, central ou periféricamente, leva à redução da Ti em roedores [76-91].

Com a elucidação dos constituintes endógenos que fazem parte do SEC e com a criação de drogas sintéticas capazes de modular o sistema, os estudos continuaram demonstrando que, periféricamente (vias intraperitoneal, intramuscular ou endovenosa), administração de agonistas canabinoides induz redução da Ti e que tal efeito é mediado exclusivamente via ativação do receptor CB₁, mas não via receptor CB₂ [89, 91-98]. Além disso, a ativação do SEC por demanda ficou mais evidente, uma vez que administração de antagonistas para os receptores canabinoides, por si só, não produzem respostas em condições basais [90, 91, 96-104].

Em 2009, o efeito dual do SEC foi sugerido. Fraga e colaboradores (2009) apresentaram, pela primeira vez, o efeito febrinogênico após estimulação do SEC central. Injeções de baixas doses de AEA (0,01 – 10 µg via intracerebroventricular – i.c.v. – ou 0,1 – 100 ng intra-hipotálamo) induziram aumento gradual da temperatura retal, efeito este precedido da diminuição do índice de dissipação de calor. Além disso, o aumento da Ti induzida pela AEA era revertida apenas pelo bloqueio do receptor CB₁, e não por antagonista do receptor CB₂ [105]. Mais recentemente, o mesmo grupo confirmou novamente a resposta febrinogênica induzida pela AEA central [106].

Todos os trabalhos relacionando o efeito da modulação do SEC sobre a Ti foram realizados em condições de repouso, e não há estudos investigando o efeito da modulação do SEC sobre as respostas termorregulatórias durante o exercício físico. Ademais, não é conhecido se o efeito térmico induzido pela ativação do SEC poderia ser uma resposta indireta e dependente das mudanças comportamentais sobre a atividade locomotora que são capazes de induzir respostas termorregulatórias.

Sabe-se que a atividade locomotora e o exercício físico promovem aumento da Ti proporcionalmente à sua intensidade e duração, uma vez que a contração muscular necessária para realizar os movimentos converte apenas cerca de 20-25% da energia química presentes nas moléculas de ATP em trabalho mecânico, enquanto os 75-80% restantes são convertidos em calor; portanto, durante o exercício físico, o metabolismo corporal aumentado leva a uma maior produção de calor que precisa ser dissipado [107-109].

Em termos de resposta termorregulatória durante o exercício, o aumento das temperaturas interna e/ou da pele são detectadas por termorreceptores centrais e periféricos que enviam *inputs* aferentes sensoriais para o hipotálamo, onde o sinal é integrado; em seguida, respostas efetoras termorregulatórias para dissipar o calor são iniciadas, tais como sudorese e aumento do fluxo sanguíneo para a pele [110, 111].

Modelo experimental de exercício aeróbico em esteira rolante utilizando ratos conduzidos em ambiente temperado tem permitido o estudo dessas respostas termorregulatórias. Como ilustrado na Figura 5, nos minutos iniciais de exercício de intensidade submáxima, a produção de calor (variável primária) é maior que a dissipação de calor (variável secundária), resultando em um pronunciado aumento da T_i (fase dinâmica do balanço térmico), em virtude do aumento da taxa metabólica pelos músculos em atividade (aumento na produção de calor), seguida pela ativação simpática que gera vasoconstrição na pele da cauda (dificuldade na dissipação de calor), evidenciado pela diminuição da sua temperatura. A T_i , dessa forma, aumenta até que o limiar térmico para vasodilatação da cauda seja atingido, quando ocorre perda de calor por convecção. Neste momento, a taxa de dissipação de calor se aproxima da taxa de aquecimento corporal, limitando o aumento abrupto da T_i (fase estável do balanço térmico), que permanece em um novo ajuste mais elevado até o momento da fadiga [112-116].

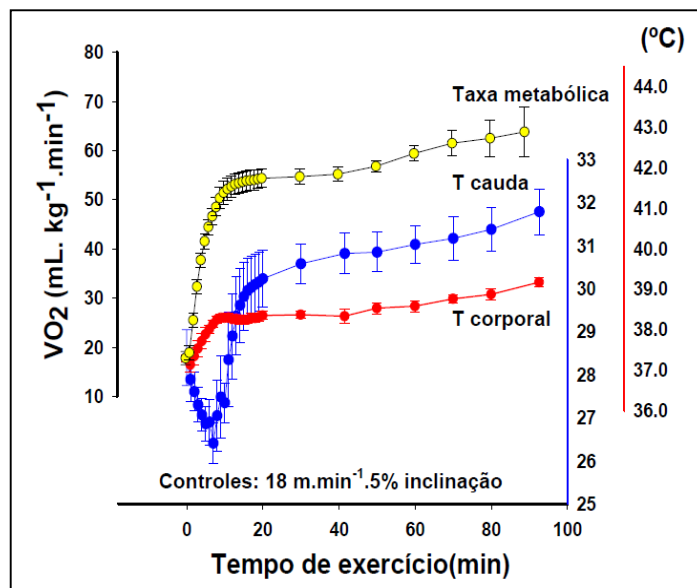


Figura 5. Respostas termorregulatórias em ratos submetidos ao exercício de corrida submáximo (18 m.min⁻¹, 5% de inclinação) até a fadiga, em ambiente temperado (21-24°C) (Adaptado de [113]).

Considerando que os níveis de endocanabinoides são aumentados durante a prática de atividade física e que a ativação dos SEC induz respostas térmicas, é plausível sugerir que o SEC possa interferir nas respostas termorregulatórias induzidas durante o exercício físico. Ademais, uma vez que o aumento da T_i é considerado um dos fatores limitantes do desempenho físico por diminuir a motivação para a continuidade do exercício e assim, aumentar a percepção de fadiga [117-121], é possível que a modulação do SEC possa também, interferir no desempenho físico.

3 – OBJETIVOS

Levando em consideração que:

- O SEC é ativado por demandas, entre as quais podemos citar a atividade física;
- O SEC parece estar relacionado com as recompensas neurobiológicas induzidas pelo exercício físico e com o comportamento operante para atividade locomotora espontânea;
- A modulação do SEC induz mudanças nas respostas termorregulatórias que, por sua vez, é essencial para a manutenção da homeostase corporal tanto em condições basais quanto durante o exercício físico;
- Os ajustes termorregulatórios e o sistema de recompensa são fatores relevantes durante a execução do exercício físico como determinantes nos mecanismos de fadiga.

O objetivo geral do presente estudo foi investigar a participação da AEA central sobre as respostas termorregulatórias em duas situações distintas de atividades físicas (atividade espontânea e atividade forçada) e verificar se os efeitos térmicos mediados pelo SEC nestas situações se relacionam com a atividade locomotora espontânea (ALE) ou desempenho durante o exercício físico forçado.

Para isso, os objetivos específicos incluem:

1. Avaliar o efeito da administração i.c.v. de AEA sobre a ALE e resposta térmica em condições basais, bem como, a possível interação entre essas variáveis durante o ritmo circadiano.
2. Avaliar o efeito da administração i.c.v. de AEA sobre o desempenho físico e ajustes termorregulatórios em animais submetidos ao exercício de corrida em esteira, bem como, sua participação no recrutamento neuronal hipotalâmico induzido pelo exercício.
3. Verificar se o treinamento físico (indutor de hipertermia recorrente) e uso de dieta palatável (ativador de termogênese induzida pela dieta), iniciados no desmame, alteram a expressão central (mais especificamente, no hipotálamo, área pré-óptica, córtex frontal,

hipocampo e cerebelo) de receptores CB₁ e da enzima NAPE-PLD (enzima responsável pela síntese da AEA) na fase adulta.

4 – MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 – CUIDADOS ÉTICOS

Todos os procedimentos obedeceram aos Princípios Éticos da Experimentação Animal e foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA/UFMG – Protocolo nº. 132/2012).

4.2 – ANIMAIS

Para os procedimentos, foram utilizados ratos machos adultos da linhagem Wistar, com peso corporal entre 250 – 350 g. Com exceção, os animais submetidos ao tratamento com dieta palatável e ao protocolo de treinamento físico foram adquiridos após o desmame, com aproximadamente 21 dias, e submetidos aos tratamentos de 8 semanas.

Os animais foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO/UFMG) e mantidos em gaiolas individuais ou coletivas (com no máximo 5 animais por caixa), alojadas em sala com temperatura ambiente (23 ± 1 °C) e fotoperíodo controlados (14 h / 10 h para o protocolo de atividade física espontânea e 12 h / 12 h para o protocolo de atividade física forçada). Todos os animais tiveram livre acesso à ração e água.

4.3 – PROCEDIMENTOS GERAIS

Os animais passaram por um ou mais procedimentos experimentais listados a seguir, de acordo com a finalidade aos quais eram submetidos (ver Tópico 4.4):

4.3.1 – Familiarização ao exercício na esteira

A familiarização dos animais ao exercício de corrida em esteira foi realizada durante 5 dias consecutivos em uma sala de experimentação com temperatura

ambiente controlada (23 ± 1 °C). Os animais foram colocados na esteira, onde permaneceram, inicialmente, 5 min em repouso; após este período realizaram uma curta atividade de 5 min à uma velocidade de $10 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$ e 5% de inclinação; ao término, permaneceram por mais 5 min em repouso.

A proposta deste período de familiarização teve como finalidade condicionar os animais em qual direção realizar a corrida na esteira, bem como, atenuar uma possível resposta hipertérmica decorrente de estresse pela novidade ao ambiente e/ou situação no qual o animal seria submetido.

4.3.2 – Treinamento físico

O treinamento físico constituiu de séries diárias de exercício de corrida em esteira durante 8 semanas. Previamente ao início do treinamento, os animais recém-desmamados passavam pelo processo de familiarização ao exercício em esteira durante 5 dias. A partir de então, o treinamento físico era iniciado, onde a carga de treinamento era aumentada progressivamente, permitindo que o animal comesse, no primeiro dia, a desenvolver um exercício de corrida à uma velocidade de $10 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$ durante 30 min e, na última sessão, concluísse uma sessão de corrida à uma velocidade de $25 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$ durante 60 min (Tabela 1).

Tabela 1. Esquemática do protocolo de treinamento físico

	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5
Adaptação					
Velocidade ($\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$)	10	10	10	10	10
Tempo (min)	5	5	5	5	5
Semana 1					
Velocidade ($\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$)	10	11	12	12	12
Tempo (min)	30	30	30	35	35
Semana 2					
Velocidade ($\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$)	12	12	12	12	12
Tempo (min)	35	40	45	45	50
Semana 3					
Velocidade ($\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$)	12	13	14	14	14
Tempo (min)	50	50	50	55	55
Semana 4					
Velocidade ($\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$)	14	14	15	15	15
Tempo (min)	55	55	55	55	60
Semana 5					
Velocidade ($\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$)	15	15	16	16	16
Tempo (min)	60	60	60	60	60

Semana 6					
Velocidade (m.min ⁻¹)	16	16	17	17	17
Tempo (min)	60	60	60	60	60
Semana 7					
Velocidade (m.min ⁻¹)	17	18	18	19	20
Tempo (min)	60	60	60	60	60
Semana 8					
Velocidade (m.min ⁻¹)	21	22	23	24	25
Tempo (min)	60	60	60	60	60

4.3.3 – Procedimentos cirúrgicos

Dois procedimentos cirúrgicos foram realizados neste estudo: implante de uma cânula-guia no ventrículo cerebral lateral direito (VCLD, por meio do qual era feita a injeção das drogas) e implante de um sensor de temperatura e atividade locomotora na cavidade peritoneal. As cirurgias foram conduzidas sob efeito de anestésico (mistura de cetamina, 80 mg.kg⁻¹, e xilazina, 10 mg.kg⁻¹, i.p., no volume de 0,125 mL para cada 100 g de peso corporal) e doses únicas de antibiótico (pentabiótico, 48.000 UI.Kg⁻¹, i.m.) e analgésico (flunixinina, 1.0 mg.kg⁻¹, s.c.) foram administrados para auxiliar na recuperação dos animais. Os procedimentos experimentais subsequentes foram realizados após os animais apresentarem recuperação do peso pré-operatório.

4.3.3.1 – Implante da cânula-guia no ventrículo cerebral lateral direito

Para o implante da cânula-guia, os animais eram posicionados na mesa cirúrgica em decúbito frontal e foi realizada a tricotomia e assepsia da porção superior da cabeça. Em seguida, foi feita a incisão na pele e no tecido subcutâneo. Foi aplicado um anestésico local (xilocaína com vasoconstritor, solução de cloridrato de lidocaína 2% e de adrenalina 1:200000; no volume de 0,1 mL) para provocar vasoconstrição da área e permitir o afastamento do periósteo. Após a exposição da calota craniana os animais foram fixados em um estereotáxico para animais de pequeno porte (David Kopf Instruments, M-900, Tujunga, CA, USA). As coordenadas do atlas de Paxinos e Watson (2007): 1,5 mm posterior ao bregma (ântero-posterior); 2,5 mm a partir da linha mediana (látero-lateral); 3,2 – 3,6 mm a partir da dura máter foram utilizadas para a introdução da cânula-guia (22 G e 16 mm de comprimento) no VCLD. A craniotomia foi feita com o auxílio de uma broca odontológica e a fixação da cânula-guia foi conseguida usando acrílico polimerizável sob parafusos inseridos próximos à posição da cânula. O posicionamento correto da cânula-guia no VCLD foi verificado pelo

deslocamento de uma coluna de solução salina (NaCl 0,9%) contida em um manômetro de vidro conectado à cânula-guia.

4.3.3.2 – Implante do sensor de temperatura e atividade locomotora na cavidade peritoneal

Para implante do sensor na cavidade peritoneal, os animais foram posicionados em decúbito dorsal e foi feita a tricotomia da região abdominal. Foi realizada uma incisão ventral de aproximadamente 1 cm, seguida de outra incisão sobre a linha alba no músculo abdominal para a inserção do sensor de temperatura (Mini Mitter Company Inc., E-Mitter, série G2, 15,5 mm x 6,5 mm, 1,1 mg, OR, USA) na cavidade peritoneal. O sensor era inserido e suturado junto ao músculo abdominal para evitar o seu deslocamento por dentro da cavidade. Finalizado o implante do sensor, o peritônio e a pele eram suturados.

4.4 – PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

De acordo o objetivo específico a ser investigado, os animais foram submetidos a um destes diferentes protocolos experimentais.

4.4.1 – Avaliação do efeito da administração intracerebroventricular de AEA sobre a atividade locomotora espontânea e resposta térmica em condições basais

Para avaliação do efeito da injeção central de AEA sobre a ALE e Ti em condições de repouso, os animais foram inicialmente submetidos às cirurgias de implante da cânula-guia no VCLD e implante de sensor de temperatura e atividade na cavidade peritoneal.

Após período de recuperação, os animais eram levados à sala de experimentação onde permaneceram, em gaiolas individuais, sob condições de repouso durante todo o período de teste. A sala apresentava temperatura ambiente (23 ± 1 °C) e fotoperíodo (14 h claro - 10 h escuro) controlados – as mesmas encontradas no biotério. Os animais eram colocados sob placas receptoras (ER-4000 Energizer / Receiver, Mini Mitter Co. Inc. Bend, OR, EUA) que, via telemetria, recebiam a frequência emitida pelos sensores e então, repassavam esses sinais a um programa

de aquisição de dados (Vita View Mini Mitter Co.), que convertia os sinais de frequência em valores de ALE e Ti.

Em grupos separados, as soluções a serem testadas foram realizadas em dois momentos distintos do ciclo: um grupo de animais recebeu o tratamento às 10 h (fase clara), onde os animais apresentam os menores valores de ALE e Ti; enquanto outro grupo recebeu o tratamento às 19 h, uma hora antes das luzes serem apagadas (fase escura) e iniciar a fase de maior ALE, e conseqüentemente, maiores valores de Ti dos animais.

Os registros de Ti e ALE foram contínua e simultaneamente registrados a cada minuto durante 1 semana. Os animais foram familiarizados à manipulação de inserção da cânula-injetora na cânula-guia, simulando a administração das soluções, nos primeiros 2 dias de experimento. Entre os 3º e 6º dias, na forma de quadrado-latino, diariamente, os animais recebiam as soluções a serem testadas: veículo (solução contendo etanol, cremophor e salina, na proporção de 1:1:8, respectivamente) ou AEA (nas doses de 0,1, 1,0 e 10,0 µg) no volume final de 2 µL. A injeção foi conduzida durante 1 min, por meio da inserção de uma cânula-injetora confeccionada com uma agulha de 30 G (0,3 mm maior que a cânula-guia) na cânula-guia, que estava acoplada por um tubo PE10 à uma seringa Hamilton com capacidade de 5 µL.

A ração era pesada imediatamente após a realização das injeções e então, os animais permaneciam na sala sem a influência de manipulações ou presença do experimentador.

A Figura 6 esquematiza este protocolo experimental.

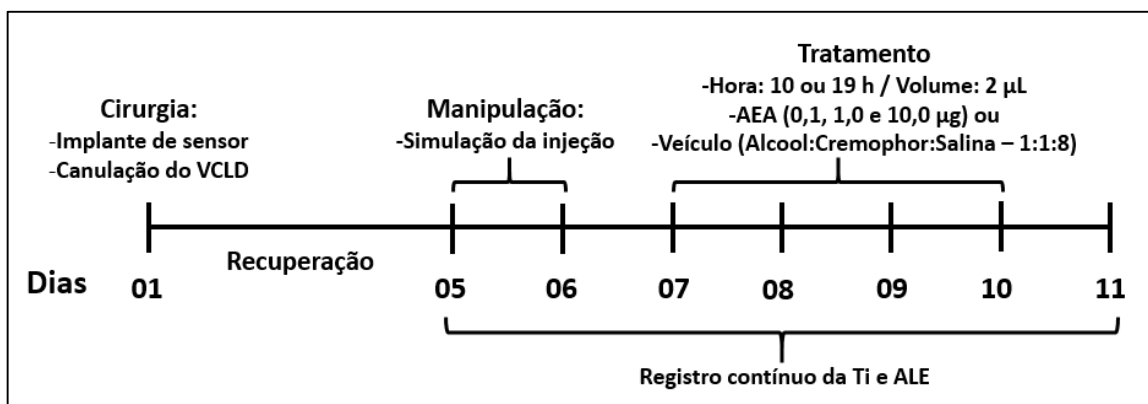


Figura 6. Representação esquemática do protocolo experimental elaborado para avaliação do efeito da administração i.c.v. de AEA sobre a ALE e resposta térmica em condições basais.

4.4.2 – Avaliação do efeito da administração intracerebroventricular de AEA sobre o desempenho físico e sua relação com os ajustes termorregulatórios e recrutamento neuronal hipotalâmico induzido pelo exercício de corrida em esteira

Para investigar se a AEA central participa das respostas termorregulatórias durante o exercício e, conseqüentemente, modularia o desempenho físico, os animais foram inicialmente submetidos ao processo de familiarização ao exercício na esteira e, em seguida, às cirurgias de implante do sensor de Ti e ALE na cavidade intraperitoneal, bem como, de implante da cânula-guia no VCLD.

Após período de recuperação, os animais eram levados à sala de experimentação, pesados e colocados sob as placas receptoras de frequência emitida pelos sensores. Era esperado um período mínimo de 1 h e, após estabilização de valores basais da Ti (entre 36,5 – 37,5 °C) por pelo menos 20 min consecutivos, dava-se início aos tratamentos. Para isso, uma cânula-injetora contendo as soluções a serem testadas era acoplada à cânula-guia e, com o auxílio de uma seringa Hamilton, durante 1 min, 2 µL das soluções eram injetadas no VCLD. Os animais permaneciam em repouso por mais 20 min. Após este período, um sensor para registrar a temperatura da pele da cauda (Tc) era fixado na porção proximal da cauda e os animais eram então colocados na esteira, onde dava-se início ao exercício progressivo de corrida. O exercício iniciava-se a 10 m.min⁻¹ e a cada 3 min, era acrescido 1 m.min⁻¹ até determinação da fadiga, que foi definida como o momento no qual os animais eram incapazes de manter o ritmo de passada na esteira e, conseqüentemente, permaneciam por mais de 10 segundos na grade de estímulo elétrico.

Uma vez que os tratamentos foram conduzidos de forma pareada, cada animal foi submetido a este procedimento por 2 vezes; isto é, de maneira aleatória e duplo-velado, no primeiro dia de procedimento este recebia 2 µL do veículo ou AEA e, no segundo dia de procedimento (que acontecia em um intervalo mínimo de 48 h), o animal recebia o mesmo volume da solução ainda não sorteada na primeira vez.

Em grupos distintos, foram testadas 2 doses de AEA com seus respectivos veículos: 10 µg de AEA e veículo (solução contendo cremophor, etanol, salina, na proporção de 1:1:8, respectivamente) ou 20 µg de AEA ou veículo (solução contendo cremophor, etanol, salina, na proporção de 1:1:3, respectivamente).

Após a determinação da fadiga no segundo dia de procedimento, os animais eram retirados da esteira e colocados em suas caixas e, após 90 min, eram eutanasiados para retirada do cérebro e posterior realização da técnica de imunohistoquímica para quantificação da proteína c-Fos em regiões hipotalâmicas envolvidas no controle termorregulatório.

Todos os experimentos foram realizados no período da manhã, entre 8 e 12 h, com temperatura ambiente controlada (23 ± 1 °C). Os registros de T_i e T_c foram obtidos a cada 5 e 30 segundos, respectivamente.

A Figura 7 ilustra a representação esquemática conduzida neste protocolo experimental.

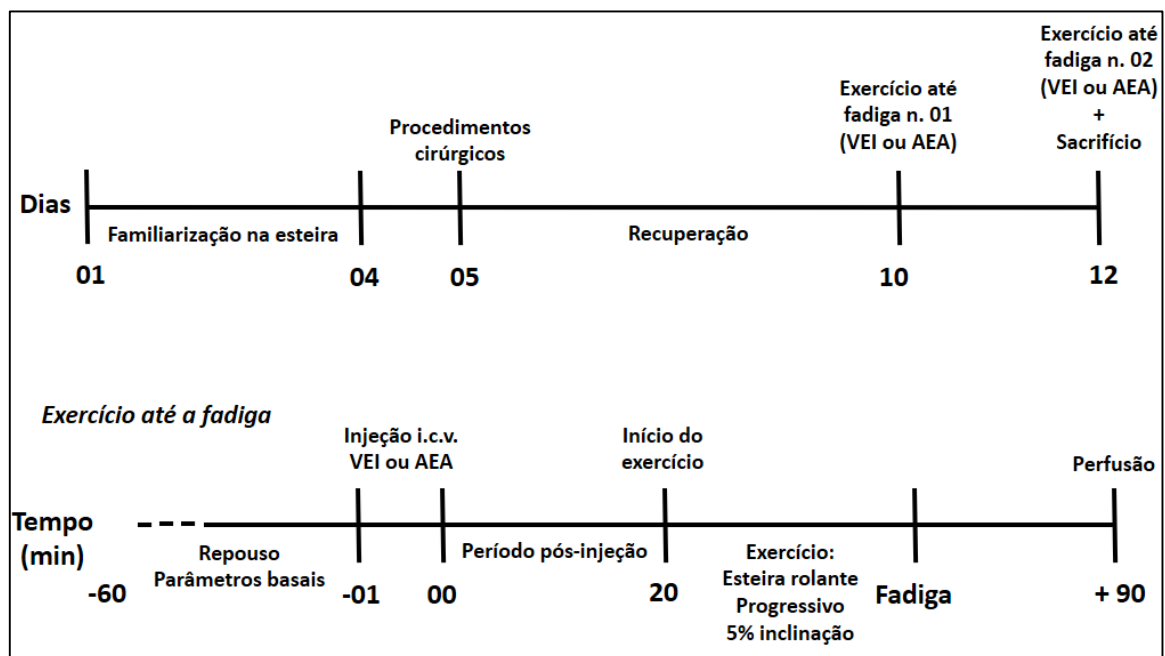


Figura 7. Representação esquemática do protocolo experimental elaborado para avaliação do efeito da administração i.c.v. de AEA sobre o desempenho físico e sua relação com os ajustes termorregulatórios e recrutamento neuronal hipotalâmico induzido pelo exercício de corrida em esteira.

4.4.3 – Efeito do treinamento físico e dieta palatável sobre a expressão cerebral de receptores CB₁ e da enzima NAPE-PLD

Para investigar se o treinamento físico, indutor de hipertermia recorrente, alteraria a expressão de receptores canabinoides e da enzima NAPE-PLD no cérebro durante o período de desenvolvimento, ratos recém-desmamados (aproximadamente 21 dias de vida) foram submetidos ao protocolo de treinamento físico durante 8

semanas. Outro grupo tratado com dieta palatável foi estudado, para a mesma finalidade, durante o mesmo período, considerando que o uso de dietas hipercalóricas também induz elevação recorrente da Ti durante a ingestão de alimento (termogênese induzida pela dieta).

Para isso, logo após o desmame, os animais foram subdivididos, de forma aleatória, em 3 grupos (controle, treinamento e dieta palatável). Inicialmente, todos foram familiarizados ao exercício à esteira durante 5 dias e, no sexto dia, foram submetidos a uma sessão de exercício progressivo até a fadiga para determinação inicial da performance física de cada animal (Teste progressivo 1). Subsequentemente, os animais pertencentes ao grupo treinamento iniciaram o protocolo de treinamento físico durante 8 semanas. Os animais do grupo dieta palatável receberam a dieta pelo mesmo período.

A dieta palatável era composta de 33% de ração controle Nuvilab, 33% de leite condensado Nestlé, 7% de açúcar cristal e 27% de água. A composição nutricional da dieta está apresentada na Tabela 2.

Tabela 2. Composição nutricional das dietas controle e palatável

	DIETA CONTROLE	DIETA PALATÁVEL
Carboidratos (%)	57,5	68
Proteínas (%)	30	16
Lipídeos (%)	12,5%	16
Umidade (%)	12,5	27
Total (kcal/g)	2,9	3,2

Os grupos controle e dieta palatável passavam pelas mesmas manipulações dos animais do grupo treinado (isto é, habitavam caixas coletivas com o mesmo número de animais, eram transportados até a sala de experimentação e tinham contato com a esteira), com a diferença de que, ao invés de realizarem o protocolo de treinamento nos tempos estipulados, apenas realizavam um período curto de caminhada na esteira (5 min à 10 m.min⁻¹). Após 8 semanas, os animais eram novamente submetidos à uma nova sessão de exercício progressivo até a fadiga para confirmação da efetividade do treinamento físico (Teste progressivo 2).

Dois dias após a última sessão de exercício (Teste progressivo 2), os animais eram pesados e sacrificados por decapitação. Os tecidos colhidos foram

imediatamente colocados em eppendorfs, submersos em nitrogênio líquido e estocados à -80 °C até a realização dos ensaios biológicos. Foram colhidos e pesados os coxins adiposos (mesentérico, retroperitoneal, inguinal e epididimal) para determinação do índice de adiposidade. O cérebro foi retirado e dissecado para obtenção de parte do córtex frontal, hipocampo, hipotálamo, área pré-óptica e cerebelo para quantificação da expressão do receptor CB₁ e enzima NAPE-PLD pela técnica de Western Blotting. O sangue também foi colhido e centrifugado para obtenção do plasma para dosagens dos níveis séricos de insulina, leptina e glicose. O monitoramento do ganho de peso dos animais foi realizado semanalmente.

4.5 – ENSAIOS BIOLÓGICOS

4.5.1 – Ensaio imunohistoquímico para quantificação da proteína c-Fos

Após a indução da anestesia, a eutanásia dos animais submetidos ao protocolo experimental descrito no Tópico 4.4.2 foi conduzida via perfusão transcardíaca. Com o auxílio de uma bomba de perfusão, foram perfundidos 40 mL de PBS 0,01 M (pH 7.4) heparinizado (0,01 mL para cada 100 mL de solução) seguido de 400 mL de solução de paraformaldeído (PFA) 4% em PB 0,2 M (pH 7.4), sob um fluxo de 10 mL/min. Ao término, os cérebros foram cuidadosamente removidos e imergidos em PFA 4% por 2 h antes de serem transferidos para um recipiente contendo solução de sacarose 30%, onde permaneceram por 72 h à 4 °C. Os cérebros foram então congelados em isopentano 99% (C₅H₁₂) entre -40 e -50 °C e armazenados em freezer à -80 °C. Secções coronais seriadas da região hipotalâmica de 40 µm foram cortadas com o auxílio de um criostato e incubadas em solução crioprotetora até a realização do teste imunohistoquímico pelo método *free-floating* para detecção de neurônios imunorreativos a c-Fos.

Previamente, as fatias de cérebros foram lavadas com PBS (0,01 M) em 10 sessões de 5 min, seguido de incubação com glicina (0,1 M) em PBS (0,01 M) por 10 min e nova lavagem em PBS (0,01 M) por 5 min. Seguiu-se com a incubação em H₂O₂ 1% em PBS (0,01 M) por 30 min e posterior lavagem com PBS (0,01 M) por 5 sessões de 5 min. Foi feita incubação com Triton X-100 0,4% em PBS (0,01 M) por 30 min, seguido de 3 sessões de lavagens de 5 min com PBS (0,01 M). As fatias foram então incubadas com albumina de soro bovina (BSA) 2% em PBS (0,01 M) por 1 h e, ao

término, com o anticorpo primário anti-c-Fos produzido em coelho (Ab5, Calbiochem, 1:10.000) diluído em PBS 0,01 M contendo Triton X-100 0,3%, BSA 1% (solução também utilizada para diluição do anticorpo secundário) por 48 h à 4 °C. Esperado esse tempo, foi realizada inicialmente lavagem das fatias com PBS (0,01 M) por 10 sessões de 5 min, seguido de incubação com o anticorpo secundário biotinilado anti-IgG produzido em cavalo (Vectastain ABC kit, Universal, 1:600, Vector Laboratories) por 2 h. As fatias foram lavadas com PBS (0,01 M) por mais 8 sessões de 5 min e incubados com complexo AB (Avidina DH e Peroxidase biotinilado, 1:400, Vectastain ABC kit, Vector Laboratories) diluído em PBS (0,01 M) por 1 h. Mais 8 sessões de 5 min de lavagem com PBS (0,01 M) foram feitas, seguidas de 3 sessões de 5 min de lavagem com tampão acetato 0,175 M. As fatias foram então tratadas com solução contendo 0,2 mg/mL de 3,3-diaminobenzidina (DAB), 25 mg/mL de sulfato de níquel e 0,083 µL/mL de H₂O₂ a 30% em tampão acetato (0,175 M) por 8 min. Por fim, as fatias foram lavadas com tampão acetato (0,175 M) seguido de PBS (0,01 M) por 3 sessões de 5 min cada, e então foram montados em lâminas gelatinizadas, secadas e coladas às lamínulas utilizando Entellan (Merck).

Para a avaliação das estruturas encefálicas envolvidas, foi quantificado o número de neurônios imunorreativos a c-Fos em 120 µm de cada região cerebral avaliada, bilateralmente. As coordenadas escolhidas pelo Atlas Paxinos a partir do bregma foram: núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN): -1,92 mm; núcleo supra-óptico (SON): -1,08 mm; área pré-óptica medial (mPOA): -0,36 mm.

4.5.2 – Western Blotting para análise da expressão do receptor CB₁ e da enzima NAPE-PLD no cérebro

As amostras das regiões cerebrais de interesse (hipotálamo, área pré-óptica, cerebelo, hipocampo e córtex frontal) foram utilizadas para a extração de proteínas. Os tecidos foram homogeneizados em tampão de lise (NaCl 100 mM, Tris-base 50 mM, EDTA.2Na 5mM, Na₄P₂O₇ 50 mM e MgCl₂ 1M) acrescido de Nonidet 1%, Triton X-100 0,3%, deoxicolato de sódio 0,5% e coquetel de inibidores (composto de benzamidina, ortovanadato de sódio, aprotinina, pepstatina A, inibidor completo e PMSF). Todo o processo de extração foi feito com as amostras no gelo. Após o processamento, as amostras foram centrifugadas à 4 °C, durante 12 min sob rotação de 8.000 rpm. O sobrenadante foi removido e congelado à -80 °C para posterior dosagem de proteínas.

A quantidade de proteínas das amostras foi determinada pelo Método de Bradford utilizando BSA. As amostras, contendo 70 µg de proteínas totais foram desnaturadas em tampão de amostra contendo 5% de 2-mercaptoetanol à 95 °C por 5 min e então aplicadas em um gel SDS-poliacrilamida (*sodium dodecyl sulfate-PAGE*) à 10%. Após separadas no gel de poliácridamida por eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF (fluoreto de polivinilideno). A transferência foi confirmada através da coloração da membrana com solução de Ponceau 0,3%. As membranas foram então lavadas em solução de bloqueio (leite à 5% em TBS-T) durante 1 h e mantidas sobre agitação constante. Após a etapa de bloqueio, as membranas foram incubadas, *overnight* à 4 °C, com os anticorpos primários específicos anti-CB₁ (1:200, Abcam AB23703) e anti-NAPE-PLD (1:2000, Novus Biologicals NB110-80070SS). A normalização das amostras foi feita através da correção das bandas pela expressão do GAPDH (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase; 1:1.000, Santa Cruz SC32233). Em seguida as membranas foram lavadas por 30 min com TBS-T e a solução trocada a cada 5 min. Para detecção dos anticorpos primários, as membranas foram incubadas por 1 h com o anticorpo secundário anti-coelho (1:10.000, Sigma Aldrich A0545) – para detecção das proteínas CB₁ e NAPE-PLD – e do anticorpo secundário anti-camundongo (1:10.000, Sigma Aldrich A2554) – para detecção do GAPDH. As membranas foram novamente lavadas por 30 min e preparadas para revelação.

As proteínas foram detectadas por uma reação de quimioluminescência (Kit ECL plus, Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK) e a intensidade das mesmas foi avaliada por análise densitométrica através do software Image-J (versão 1.44p, National Institute Health, USA).

4.5.3 – Quantificação dos níveis plasmáticos de insulina, leptina e glicose

As quantificações dos níveis plasmáticos de insulina e leptina foram obtidas pela técnica de radioimunoensaio por meio dos kits comerciais Milipore Rat Insulin RIA Kit RI-13K e Rat Leptin RIA Kit RL-83K, respectivamente. A dosagem de glicose plasmática foi obtida pela técnica de ensaio enzimático colorimétrico por meio do kit comercial Glicose Katal 43B.

4.6 – ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados estão apresentados como média \pm EPM, e o nível de significância adotado foi de 5%.

Efeito da administração i.c.v. de AEA sobre a atividade locomotora espontânea e a resposta térmica em condições basais: as diferenças entre as Ti e ALE durante as fases clara e escura do ritmo circadiano ou durante a primeira hora após os tratamentos, foram analisados usando a análise de variância (ANOVA) de duas vias com medidas repetidas, seguido do teste *post-hoc* Student-Newman-Keuls. O efeito das diferentes doses sobre a AUC da Ti e ALE durante a primeira após o tratamento e a ingestão alimentar diária foram testadas usando a análise de variância (ANOVA) de uma via com medidas repetidas, seguido dos testes *post-hoc* Duncan's Multiple Range e Student-Newman-Keuls, respectivamente. As diferenças entre as fases clara e escura, bem como suas subdivisões em momentos pré- e pós- injeções, foram testadas usando a análise de variância (ANOVA) de uma via seguido do teste Tukey para Ti e Student-Newman-Keuls para ALE. As correlações foram avaliadas por meio do coeficiente de correlação de Pearson.

Efeito da administração i.c.v. de AEA sobre o desempenho físico, ajustes termorregulatórios e recrutamento neuronal hipotalâmico durante o exercício forçado: as diferenças entre os tratamentos e sua influência também no tempo sobre a Ti e Tc foram avaliadas usando a análise de variância (ANOVA) de duas vias com medidas repetidas seguido do teste *post-hoc* Student-Newman-Keuls. As diferenças entre os tratamentos sobre as variáveis de desempenho físico, variáveis termorregulatórias e expressão de c-Fos foram analisadas por meio do Teste t-Student, pareado ou não-pareado, de acordo com sua aplicabilidade. As correlações foram avaliadas por meio do coeficiente de correlação de Pearson.

Efeito do treinamento físico e dieta palatável sobre a expressão cerebral de receptores CB₁ e NAPE-PLD: as diferenças entre os tratamentos e sua influência no tempo sobre o peso corporal foram avaliadas por meio da análise de variância (ANOVA) de duas vias com medidas repetidas seguido do teste *post-hoc* Student-Newman-Keuls. As análises de desempenho físico, peso dos tecidos, dosagens metabólicas e de expressão do receptor CB₁ e NAPE-PLD para os grupos treinado e dieta foram sempre comparados em relação ao grupo controle por meio do Teste t-Student não-pareado.

5 – RESULTADOS

5.1 – EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO I.C.V. DE AEA SOBRE A ATIVIDADE LOCOMOTORA ESPONTÂNEA E RESPOSTA TÉRMICA EM CONDIÇÕES BASAIS

A Figura 8 apresenta os valores de T_i durante o ritmo circadiano de animais tratados durante 4 dias às 10 h (fase clara) com veículo e 3 doses diferentes de AEA (0,1, 1,0 e 10 μg).

Administração i.c.v. de AEA induziu aumentos da T_i nas três doses testadas, sendo que a maior dose (10 μg) apresentou efeito térmico mais pronunciado.

Quando comparado ao tratamento com veículo, animais tratados com a dose de 0,1 μg de AEA apresentaram valores de T_i maiores entre 16:30 e 17:00 h, enquanto que para aqueles tratados com a dose de 10 μg de AEA estas diferenças foram encontradas mais precocemente (entre 11:00 e 11:30) e permaneceram maiores por um período mais duradouro (entre 14:00 e 18:00 h).

Quando comparado aos valores pré-injeção, o efeito térmico induzido pelo tratamento com 10 μg de AEA iniciou-se às 11:30 e persistiu até as 18:00 h. Na fase escura do ciclo, os valores de T_i já não estavam mais diferentes do controle.

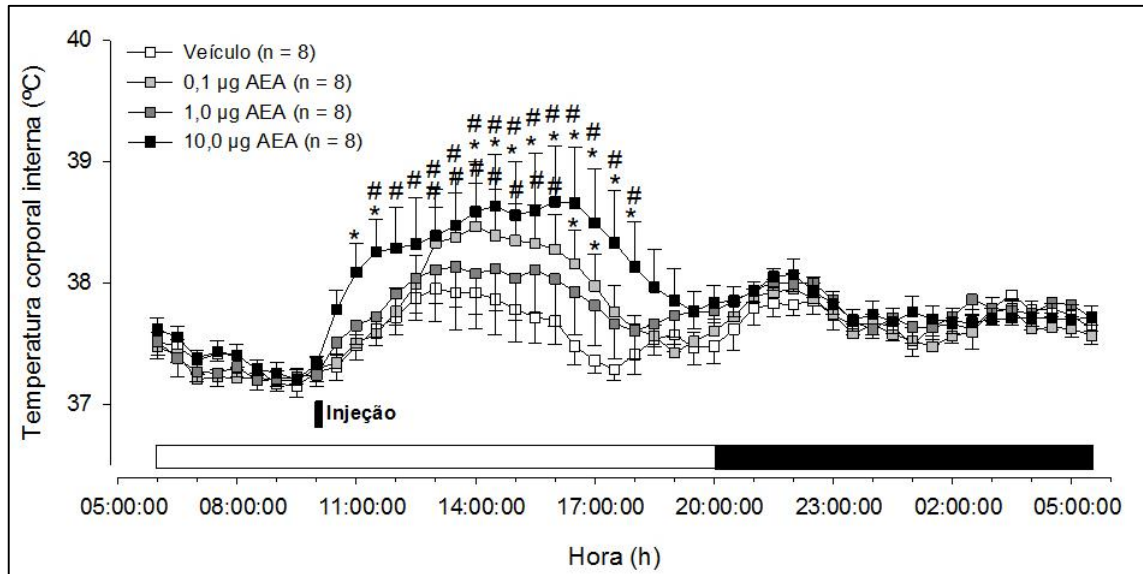


Figura 8. Efeito da administração i.c.v. de AEA, às 10 h, sobre a temperatura corporal interna durante o ritmo circadiano. Os valores plotados referem-se à média da Ti a cada 30 min. As barras inferiores referem-se às fases clara (barra branca) e escura (barra preta) do ritmo circadiano. * $p < 0,05$ comparado com o veículo; # $p < 0,05$ comparado com o valor pré-injeção (10:00 h).

A Figura 9 apresenta os valores médios de Ti obtidos durante o ritmo circadiano. Considerando que os tratamentos ocorreram diariamente em um período da fase clara, todo o ciclo diário foi dividido em 3 partes: (1) fase clara do ciclo antes do tratamento (i.e., 6:00 – 10:00 h), (2) fase clara do ciclo após o tratamento (i.e., 10:00 – 20:00 h) e (3) fase escura do ciclo onde o tratamento não apresenta mais efeito térmico (i.e., 20:00 – 6:00 h).

Como esperado, em todos os dias de tratamento para todas as soluções testadas, as médias gerais da Ti na fase escura do ciclo foram maiores quando comparadas às médias gerais da Ti na fase clara do ciclo no período pré-injeção.

Comparando agora os valores pré- e pós- injeção na fase clara do ciclo, foi verificado que o tratamento com a AEA, em todas as suas doses testadas, induziu aumentos da Ti.

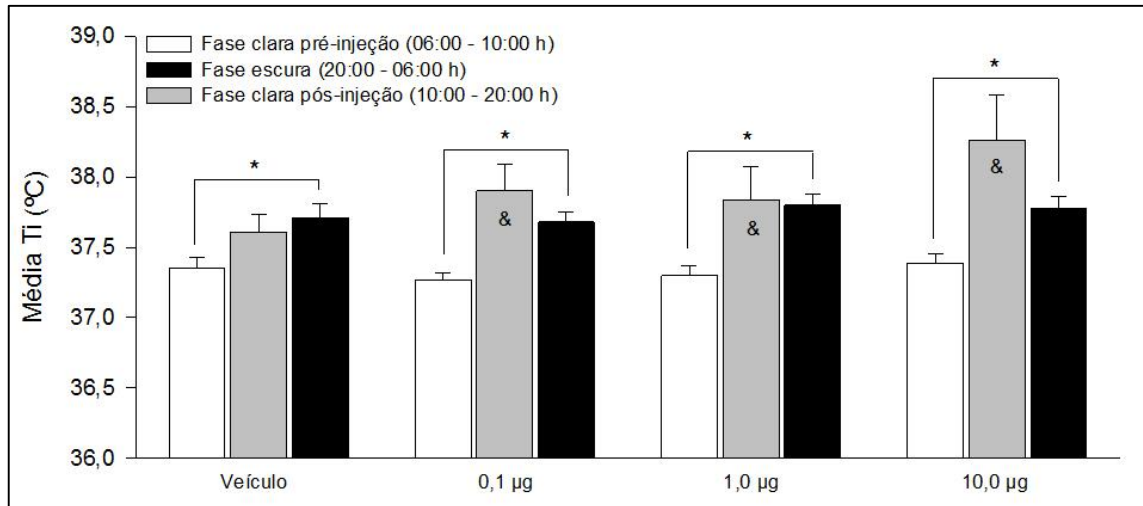


Figura 9. Comparação do efeito da administração i.c.v. de AEA, às 10 h, entre os valores médios de temperatura corporal interna em 3 diferentes fases do ritmo circadiano. Os valores plotados referem-se à média de todos os valores obtidos em cada subdivisão do ciclo. * $p < 0,05$ comparando fase clara pré-injeção e fase escura; & $p < 0,05$ comparando fase clara pré-injeção e fase clara pós-injeção.

A Figura 10 apresenta os valores de ALE durante o ritmo circadiano dos mesmos animais tratados durante os 4 dias às 10 h (fase clara do ciclo) com veículo e as 3 diferentes doses de AEA.

Diferente do efeito observado sobre a T_i , nenhuma das doses de AEA testadas apresentaram alterações na ALE quando comparadas ao tratamento com o veículo.

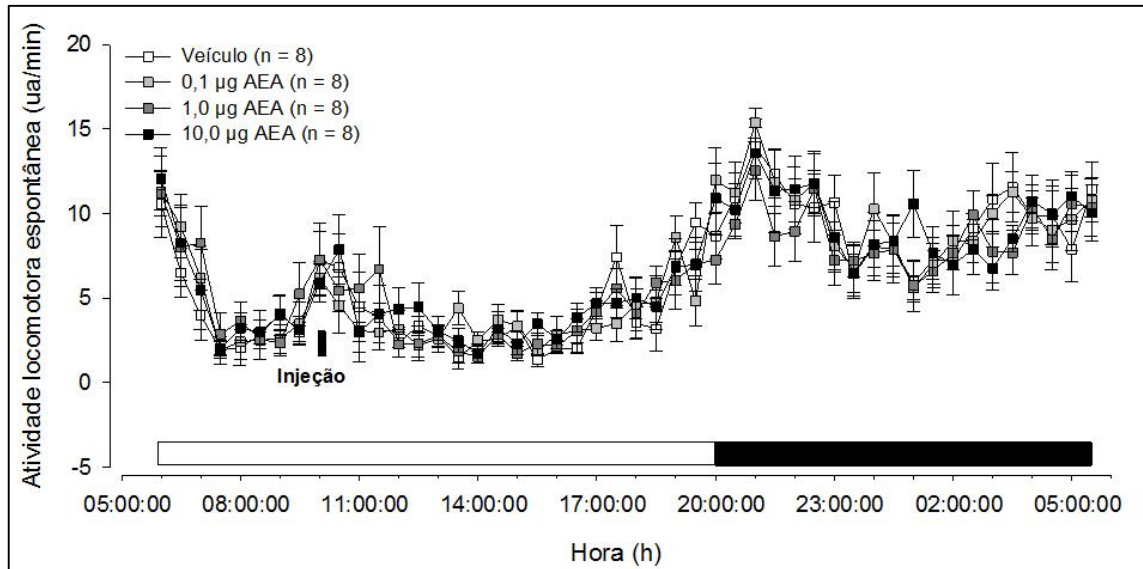


Figura 10. Efeito da administração i.c.v. de AEA, às 10 h, sobre a atividade locomotora espontânea durante o ritmo circadiano. Os valores plotados referem-se à média da ALE a cada 30 min. As barras inferiores referem-se às fases clara (barra branca) e escura (barra preta) do ritmo circadiano.

A exemplo da análise feita para os valores de T_i , a Figura 11 apresenta os valores médios de ALE obtidos em 3 momentos do ritmo circadiano (momentos pré- e pós- injeção da fase clara do ciclo e fase escura do ciclo).

Como esperado, todos os valores médios de ALE na fase escura do ciclo também se apresentaram maiores quando comparados à fase clara do ciclo pré-injeção.

Entretanto, comparando os valores pré- e pós- injeção na fase clara do ciclo, apenas os animais tratados com a dose de 1,0 µg de AEA apresentaram redução na ALE.

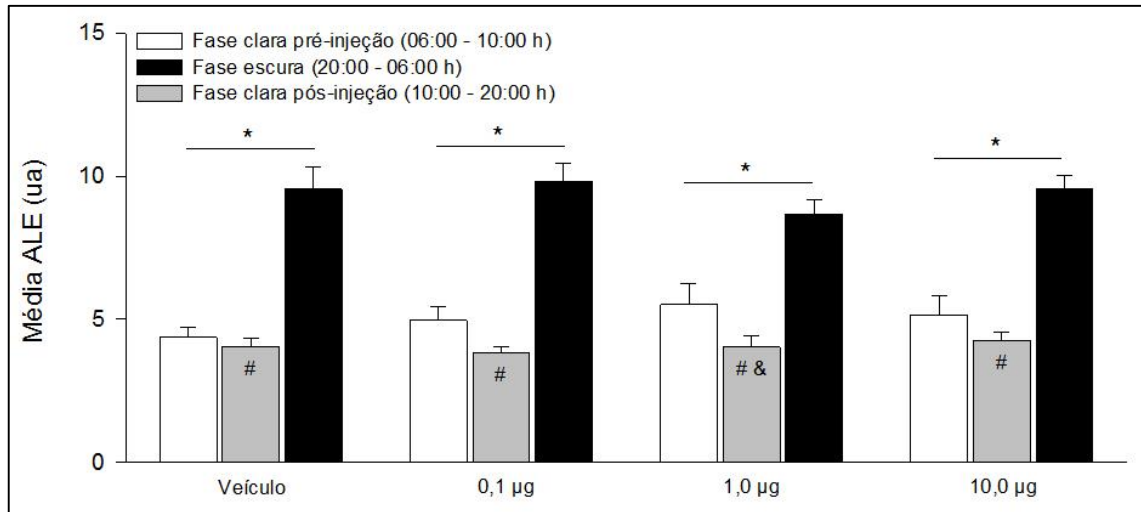


Figura 11. Comparação do efeito da administração i.c.v. de AEA, às 10 h, entre os valores médios de atividade locomotora espontânea em 3 diferentes fases do ritmo circadiano. Os valores plotados referem-se à média de todos os valores obtidos em cada subdivisão do ciclo. * $p < 0,05$ comparando fase clara pré-injeção e fase escura; & $p < 0,05$ comparando fase clara pré-injeção e fase clara pós-injeção; # $p < 0,05$ comparando a fase clara pós-injeção e fase escura.

Como ilustrado na Figura 8, o efeito térmico induzido pela administração de AEA iniciou-se dentro da primeira hora após o tratamento. Considerando que tais valores foram plotados como média a cada 30 min, a Figura 12 apresenta o perfil de variação da T_i , a cada minuto durante esta primeira hora, após a administração i.c.v. de AEA, para analisar com maior precisão o momento onde se inicia o aumento da T_i mediado pela AEA.

Neste período, os grupos veículo e 0,1 µg AEA não apresentaram variações significativas na T_i . Por outro lado, os valores de T_i nos animais tratados com as doses de 1,0 µg e de 10 µg foram maiores que os valores pré-injeção a partir dos minutos 44 e 21, respectivamente, e este aumento persistiu até o final da análise. Ademais, todos os valores de T_i entre os minutos 25 e 60 no grupo tratado com 10 µg de AEA foram diferentes do grupo veículo (Figura 12A).

O índice térmico, variável obtida através do cálculo da AUC durante os 60 min iniciais após o tratamento, demonstrou que a dose de 10 µg de AEA foi àquela que apresentou efeito mais potente. Ademais, encontramos uma relação dose-dependente direta do tratamento com AEA em seu efeito térmico ($r = 0,953$; $p < 0,05$; Figura 12B).

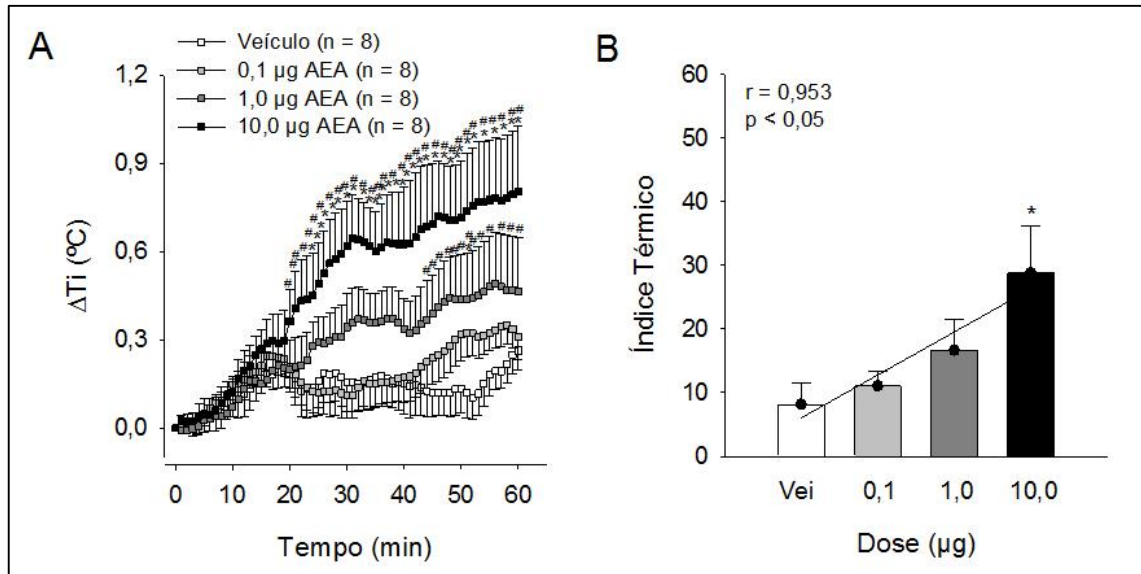


Figura 12. Efeito da administração i.c.v. de AEA, às 10 h, sobre a temperatura corporal interna nos primeiros 60 min após o tratamento. A, Variação da temperatura corporal interna a cada minuto. B, Índice térmico. * $p < 0,05$ comparado com o veículo; # $p < 0,05$ comparado com o tempo 0.

A exemplo da análise feita para os valores de T_i , a Figura 13 apresenta o perfil de resposta induzido pela AEA central sobre a ALE nos primeiros 60 min após os tratamentos.

Diferentemente da resposta térmica, não foram observadas variações na ALE durante este período (Figura 13A e 13B).

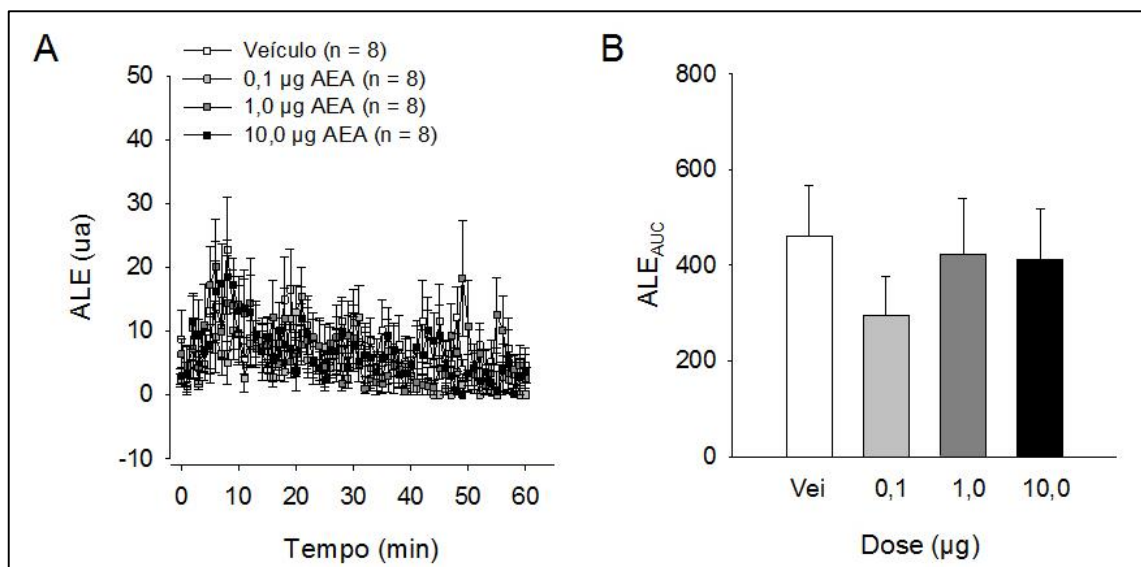


Figura 13. Efeito da administração i.c.v. de AEA, às 10 h, sobre a atividade locomotora espontânea nos primeiros 60 min após o tratamento. A, Atividade locomotora espontânea a cada minuto. B, Área sobre a curva da ALE.

A Figura 14 apresenta as correlações entre ALE e Ti avaliadas durante o ritmo circadiano. Esta análise tem por objetivo confirmar a reprodutibilidade do protocolo experimental utilizado, mostrando a interdependência entre estas variáveis. Para tal, os dados plotados referem-se aos valores médios de Ti e ALE em cada hora do dia para cada grupo, considerando apenas os momentos onde não foi mais verificada a influência do tratamento sobre as variáveis, isto é, fase clara pré-injeção e fase escura do ciclo.

Como esperado, foi observado uma forte correlação positiva entre a Ti e ALE ($r = 0,834$; $p < 0,001$). Este perfil de correlação foi encontrado para todos os dias de teste.

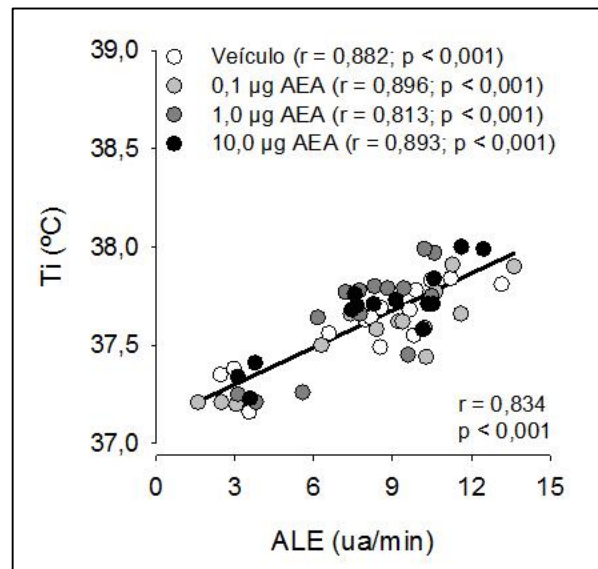


Figura 14. Correlações entre Ti e ALE durante as várias fases do ritmo circadiano, excluindo o período do efeito térmico induzido pelo tratamento às 10 h. Os dados referem-se à média de cada hora do dia, considerando os momentos pré-injeção da fase clara e fase escura.

A Figura 15 apresenta as correlações entre Ti e ALE comparando os tratamentos entre o veículo e a dose de 10 µg de AEA em dois momentos do ciclo circadiano: (A) período do ciclo em que não se verifica efeito térmico dos tratamentos (isto é, fase clara pré-injeção e fase escura) e (B) período do ciclo onde verifica-se efeito sobre a Ti induzido pela injeção de AEA (isto é, entre 11:00 e 20:00 h).

A exemplo da representação da Figura 14, considerando os momentos do dia sem a influência do tratamento sobre as variáveis analisadas, correlações positivas

foram encontradas para ambos os grupos (Veículo: $r = 0,882$, $p < 0,001$; 10 μg AEA: $r = 0,893$, $p < 0,001$; Figura 15A). Por outro lado, quando se analisa a fase clara do ciclo onde tem-se influência do tratamento com 10 μg de AEA (fase clara pós-injeção), uma forte correlação negativa foi encontrada apenas para o grupo tratado com AEA (10 μg AEA: $r = -0,852$, $p < 0,01$; Figura 15B).

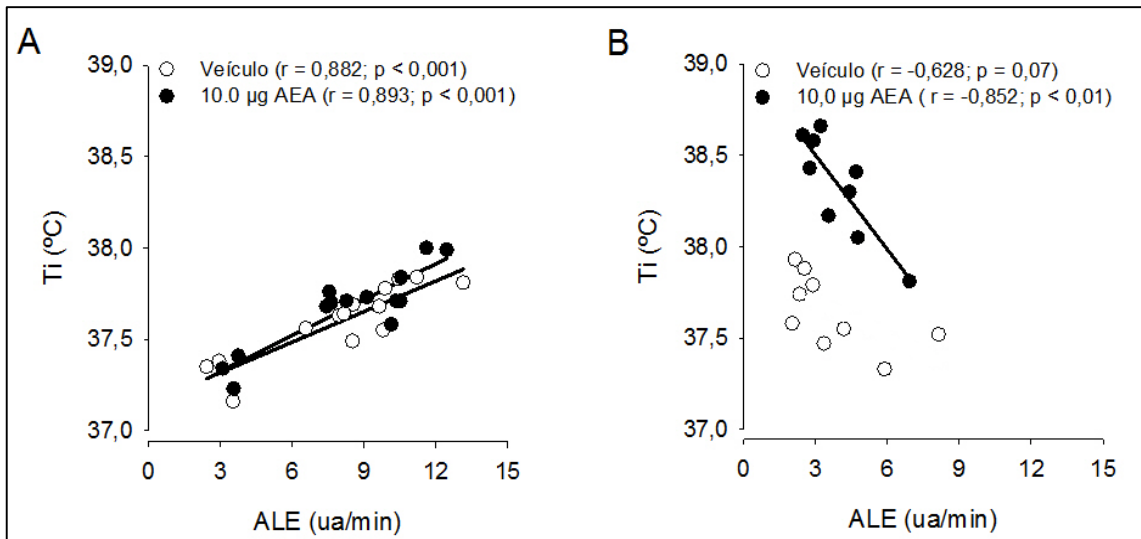


Figura 15. Comparações entre os efeitos mediados pelos tratamentos com veículo e 10 μg de AEA, às 10 h, sobre as correlações entre Ti e ALE. A, Períodos do ciclo sem efeito térmico (fase clara pré-injeção e fase escura). B, Períodos do ciclo sob influência do tratamento (fase clara pós-injeção).

A Figura 16 ilustra a ingestão alimentar diária dos animais nos dias em que foram tratados com veículo e AEA. Não foram verificadas diferenças significativas nesta variável para nenhum dos tratamentos testados.

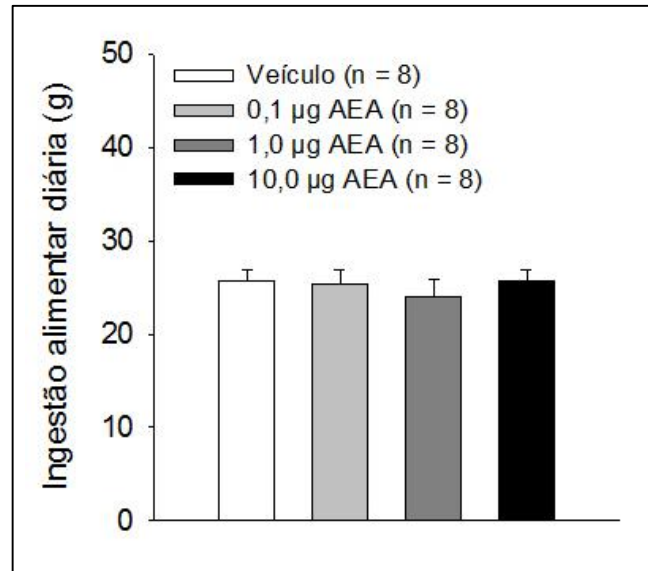


Figura 16. Efeito da administração i.c.v. de AEA, às 10 h, sobre a ingestão alimentar diária.

Considerando que um efeito clássico da estimulação do SEC seria induzir a hipolocomoção em testes comportamentais, é plausível sugerir que tal efeito pudesse estar mascarado, uma vez que, na fase clara do ritmo circadiano, os animais estão em sua fase de menor atividade. Sendo assim, em um novo grupo de animais, foram testadas as mesmas doses de AEA, seguindo o mesmo protocolo experimental, porém com a diferença de que o tratamento foi realizado às 19 h, isto é, 1 h antes de iniciar a fase escura do ritmo circadiano.

A Figura 17 apresenta os valores de Ti durante o ritmo circadiano de animais tratados às 19 h (período final da fase clara do ciclo) com veículo e as mesmas 3 doses diferentes de AEA.

A exemplo de quando o tratamento ocorreu às 10 h, os animais quando eram tratados com AEA às 19 h também apresentaram valores maiores de Ti quando comparado ao dia em que receberam veículo. Neste caso, pode-se dizer que o tratamento com AEA potencializou o aumento da Ti comumente observada e esperada na fase escura do ciclo; mas vale ressaltar que o efeito foi menos duradouro. Os valores de Ti encontrados nos animais tratados com 1,0 µg de AEA foram maiores que o veículo entre 22:00 e 00:30 h e, novamente, a maior dose testada (10 µg) foi aquela que demonstrou efeito mais pronunciado e duradouro, sendo diferente dos animais tratados com veículo entre 21:00 e 00:30 h.

Comparação entre os valores pré-injeção não foram avaliados uma vez que é esperado o aumento da Ti na fase escura do ciclo, independentemente de qualquer tipo de tratamento.

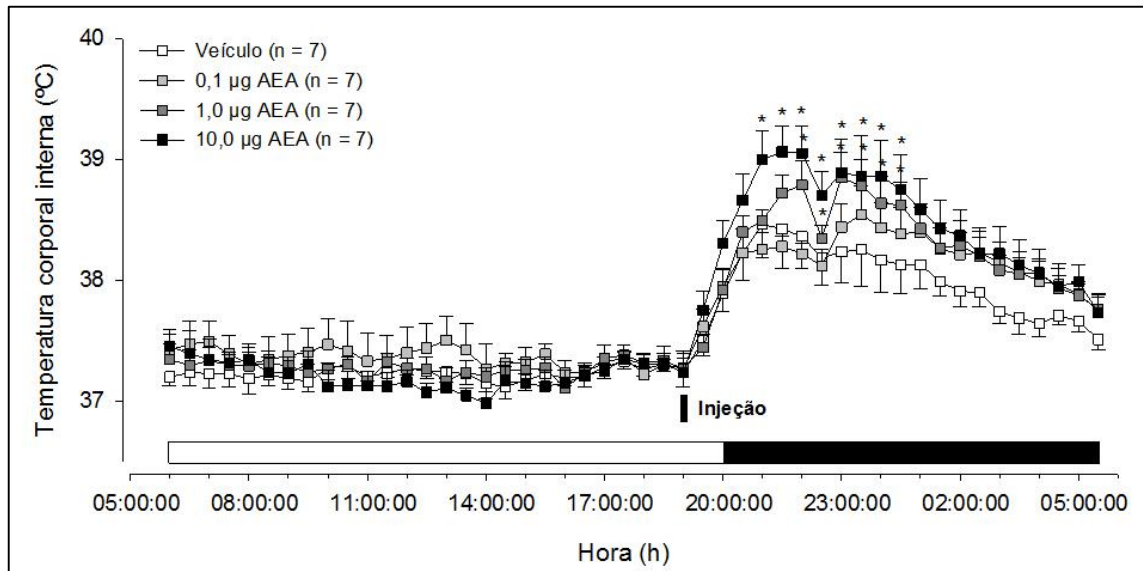


Figura 17. Efeito da administração i.c.v. de AEA, às 19 h, sobre a temperatura corporal interna durante o ritmo circadiano. Os valores plotados referem-se à média da Ti a cada 30 min. As barras inferiores referem-se às fases clara (barra branca) e escura (barra preta) do ritmo circadiano. * p < 0,05 comparado com o veículo.

A Figura 18 apresenta os valores médios de Ti obtidos durante o ritmo circadiano, cujos tratamentos ocorreram às 19 h. Para se assemelhar às análises realizadas quando os tratamentos ocorreram às 10 h, todo o ciclo diário foi novamente dividido em 3 partes: (1) fase clara pré-injeção (i.e., 6:00 – 19:00 h); (2) fase escura durante efeito térmico da AEA (i.e., 20:00 – 00:30 h) e (3) fase escura sem efeito térmico da AEA (1:00 – 6:00 h).

Como esperado, a fase escura do ciclo apresentou sempre maiores valores de Ti quando comparado à fase clara do ciclo em todos os dias com seus respectivos tratamentos. Ademais, corroborando com o protocolo anterior, onde o tratamento ocorreu às 10 h, a maior dose de AEA testada (10 µg) apresentou efeito térmico mais potente, diferindo do tratamento com o veículo.

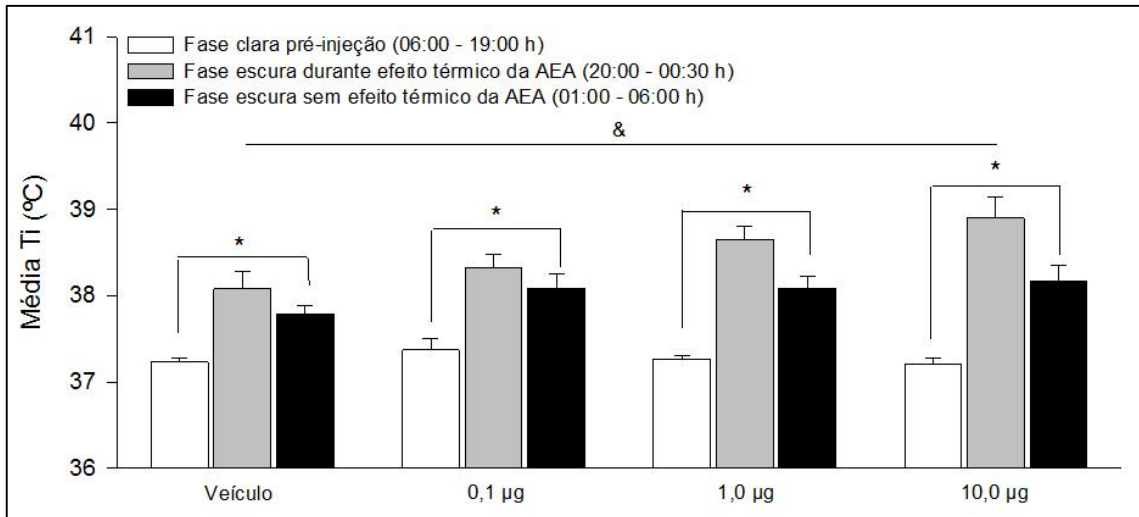


Figura 18. Efeito da administração i.c.v. de AEA, às 19 h, sobre os valores médios de temperatura corporal interna em 3 diferentes fases do ritmo circadiano. Os valores plotados referem-se à média de todos os valores obtidos entre os momentos da fase clara pré-injeção e da fase escura, sendo subdividida entre os momentos com e sem efeito térmico da AEA. * $p < 0,05$ comparando as fases clara e escura; & $p < 0,05$ comparando os tratamentos entre AEA e veículo.

A Figura 19 apresenta os valores de ALE durante o ritmo circadiano de animais tratados às 19 h (fase clara do ciclo) com veículo e 3 diferentes doses de AEA.

Mais uma vez, as doses de AEA testadas não induziram quaisquer alterações significativas sobre a ALE (Figura 19).

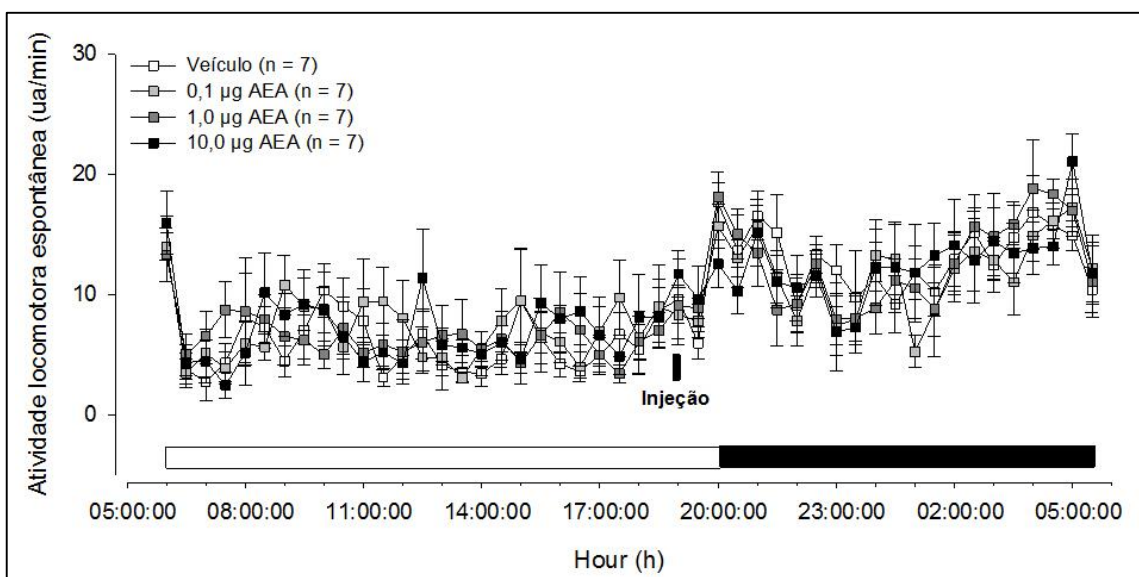


Figura 19. Efeito da administração i.c.v. de AEA, às 19 h, sobre a atividade locomotora espontânea durante o ritmo circadiano. Os valores plotados referem-se à média da ALE a cada 30 min. As barras inferiores referem-se às fases clara (barra branca) e escura (barra preta) do ritmo circadiano.

A Figura 20 apresenta os valores médios de ALE obtidos nos mesmos 3 momentos de análises feitos anteriormente para os valores de Ti.

Como esperado, a ALE na fase escura do ciclo neste experimento também foi maior quando comparada à fase clara do ciclo pré-injeção para todos os tratamentos. Nenhuma diferença foi encontrada entre os tratamentos.

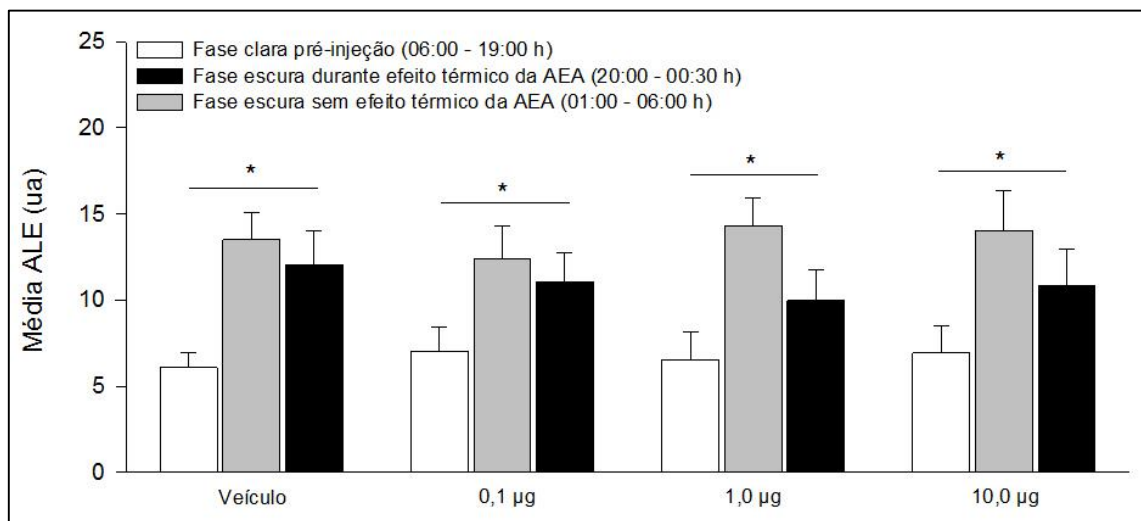


Figura 20. Efeito da administração i.c.v. de AEA, às 19 h, sobre os valores médios de atividade locomotora espontânea em 3 diferentes fases do ritmo circadiano. Os valores plotados referem-se à média de todos os valores obtidos entre os momentos pré e pós- injeção.

A Figura 21 apresenta o efeito térmico induzido pelos tratamentos com veículo e AEA, a cada minuto, nos primeiros 60 min após o tratamento às 19 h.

Durante este período, a exemplo do que foi verificado quando os tratamentos ocorreram às 10 h, os animais tratados com veículo não apresentaram variações significativas na Ti, enquanto que a dose de 10 µg novamente apresentou elevação da Ti mais consistente, dissociando-se das demais. Comparado aos valores de Ti pré-injeção e ao grupo veículo, a dose de 10 µg foi diferente a partir dos minutos 29 e 28, respectivamente, e persistiram até a fase final da análise (Figura 21A).

A comparação do índice térmico durante este período demonstrou que a dose de 10 µg de AEA foi a única capaz de apresentar efeito sobre a Ti, apresentando-se diferente tanto do veículo, quanto das demais doses de AEA testadas (Figura 21B).

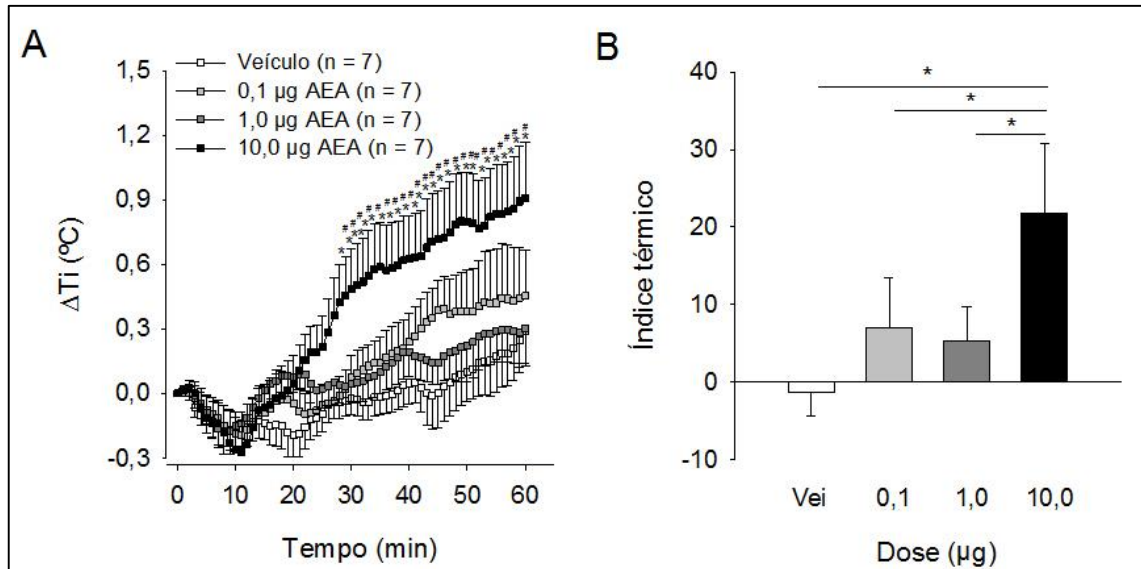


Figura 21. Efeito da administração i.c.v. de AEA, às 19 h, sobre a temperatura corporal interna nos primeiros 60 min após o tratamento. A, Variação da temperatura corporal interna a cada minuto. B, Índice térmico. * $p < 0,05$ comparado com o veículo; # $p < 0,05$ comparado com o tempo 0.

A Figura 22 apresenta o perfil de resposta induzido pela AEA central sobre a ALE nos primeiros 60 min após os tratamentos. Diferente da resposta térmica e, a exemplo da resposta investigada quando o tratamento ocorreu às 10 h, não houveram variações significativas da ALE durante este período (Figura 22A e 22B).

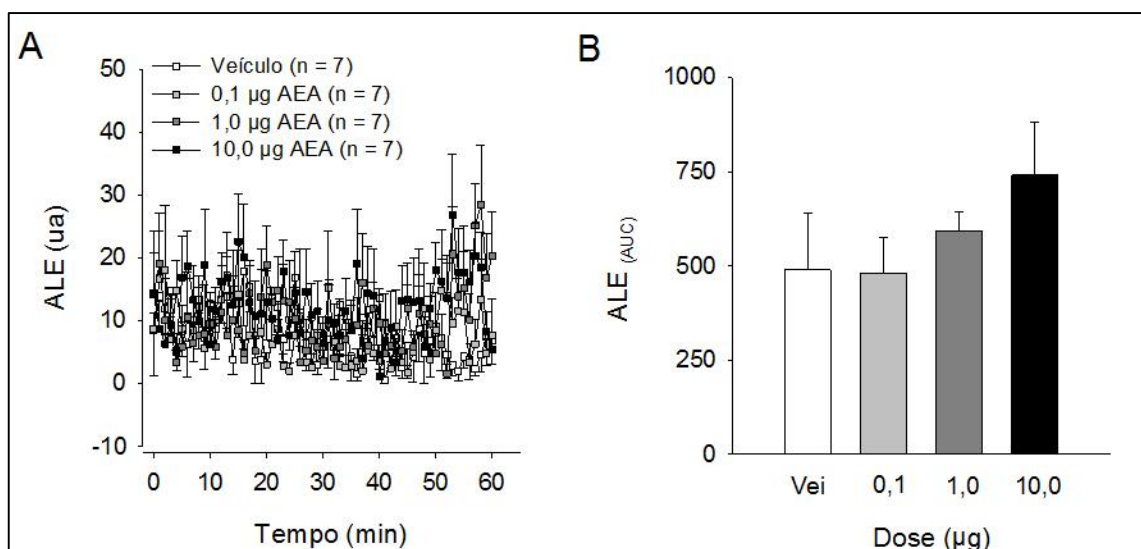


Figura 22. Efeito da administração i.c.v. de AEA, às 19 h, sobre a atividade locomotora espontânea nos primeiros 60 min após o tratamento. A, Atividade locomotora espontânea a cada minuto. B, Área sobre a curva da ALE.

A Figura 23 apresenta novamente a relação direta existente entre a T_i e ALE. Os valores plotados referem-se a média obtida para cada variável, a cada hora do ritmo circadiano, nos diferentes tratamentos, considerando apenas os momentos do dia em que não havia efeito térmico da AEA, isto é, de 6:00 às 19:00 h e 1:00 às 5:00 h.

Observou-se novamente forte correlação positiva entre a T_i e ALE ($r = 0,748$; $p < 0,001$). Este perfil de correlação foi encontrado para todos os dias de teste.

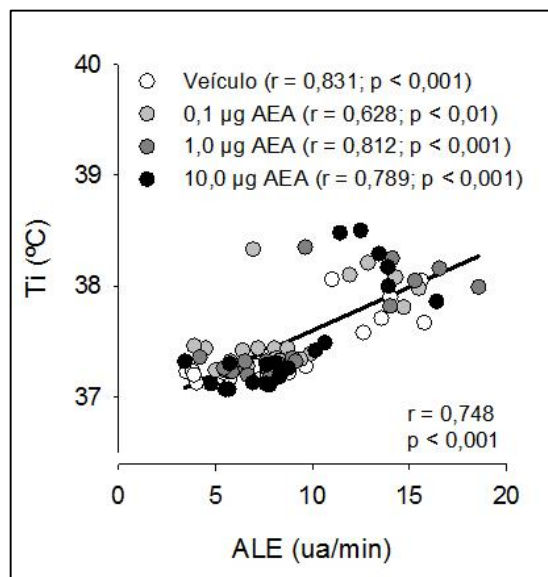


Figura 23. Correlações entre T_i e ALE durante as fases do ritmo circadiano sem efeito térmico induzido pelo tratamento às 19 h. Os dados referem-se à média de cada hora do dia, considerando apenas os momentos em que não se verificou efeito térmico da AEA.

A Figura 24 apresenta as correlações entre T_i e ALE comparando os tratamentos entre o veículo e a dose de 10 μg de AEA em dois momentos do ciclo circadiano: (A) período do ciclo em que não se verifica efeito térmico dos tratamentos e (B) fase escura do ciclo, que corresponde ao período de ação da AEA.

A exemplo da representação da Figura 23, considerando os momentos do dia sem a influência do tratamento sobre as variáveis analisadas, correlações positivas foram encontradas para ambos os grupos (Veículo: $r = 0,831$, $p < 0,001$; 10 μg AEA: $r = 0,789$, $p < 0,001$; Figura 24A). Por outro lado, quando se analisa a fase escura do ciclo, quando tem-se influência do tratamento com 10 μg de AEA, novamente uma correlação inversa foi encontrada apenas para o grupo tratado com AEA (10 μg AEA: $r = -0,700$, $p < 0,05$; Figura 23B).

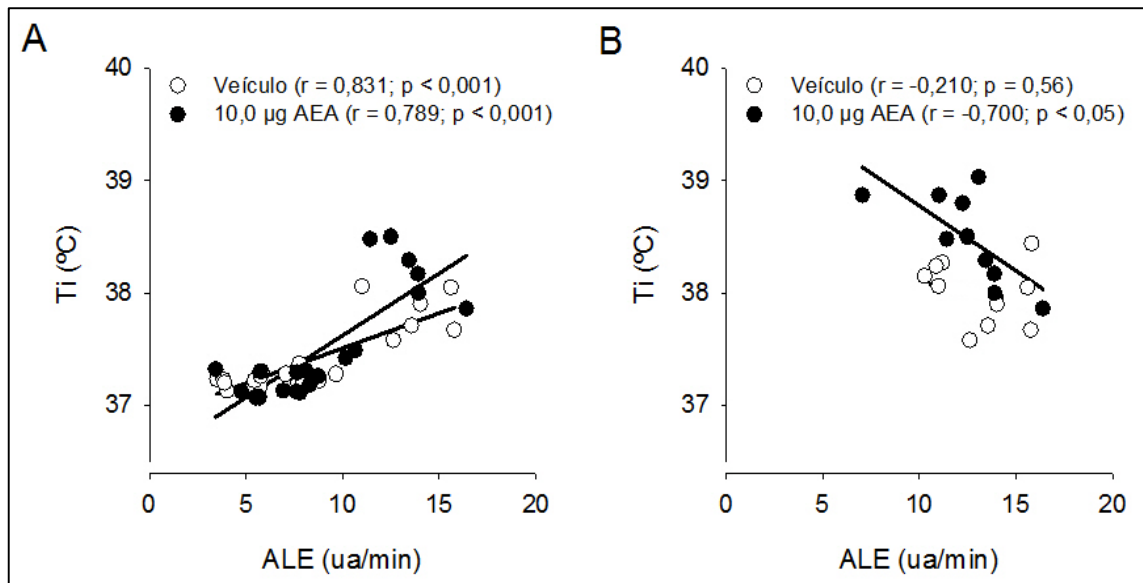


Figura 24. Comparações entre os efeitos mediados pelos tratamentos com veículo e 10 µg de AEA, às 19 h, sobre as correlações entre Ti e ALE. A, Veículo. B, AEA.

A Figura 25 apresenta o efeito do veículo e AEA sobre a ingestão alimentar diária dos animais tratados às 19 h. Apesar de apresentarem maior ingestão alimentar na fase escura do ciclo e o tratamento ter acontecido próximo a este período, as doses de AEA testadas, novamente, não alteraram o comportamento alimentar.

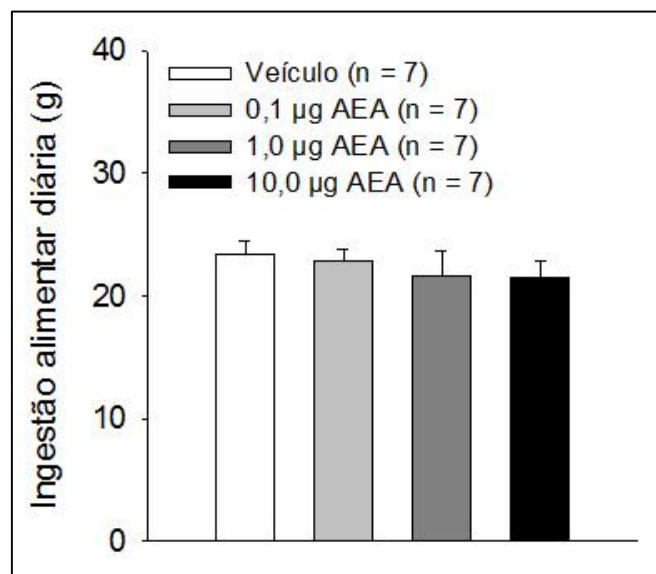


Figura 25. Efeito da administração i.c.v. de AEA, às 19 h, sobre a ingestão alimentar diária.

5.2 – EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO I.C.V. DE AEA SOBRE O DESEMPENHO FÍSICO, AJUSTES TERMORREGULATÓRIOS E RECRUTAMENTO NEURONAL HIPOTÁLAMICO DURANTE O EXERCÍCIO FORÇADO

A Figura 26 apresenta os efeitos das administrações i.c.v. de veículo e 10 µg de AEA sobre as respostas termorregulatórias durante o exercício progressivo de corrida em esteira.

Como esperado, o exercício físico induziu aumento progressivo da T_i (Figura 26A). A T_c também apresentou resposta característica neste modelo utilizado, onde tem-se uma redução inicial da temperatura, que condiz com a resposta termorregulatória clássica de vasoconstrição da pele da cauda em resposta à ativação simpática mediada pelo exercício, seguida de elevação persistente, que se inicia quando a T_i atinge um limiar térmico para vasodilatação, dando início a ativação dos mecanismos de dissipação de calor (Figura 26B).

Apesar de ter sido encontrada influência da dose de 10 µg de AEA sobre a T_i nos animais em repouso, tanto em situações basais (fase clara do ciclo circadiano) quanto em situações de maior atividade (fase escura do ciclo circadiano), esta mesma dose não promoveu efeito térmico durante o exercício forçado.

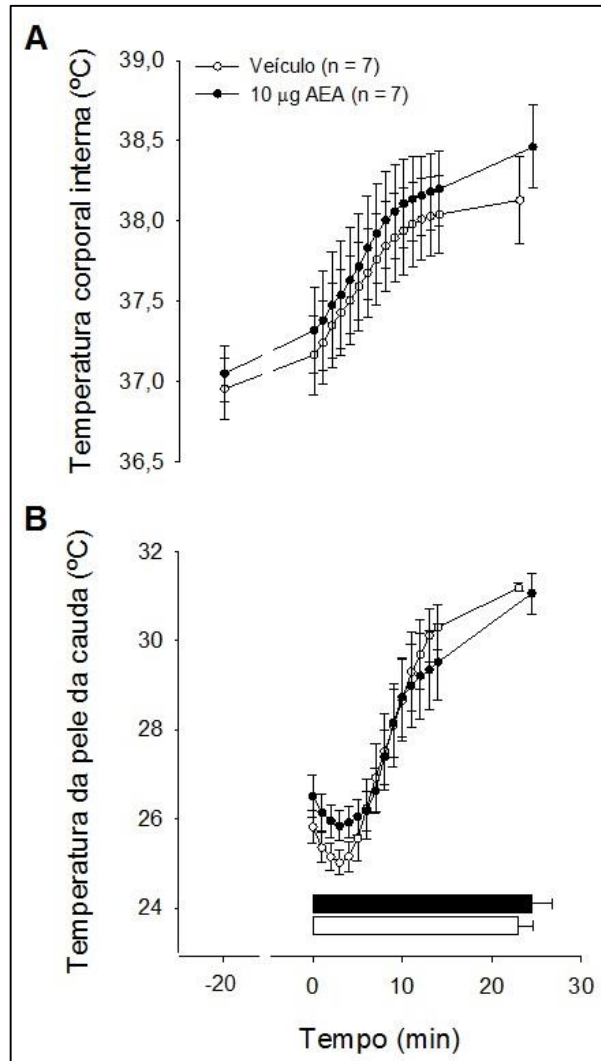


Figura 26. Efeito da administração i.c.v. de 10 µg de AEA sobre as repostas termorregulatórias induzidas pelo exercício progressivo de corrida em esteira. A, Temperatura corporal interna; B, Temperatura da pele da cauda. As barras inferiores referem-se ao tempo de corrida desempenhado pelos animais em seus respectivos grupos.

A Tabela 3 apresenta o perfil de resposta termorregulatória e de desempenho físico dos animais tratados com veículo e 10 µg de AEA no teste de exercício progressivo de corrida em esteira.

Não foram encontradas diferenças nos parâmetros de desempenho físico, que incluem o tempo de exercício, trabalho realizado, velocidade máxima atingida e distância percorrida no teste. Com relação aos parâmetros termorregulatórios, os animais tratados com 10 µg de AEA apresentaram valores maiores de T_i no momento da fadiga, porém, o acúmulo de calor também não apresentou diferença.

Tabela 3. Efeito da administração i.c.v. de 10 µg de AEA sobre os parâmetros termorregulatórios e de desempenho físico durante o exercício progressivo de corrida em esteira

	VEÍCULO	ANANDAMIDA	P
Tempo de exercício (min)	23,0 ± 1,6	24,4 ± 2,3	0,45
Trabalho (kgm)¹	7,2 ± 0,7	8,4 ± 0,9	0,19
Veloc. Máx. Atingida (m.min⁻¹)	17,3 ± 0,6	17,7 ± 0,8	0,48
Distância percorrida (m)	307,7 ± 26,5	334,9 ± 39,9	0,43
Ti na fadiga (°C)	38,13 ± 0,27	38,46 ± 0,26	< 0,01
Tc na fadiga (°C)	31,19 ± 0,09	31,06 ± 0,46	0,77
Acúmulo de calor (cal)²	214,5 ± 20,6	258,4 ± 31,2	0,21

¹*Trabalho (W):* $W (Kgm) = m \cdot TTE \cdot v \cdot \text{sena}$, onde m = massa corporal (Kg); v = velocidade da esteira (m.min⁻¹); sena = inclinação da esteira.

²*Acúmulo de calor (HSR):* $HSR (cal \cdot \text{min}^{-1}) = \Delta Tc \cdot m \cdot c$, onde m = massa corporal (g); c = calor específico dos tecidos do animal (0.826 cal.g⁻¹.c⁻¹).

Considerando que o SEC é ativado por demanda, dentre os quais podemos citar o exercício físico, é plausível sugerir que possíveis respostas termorregulatórias poderiam ser encontradas em doses maiores quando comparadas àquelas testadas em condições de repouso. Dessa forma, foi investigado se uma maior dose de AEA induziria modificações nas respostas termorregulatórias e, conseqüentemente, no perfil de desempenho físico dos animais.

A Figura 27 apresenta os efeitos da administração i.c.v. de veículo e 20 µg de AEA sobre as respostas termorregulatórias durante o exercício progressivo de corrida em esteira.

Apesar da utilização de uma dose maior de AEA, não foram observados efeitos sobre os parâmetros termorregulatórios avaliados durante o exercício forçado (Ti e Tc referentes aos Gráficos 27A e 27B, respectivamente).

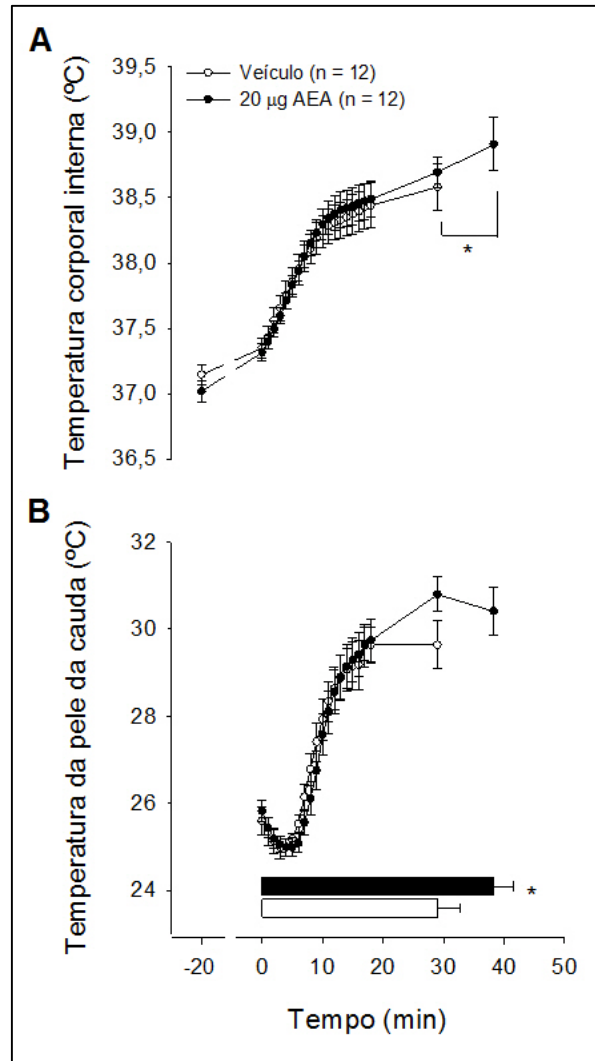


Figura 27. Efeito da administração i.c.v. de 20 µg de AEA sobre as repostas termorregulatórias induzidas pelo exercício progressivo de corrida em esteira. A, Temperatura corporal interna; B, Temperatura da pele da cauda. As barras inferiores referem-se ao tempo de corrida desempenhado pelos animais em seus respectivos grupos.

A Tabela 4 apresenta o perfil de resposta termorregulatória e de desempenho físico dos animais tratados com veículo e 20 µg de AEA no teste de exercício progressivo de corrida em esteira.

Os animais tratados com maior dose de AEA apresentaram melhora em todos parâmetros de desempenho físico: tempo de exercício ($p < 0,001$), trabalho realizado ($p < 0,01$), velocidade máxima atingida ($p < 0,01$) e distância percorrida ($p < 0,01$). Além disso, os valores de T_i no momento da fadiga, bem como, o acúmulo de calor calculado em toda sessão de exercício, também foram maiores quando comparados ao tratamento com veículo.

Tabela 4. Efeito da administração i.c.v. de 20 µg de AEA sobre os parâmetros termorregulatórios e de desempenho físico durante o exercício progressivo de corrida em esteira

	VEÍCULO	ANANDAMIDA	P
Tempo de exercício (min)	29,0 ± 3,8	38,3 ± 4,4	< 0,001
Trabalho (kgm)	11,3 ± 1,9	16,2 ± 2,6	< 0,001
Veloc. Máx. Atingida (m.min⁻¹)	19,4 ± 1,3	22,6 ± 1,5	< 0,001
Distância percorrida (m)	440,0 ± 76,0	667,9 ± 105,1	< 0,01
Ti na fadiga (°C)	38,58 ± 0,17	38,91 ± 0,20	< 0,05
Tc na fadiga (°C)	29,64 ± 0,54	30,31 ± 0,56	0,11
Acúmulo de calor (cal)	286,7 ± 33,1	365,0 ± 46,8	< 0,05

A Figura 28 apresenta as correlações existentes entre as variáveis termorregulatórias e o desempenho físico dos animais tratados com 20 µg de AEA e veículo.

É possível confirmar uma relação direta entre o desempenho físico e a Ti no momento da fadiga ($r = 0,740$, $p < 0,001$; Figura 28A), a Tc no momento da fadiga ($r = 0,535$, $p < 0,01$; Figura 28B) e o calor acumulado durante a sessão do exercício de corrida progressivo em esteira ($r = 0,685$; $p < 0,001$; Figura 28C). Além disso, foi encontrada também correlação positiva entre a Ti e Tc no momento da fadiga ($r = 0,456$; $p < 0,05$; Figura 28D), o que demonstra a integração entre essas variáveis no controle termorregulatório durante o exercício físico.

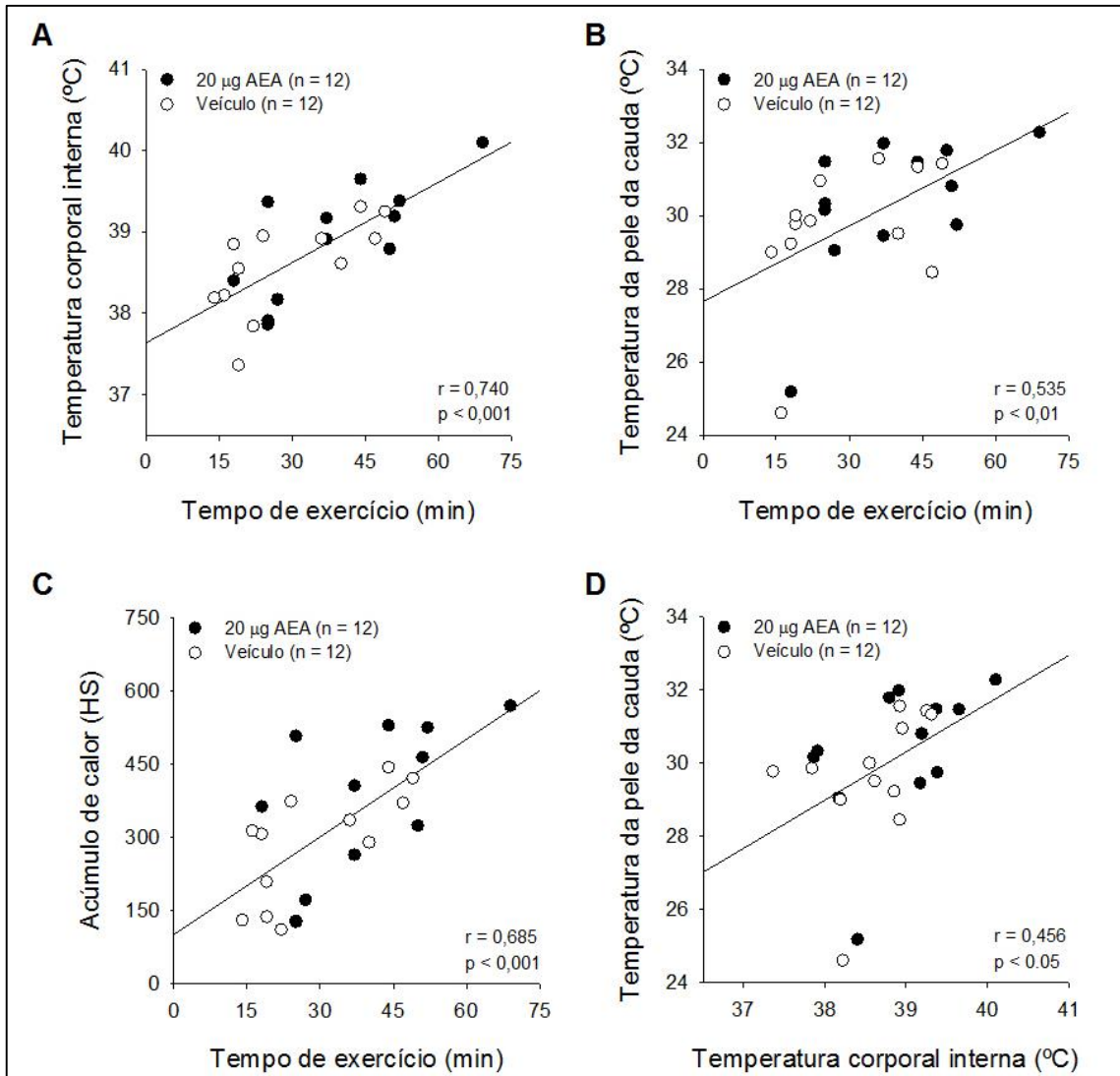


Figura 28. Correlações entre o tempo de exercício e as variáveis termorregulatórias. A, Temperatura corporal interna; B, Temperatura da pele da cauda; C, Acúmulo de calor; D, Relação entre T_i e T_c .

O estudo da influência do tratamento da AEA central sobre a ativação neuronal induzida pelo exercício em núcleos hipotalâmicos está ilustrado nas Figuras 29, 30 e 31, representando, respectivamente, o PVN, o SON e mPOA.

Os animais tratados com 20 µg de AEA apresentaram maior expressão da proteína c-Fos em torno de 66% no PVN ($p < 0,01$; Figura 29) e 76% na mPOA ($p < 0,01$; Figura 30). Por outro lado, nenhuma diferença foi encontrada no SON ($p = 0,76$; Figura 31).

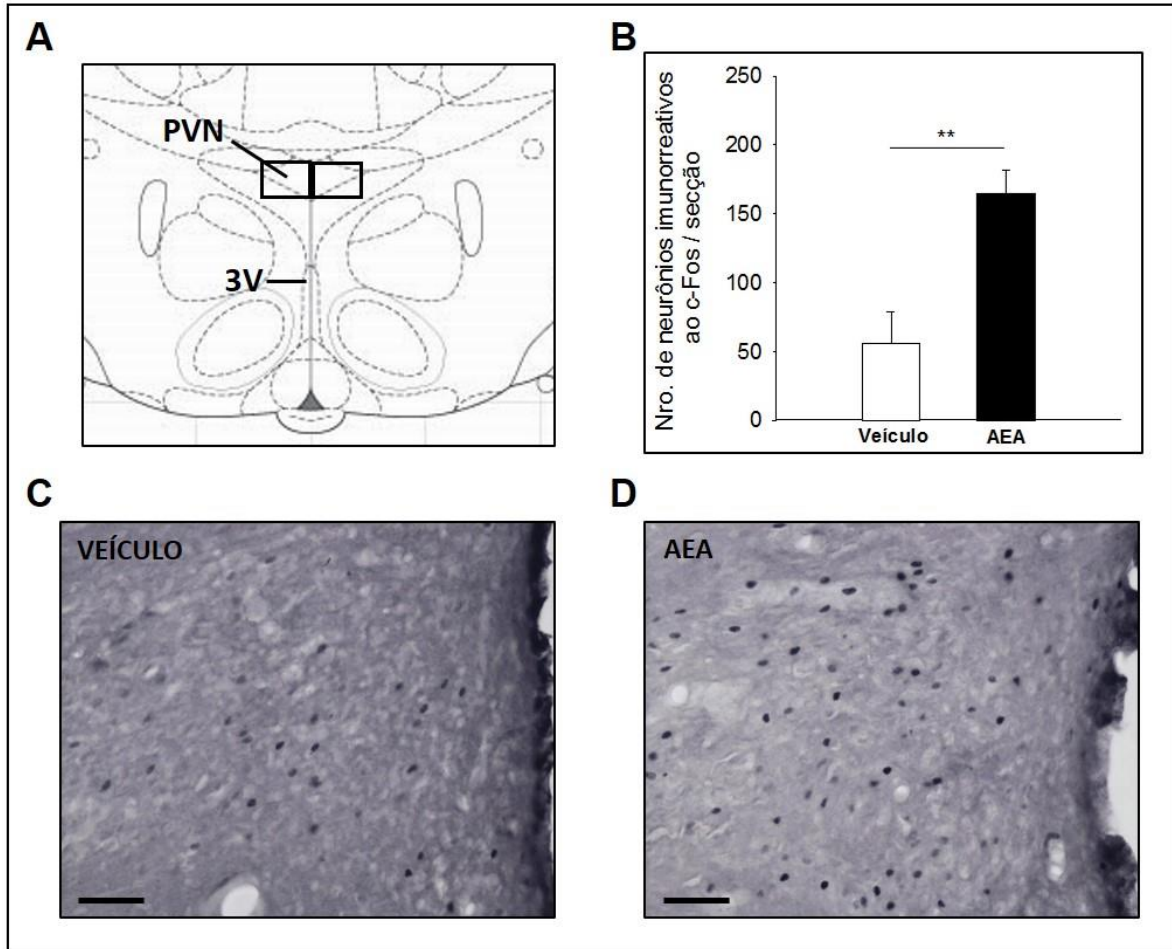


Figura 29. Efeito da administração i.c.v. de 20 µg de AEA sobre a expressão da proteína c-Fos induzida pelo exercício no PVN. A, Diagrama esquemático representando a localização da contagem dos neurônios imunorreativos à proteína c-Fos; B, Média ± EPM do número de neurônios imunorreativos à proteína c-Fos por secção; C e D, Fotomicrografias das secções coronais do cérebro apresentando a imunorreatividade à proteína c-Fos nos grupos Veículo e AEA, respectivamente. ** p < 0,01.

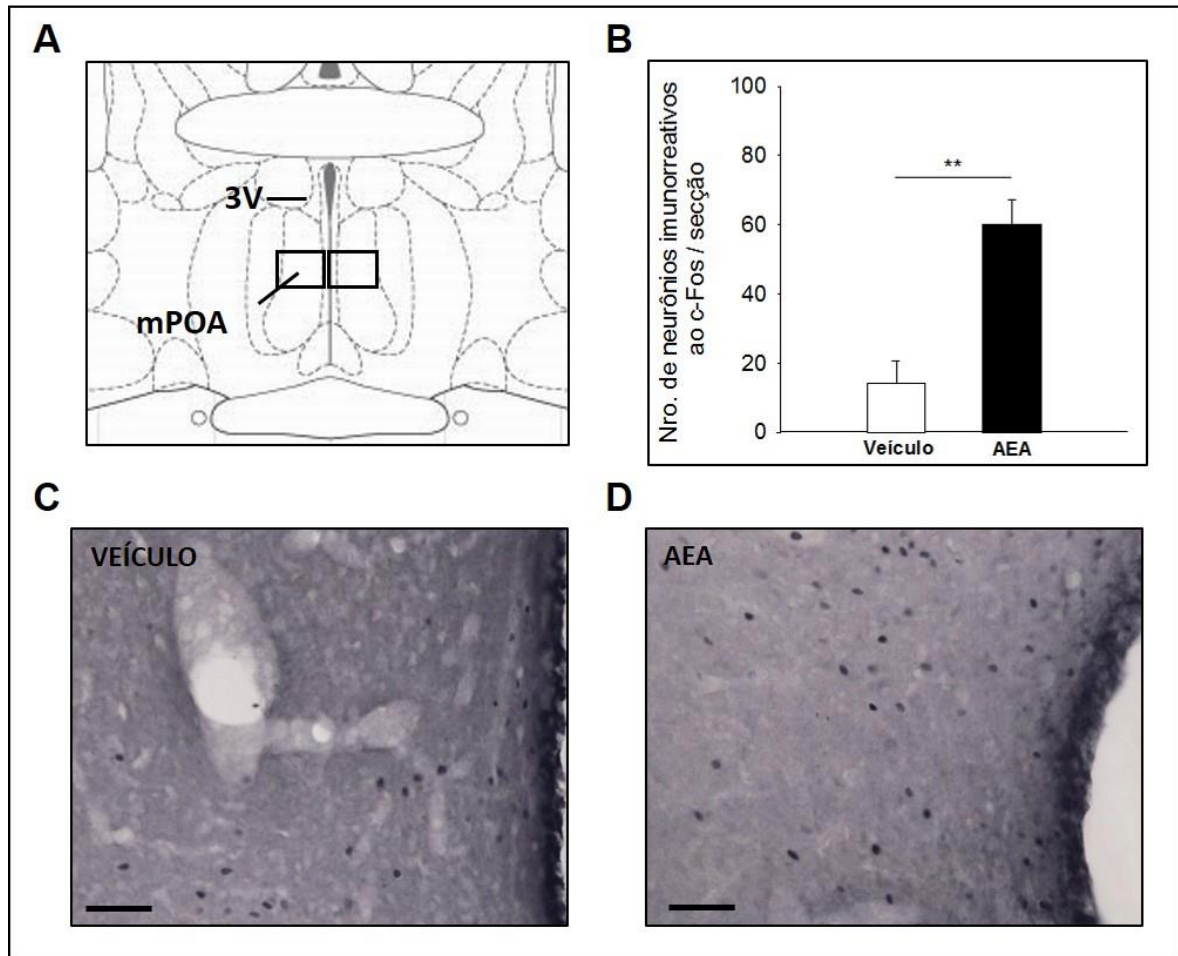


Figura 30. Efeito da administração i.c.v. de 20 µg de AEA sobre a expressão da proteína c-Fos induzida pelo exercício na mPOA. A, Diagrama esquemático representando a localização da contagem dos neurônios imunorreativos à proteína c-Fos; B, Média ± EPM do número de neurônios imunorreativos à proteína c-Fos por secção; C e D, Fotomicrografias das secções coronais do cérebro apresentando a imunorreatividade à proteína c-Fos nos grupos Veículo e AEA, respectivamente. ** $p < 0,01$.

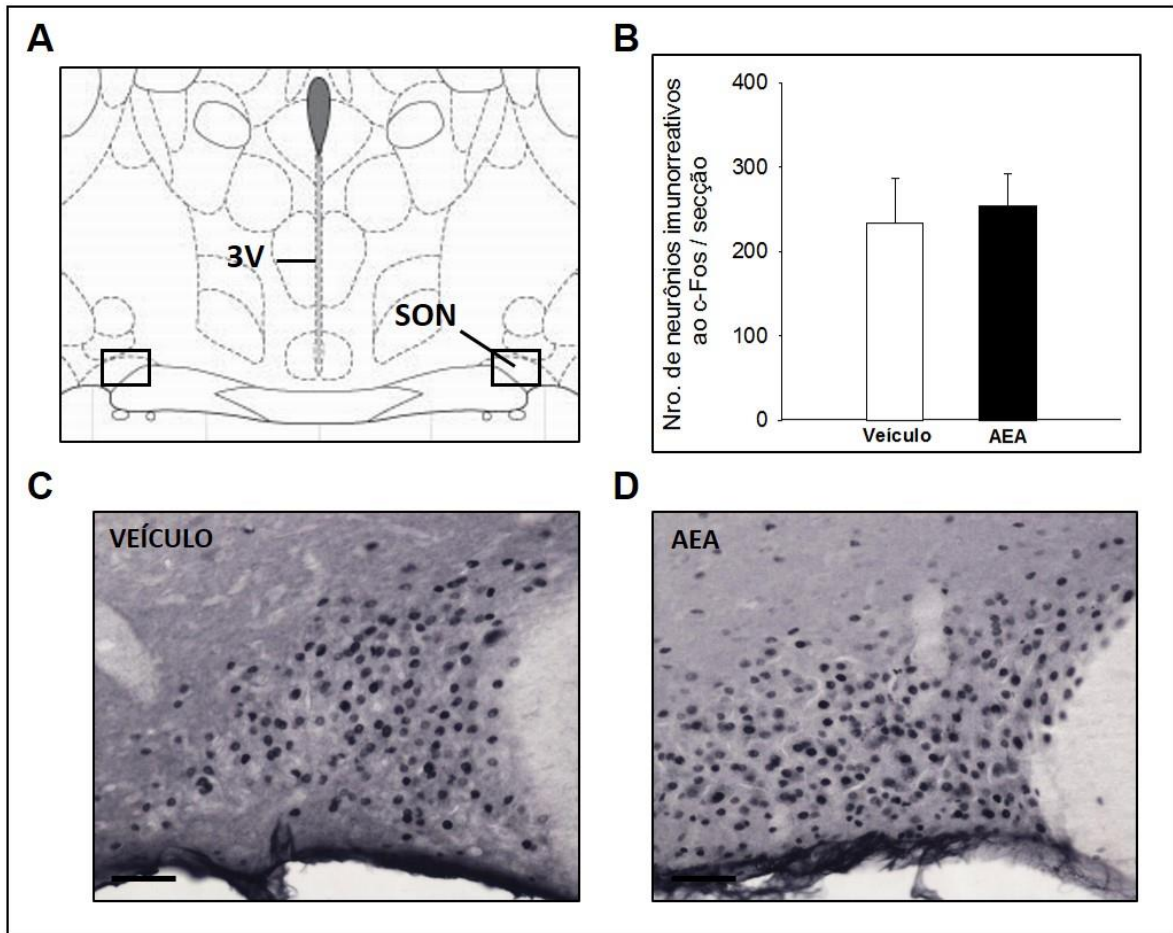


Figura 31. Efeito da administração i.c.v. de 20 µg de AEA sobre a expressão da proteína c-Fos induzida pelo exercício no SON. A, Diagrama esquemático representando a localização da contagem dos neurônios imunorreativos à proteína c-Fos; B, Média \pm EPM do número de neurônios imunorreativos à proteína c-Fos por secção; C e D, Fotomicrografias das secções coronais do cérebro apresentando a imunorreatividade à proteína c-Fos nos grupos Veículo e AEA, respectivamente.

5.3 – EFEITO DO TREINAMENTO FÍSICO E DIETA PALATÁVEL SOBRE A EXPRESSÃO CEREBRAL DE RECEPTORES CB₁ E NAPE-PLD

A Figura 32 apresenta o perfil semanal de ganho de peso corporal dos animais do grupo controle, bem como, daqueles que foram submetidos ao treinamento físico ou ao tratamento com dieta palatável no período de 8 semanas.

A dieta palatável não induziu alterações significativas no ganho de peso, porém, os animais submetidos ao treinamento físico apresentaram ganho de peso reduzido quando comparado aos animais do grupo controle, mostrando-se inferior a partir da 4ª semana de treinamento (Figura 32).

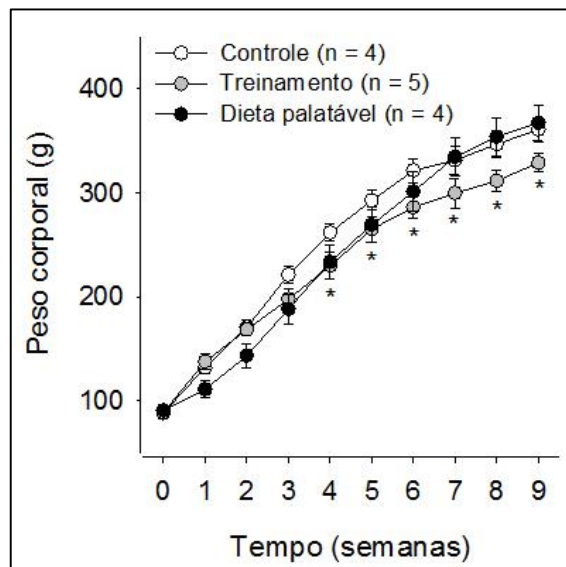


Figura 32. Evolução do ganho de peso corporal em ratos controle e submetidos ao tratamento com dieta palatável ou treinamento físico. * $p < 0,05$ comparado ao controle.

A Tabela 5 apresenta o perfil de distribuição lipídica e metabólica dos animais controle e submetidos ao treinamento físico ou ao tratamento com dieta palatável.

Confirmando a análise anterior, os animais do grupo treinado apresentaram menor ganho de peso corpóreo ao final do tratamento, mas sem alterações significativas no perfil de distribuição lipídica. Por outro lado, os animais submetidos ao tratamento da dieta palatável apresentaram aumento na quantidade de tecido adiposo mesentérico e inguinal, o que levou à um maior índice de adiposidade.

Apesar dos níveis séricos de glicose e leptina não terem sido diferentes entre os tratamentos, tanto os animais submetidos ao tratamento com dieta palatável (de

forma não esperada), quanto os animais submetidos ao treinamento físico, apresentaram menores concentrações plasmáticas de insulina.

Tabela 5. Caracterização da distribuição lipídica e perfil bioquímico em ratos controle e submetidos ao tratamento com dieta palatável ou treinamento físico

	Controle (n = 4)	Treinamento (n = 5)	Dieta Palatável (n = 4)
Peso corporal inicial (g)	88,2 ± 5,7	88,8 ± 6,6	90,7 ± 4,7
Peso corporal final (g)	361,0 ± 11,4	329,0 ± 8,9*	367,5 ± 17,0
Ganho de peso corp. (g)	272,7 ± 12,9	240,2 ± 5,3*	276,7 ± 13,3
T.A.M. (g/100 g p.c.)	0,68 ± 0,04	0,63 ± 0,04	0,78 ± 0,04
T.A.R. (g/100 g p.c.)	0,52 ± 0,08	0,42 ± 0,07	0,92 ± 0,10*
T.A.I. (g/100 g p.c.)	0,41 ± 0,03	0,39 ± 0,04	0,79 ± 0,11*
T.A.E. (g/100 g p.c.)	0,87 ± 0,11	0,68 ± 0,08	0,87 ± 0,07
Índice de adiposidade	2,48 ± 0,16	2,10 ± 0,15	3,35 ± 0,19*
Insulina (ng/dL)	3,29 ± 0,36	1,84 ± 0,22*	1,87 ± 0,30*
Leptina (ng/dL)	4,11 ± 0,68	3,85 ± 0,57	5,16 ± 0,96
Glicose (mg/dL)	159,1 ± 8,3	144,4 ± 4,5	151,0 ± 1,32

* p < 0,05 comparado ao controle

¹*Índice de adiposidade: $ID = [\sum (\text{peso TAM, TAR, TAI e TAE}) / \text{peso corporal}] \times 100$, onde TAM = tecido adiposo mesentérico; TAR = tecido adiposo retroperitoneal; TAI = tecido adiposo inguinal; TAE = tecido adiposo epididimal.*

A Figura 33 apresenta o desempenho físico dos animais pertencentes ao grupo controle, grupo treinamento físico e grupo dieta palatável antes de iniciar os tratamentos (teste progressivo 1) e após as 8 semanas de tratamentos (teste progressivo 2).

Antes de iniciar os tratamentos, não há diferenças na performance entre os grupos, porém, ao final de 8 semanas, verifica-se a efetividade do treinamento físico, uma vez que apenas o grupo treinado apresentou melhora no desempenho quando comparado aos grupos controle e dieta palatável.

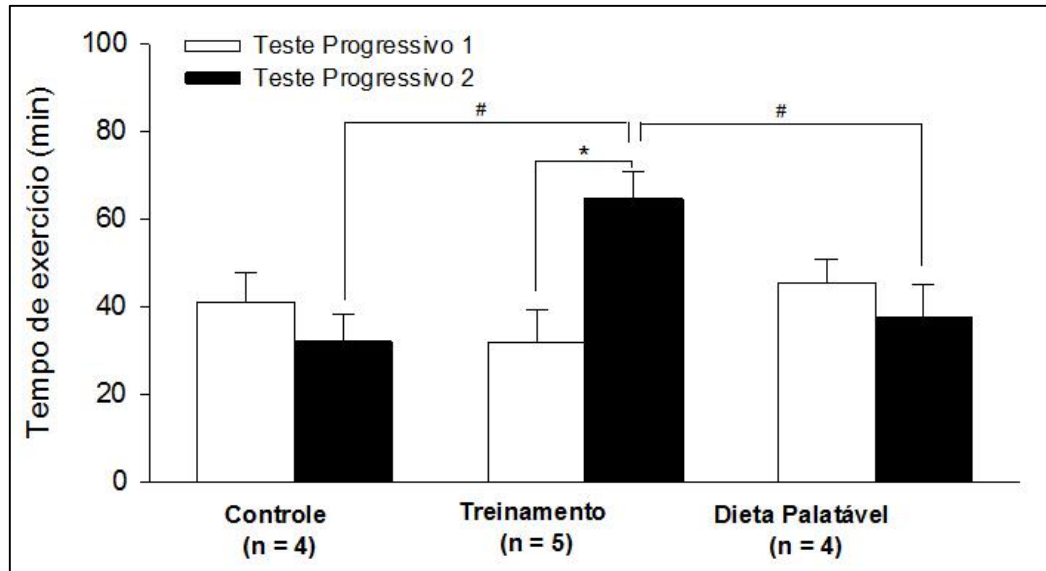


Figura 33. Efeito do treinamento sobre o desempenho físico. * $p < 0,05$ comparando os testes progressivos 1 e 2 dentro de cada grupo. # $p < 0,05$ comparando o Teste Progressivo 2 entre os grupos.

A Figura 34 apresenta a expressão do receptor CB_1 em 5 regiões cerebrais (córtex frontal, cerebelo, hipocampo, hipotálamo e área pré-óptica) ao final das 8 semanas de tratamentos. As respostas apresentaram variações em relação a área analisada.

A expressão do receptor CB_1 apresentou-se maior no córtex frontal e menor no hipotálamo após o treinamento físico – que não induziu alterações em outras regiões como o cerebelo, hipocampo e área pré-óptica. Por outro lado, a dieta palatável reduziu a expressão do receptor CB_1 no cerebelo e hipotálamo, sem modificações observadas nas demais regiões analisadas.

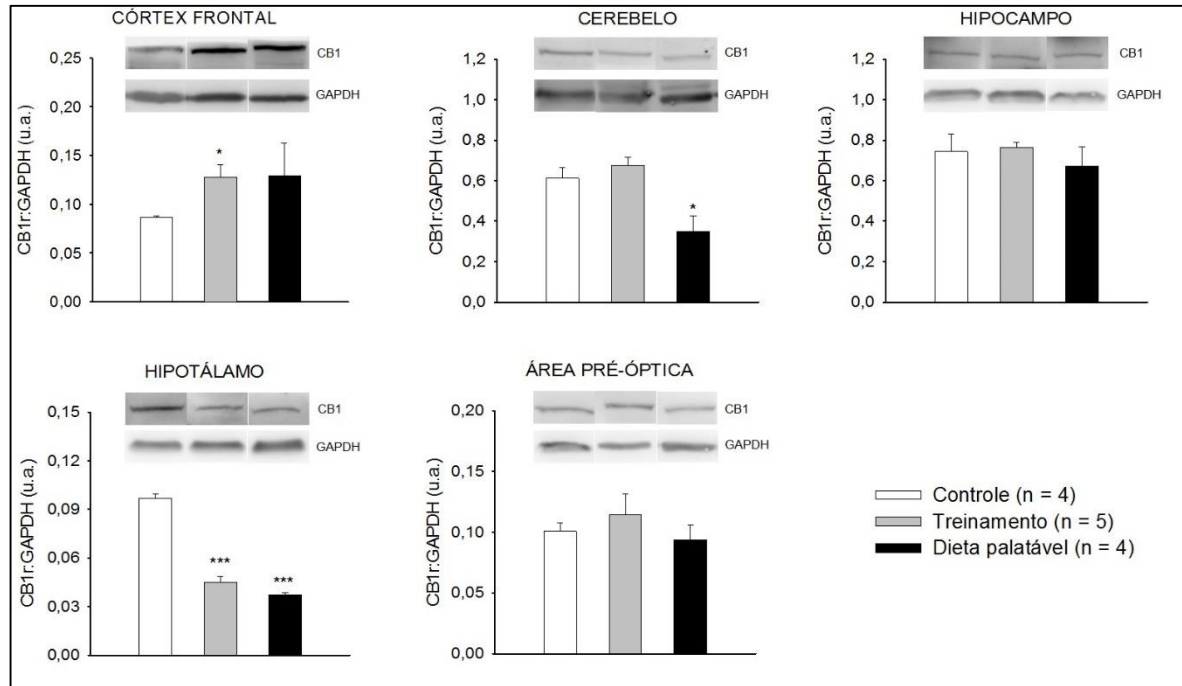


Figura 34. Efeito do treinamento físico e dieta palatável sobre a expressão de receptores CB₁ em diferentes regiões cerebrais. * p < 0,05; ** p < 0,001 em relação ao controle.

A Figura 35 apresenta a expressão da enzima responsável pela síntese da AEA, NAPE-PLD, em 5 regiões cerebrais (córTEX frontal, cerebelo, hipocampo, hipotálamo e área pré-óptica) ao final das 8 semanas de tratamentos. A exemplo dos resultados obtidos para o receptor CB₁, as respostas apresentaram variações em relação a área analisada.

A enzima NAPE-PLD apresentou-se maior no córTEX frontal e menor no hipotálamo e área pré-óptica dos animais tratados com a dieta palatável. Por outro lado, o treinamento físico não induziu mudanças significativas em nenhuma região estudada.

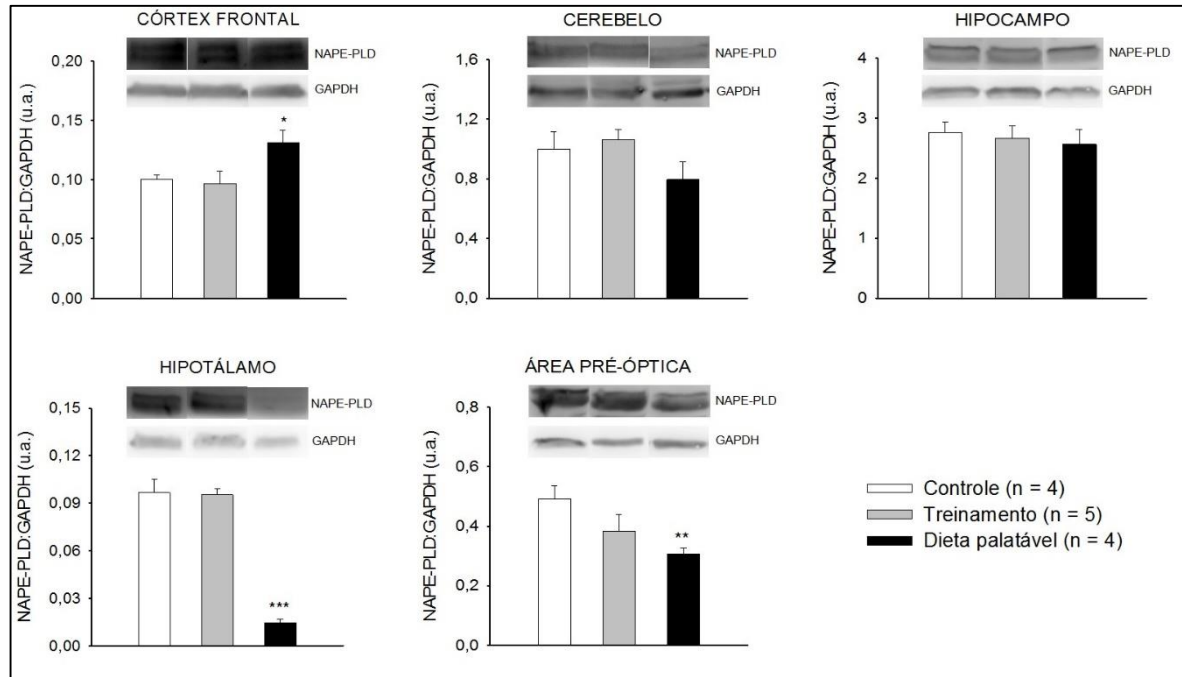


Figura 35. Efeito do treinamento físico e dieta palatável sobre a expressão da enzima NAPE-PLD em diferentes regiões cerebrais. * p < 0,05; ** p < 0,01; * p < 0,001 em relação ao controle.**

6 – DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo demonstram que a estimulação central do SEC induz alterações na função termorregulatória de forma independente de respostas comportamentais. A administração i.c.v. de AEA promove aumento pronunciado da T_i , que pode inclusive superar a hipertermia normalmente induzida pelo aumento da ALE. Esta resposta térmica não é acompanhada por alterações sobre a atividade locomotora ou sobre o comportamento alimentar. Alteração na atividade locomotora associada ao aumento da T_i induzida pela AEA só foram observadas para T_i acima de 38 °C.

Por outro lado, na situação de exercício físico forçado (corrida em esteira), a estimulação central do SEC influencia nas respostas termorregulatórias durante o exercício de maneira mais discreta, demonstrando um aumento mais pronunciado da T_i apenas nos momentos finais do exercício. De forma interessante, a AEA em doses elevadas potencializa a ativação neuronal em centros hipotalâmicos envolvidos no controle da temperatura corporal e melhora o desempenho físico.

Por fim, o treinamento físico – indutor de hipertermia recorrente – e o uso de dieta palatável – indutor da termogênese –, iniciados logo após o desmame e finalizados após 8 semanas, modifica a expressão de alguns dos constituintes do SEC (receptor CB_1 e enzima NAPE-PLD) em regiões cerebrais como hipotálamo e área pré-óptica, o que poderiam contribuir para adaptações no perfil termorregulatório na fase adulta.

É bem estabelecido que o SEC modula diversas funções autonômicas e comportamentais. Quatro delas são bem características e foram definidas como a “tétrade dos efeitos induzidos pelos canabinoides”: roedores tratados com canabinoides apresentam hipoatividade, catalepsia, antinocicepção e hipotermia [93, 99, 122, 123]. Apesar de alguns destes efeitos relacionarem entre si, não haviam estudos investigando a interação entre eles, como por exemplo, se os efeitos térmicos produzidos pela modulação do SEC estariam associados às alterações no comportamento locomotor, e vice-versa.

A confirmação da participação do SEC sobre a termorregulação data da década de 70, ou seja, antes mesmo da designação e descoberta dos constituintes

endógenos atualmente conhecidos neste sistema. Os estudos iniciaram com testes utilizando os compostos extraídos da maconha, principalmente o Δ^9 -THC [83, 84, 86]. Com a descoberta dos constituintes endógenos que fazem parte do SEC e a síntese de drogas capazes de modular o sistema, tem sido possível aprofundar os conhecimentos sobre os mecanismos pelos quais o SEC participa da regulação da temperatura corporal.

Sabe-se que o receptor CB₁ é o principal mediador das respostas termorregulatórias induzidas pela ativação do SEC e que tal resposta apresenta uma característica dual, sendo influenciada pela via de administração e dose utilizada. O senso geral é que a estimulação periférica do SEC induza hipotermia, enquanto que, centralmente, doses baixas promovam aumento, enquanto que doses mais elevadas levam à redução da Ti [89, 91-98, 105, 106].

O presente estudo demonstrou, pela primeira vez, que o efeito térmico induzido pelo uso de agonistas canabinoides em condições de repouso pode ocorrer de maneira independente de alguns fatores comportamentais, tais como a atividade locomotora e a ingestão alimentar. Isto só se tornou possível pela avaliação simultânea e contínua da Ti e ALE, diferente das análises isoladas da Ti e locomoção em animais distintos realizadas em trabalhos anteriores [89, 93, 94, 122].

Além disso, outra contribuição positiva do protocolo experimental utilizado encontra-se no fato de que os animais não foram imobilizados durante os testes, não passaram por manipulações que pudessem induzir dor e ficaram mantidos em suas gaiolas de permanência do biotério; assim, os fatores estressores foram minimizados. Em grande parte dos estudos anteriores, os animais foram imobilizados para realizar a injeção das drogas (principalmente nos testes de injeção periférica, que envolvia a administração intraperitoneal), a temperatura era medida via termômetro retal (que pode gerar certo desconforto ao animal) e a locomoção normalmente era investigada por meio de testes comportamentais que envolvem um ambiente novo, como o campo aberto (que é conhecido como indutor de hipertermia persistente) [89, 93, 94, 122, 124, 125].

A investigação da influência da ativação do SEC sobre a inter-relação entre efeitos térmicos e comportamentais foi analisada em dois momentos distintos, sob condições fisiológicas normais: (1) na fase clara do ritmo circadiano, onde é possível encontrar os menores valores de temperatura corporal, atividade locomotora e ingestão alimentar e (2) na fase escura do ritmo circadiano, onde temos o período de

maior atividade dos animais e, conseqüentemente, de temperatura corporal. Dessa forma, foi possível investigar o efeito térmico e comportamental da AEA em duas fases diferentes do ciclo circadiano de temperatura e atividade, eliminando assim, eventual mascaramento promovido pela hipolocomoção na fase clara do ciclo, ou aumento da Ti na fase escura do ciclo.

A injeção i.c.v. de AEA induziu aumento da Ti nos dois momentos do ritmo circadiano, sempre com a maior dose testada (10 µg de AEA) apresentando o efeito térmico mais pronunciado. O tratamento com AEA às 10 h – momento em que a Ti se encontra em menores valores – promoveu aumento pronunciado e persistente da Ti; além disso, a mesma dose de AEA, injetada às 19 h, ainda conseguiu sobrepujar a hipertermia da fase escura do ciclo, demonstrando um efeito claro e potente da ativação do SEC em induzir aumento da Ti. Este efeito térmico do tratamento central com AEA apresenta um perfil dose-dependente dentro da primeira hora após administração (cujo efeito inicia-se aproximadamente a partir de 20 min) persistindo por várias horas.

A descrita hipertermia poderia parecer um paradoxo com relação à hipotermia incluída na tétrade mencionada anteriormente, porém esse feito hipotérmico parece depender da via de administração e da dose utilizada. Especificamente, sobre a administração i.c.v. de AEA, há trabalhos demonstrando tanto aumento, quanto ausência de efeito sobre a temperatura corporal [105, 106, 126].

Interessante notar que o aumento da Ti mediado pelo tratamento com AEA ocorreu independente de mudanças comportamentais tanto da ALE, como da ingestão alimentar. Porém, nossos resultados trazem evidências de que um aumento pronunciado da Ti possa induzir uma resposta adaptativa caracterizada por redução da atividade espontânea.

As análises das respostas dos animais sobre as variáveis medidas demonstraram o padrão clássico nos valores de temperatura e atividade para roedores, isto é, menor ALE e conseqüentemente menor Ti na fase clara do ritmo circadiano, e maior ALE e Ti na sua fase escura. Assim, as correlações entre Ti e ALE demonstraram que o protocolo experimental utilizado foi capaz de caracterizar a relação recíproca entre a ALE e a Ti. Esta relação existe uma vez que a atividade locomotora resulta em produção de calor e, conseqüentemente, em aumento da Ti [108, 109].

Por outro lado, essa relação é invertida quando os animais estão sob influência dos efeitos térmicos induzidos pela AEA. Analisando os gráficos de correlações das Figuras 15 e 24, observa-se que os animais tratados com veículo dificilmente atingem valores médios superiores à 38 °C, mesmo durante a fase escura do ciclo onde a T_i se encontra em seus maiores valores; já os animais tratados com 10 µg de AEA, em sua grande maioria, apresentaram valores superiores a 38 °C mesmo na fase clara do ciclo onde os valores de T_i estão baixos. Sendo assim, podemos inferir que a T_i próxima de 38 °C seria possivelmente um limiar para respostas adaptativas comportamentais induzidas pelo aumento da T_i , dentre elas, a redução da atividade locomotora. Vale ressaltar que este perfil de resposta foi encontrado em ambas as fases do ciclo circadiano.

Os efeitos térmicos da ativação do SEC pela administração de AEA podem ser mediados pela ativação do receptor CB_1 . Apesar de estarem presentes em diversos tecidos periféricos, eles são considerados primariamente como receptores neuronais e a sua localização no cérebro é consistente com os efeitos farmacológicos produzidos pelos canabinoides. Por exemplo, as maiores concentrações nas regiões do córtex, hipocampo e cerebelo poderiam explicar seus principais efeitos sobre a cognição, memória e movimento; enquanto que as menores densidades nas áreas do tronco encefálico reguladoras das funções cardiovascular e respiratória poderiam justificar a menor participação do SEC sobre a função respiratória [12-15, 127-130]. Assim, considerando que estas relações são bem definidas, é plausível supor que a participação dos receptores CB_1 localizados na área pré-óptica e hipotálamo, importantes centros termorregulatórios, sejam os responsáveis pela mediação destas respostas [13-15, 74, 131, 132]. Esta hipótese é reforçada por estudos anteriores que apresentaram que os efeitos térmicos mediados pela AEA seriam dependentes exclusivamente dos receptores CB_1 e que a injeção intra-hipotalâmica promoveria efeito mais potente (cerca de 10 vezes) quando comparado à injeção i.c.v. [96, 105].

Além disso, levando em consideração que a AEA central induziu aumento da T_i sem alterar a ALE, é provável que os efeitos térmicos encontrados estejam mais relacionados com mecanismos autonômicos de produção e/ou dissipação de calor. Esta hipótese foi parcialmente confirmada por Fraga e colaboradores (2009) que verificaram que o aumento da T_i induzida pela injeção i.c.v. de AEA foi precedida pela redução da T_c que corresponde à um prejuízo nos mecanismos de dissipação de calor, o que caracteriza uma resposta febril [105]. Entretanto, ainda não são

conhecidos se a AEA central estimula a produção de calor e quais mecanismos poderiam estar envolvidos nestas respostas.

Todos os trabalhos investigando a participação do SEC sobre a termorregulação foram realizados em condições de repouso, e não há estudos sobre o efeito da modulação do SEC sobre as respostas termorregulatórias durante o exercício físico.

Neste trabalho verificamos que a mesma dose de AEA (10 µg) que induziu um efeito febrinogênico pronunciado durante o repouso, não apresentou efeito observável sobre os ajustes termorregulatórios durante a maior parte do exercício físico forçado em esteira, assim como sobre o desempenho físico realizado pelos animais.

O aumento da T_i durante o exercício físico é proporcional à sua intensidade e duração, e essa resposta pode ser confirmada pelas correlações positivas encontradas entre os valores de T_i e T_c ao final do exercício, com o tempo de exercício em que os animais realizaram a corrida até a fadiga. Esse aumento da T_i é decorrente do metabolismo corporal aumentado para suprir as demandas energéticas dos músculos em atividade e do desequilíbrio temporário entre as taxas de produção e dissipação de calor durante os estágios iniciais do exercício e da velocidade com a qual os mecanismos de dissipação de calor respondem ao aumento da T_i [112-116, 133, 134].

Assim, considerando que o aumento da T_i induzida pelo exercício físico forçado ocorre de forma mais abrupta e exponencial quando comparado ao efeito térmico induzido pelo tratamento com AEA e ainda, atinge valores de T_i superiores ao aumento induzido pela maior ALE na fase escura do ritmo circadiano, o efeito térmico da AEA pode ter sido sobreposto nesta situação.

Dose maior de AEA (20 µg) foi posteriormente testada no mesmo protocolo experimental. Novamente, foram observadas alterações nos ajustes termorregulatórios apenas nos momentos finais do exercício. Os animais quando tratados com AEA, obtiveram melhora do desempenho físico, apesar de apresentarem valores de T_i no momento da fadiga superiores quando comparados ao tratamento com veículo.

O aumento da T_i é considerado um dos fatores limitantes do desempenho físico por diminuir a motivação para a continuidade do exercício e assim, aumentar a percepção de esforço [117, 119-121]. Em nossos resultados, verificamos que os animais obtiveram melhora do desempenho físico, mesmo apresentando valores

maiores de Ti no momento da fadiga e maior HS, o que nos leva a sugerir que o tratamento com AEA aumentou a tolerância destes animais à hipertermia induzida pelo exercício.

Estudos desenvolvidos em nosso laboratório já investigaram a participação de diversos neurotransmissores centrais nas respostas termorregulatórias e, conseqüentemente, no desempenho físico. Este efeito ergogênico mediado pela AEA parece similar àquele encontrado quando o sistema dopaminérgico central é hiperestimulado. Utilizando protocolo semelhante ao do presente trabalho, injeção i.c.v. de dopamina melhorou o desempenho físico, apesar dos animais apresentarem maior HS e Ti no momento da fadiga. Levando em consideração estes dados, é razoável pensar na hipótese de que esse efeito seria devido à ativação da via dopaminérgica mesolímbica, importante nas funções comportamentais de motivação, recompensa e sensação de bem-estar, que poderia anular os sinais inibitórios decorrentes do SNC para interrupção do exercício físico [116, 135]. Como o SEC interage de várias formas com essa via de forma a potencializar a transmissão dopaminérgica (ver revisão [136-138]), o efeito ergogênico mediado pela AEA, poderia ser secundariamente obtido pela ativação do sistema de recompensa dopaminérgico.

Além de melhorar o desempenho físico, os animais tratados com AEA apresentaram maior expressão da proteína c-Fos – marcador de ativação neuronal – no PVN e mPOA (nenhuma diferença foi encontrada no SON).

Administração i.c.v. e i.p. de AEA induz ativação neuronal em diversos núcleos, incluindo o PVN e APO [139-142]. Por outro lado, é bem estabelecido que o exercício físico também é um forte indutor de recrutamento neuronal [143-150], porém não se sabe ainda se a hipertermia mediada pelo exercício pode ser um contribuidor para tal resposta, visto que o aquecimento passivo também é capaz de induzir ativação neuronal em diversos núcleos cerebrais, que incluem o PVN, a APO e o SON [151-157].

O PVN é o principal centro integrativo do cérebro que controla as funções autonômicas que contribui para as respostas neuroendócrinas evocadas por uma variedade de estímulos, incluindo o exercício físico e o estresse térmico. A ativação do PVN pelo exercício tem-se correlacionado com a secreção do hormônio de liberação de corticotrofinas, hormônio corticotrófico, vasopressina, lactato sanguíneo, produção de adrenalina e aumento da glicemia, indicando assim, sua importância na ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal como resposta adaptativa na regulação

metabólica requerida durante o exercício físico [143-145, 148, 150, 158-161]. Além disso, uma vez que a demanda energética é elevada, esta ativação do PVN poderia também estar relacionada com a hipertermia induzida pelo exercício, pelo fato do PVN apresentar neurônios termossensíveis [162].

O PVN modula ajustes cardiovasculares requeridos pela hipertermia. Exposição ao ambiente quente evoca respostas reflexas que promovem perda de calor, incluindo aumentos da frequência cardíaca e respiratória, vasodilatação do leito vascular da pele, vasoconstrição do leito vascular visceral, suor em humanos e aumento da secreção salivar e vasodilatação da pele da cauda em roedores. Todas essas respostas estão envolvidas com os ajustes cardiovasculares autonômicos na qual são mediadas pelo SNC através da regulação da atividade dos nervos simpáticos [74, 75, 132, 159, 160, 163-168]. Neurônios no PVN enviam projeções para a região pressora na medula ventrolateral rostral, que projeta diretamente para neurônios motores pré-ganglionares simpáticos na coluna intermediolateral da medula espinhal que, por sua vez, regula a atividade do nervo simpático [168-170]. Neste contexto, foi demonstrado que administração intra-PVN de muscimol (agonista GABA-érgico, inibidor de atividade neuronal) aboliu a clássica resposta de redirecionamento de fluxo sanguíneo em resposta à hipertermia [159, 160].

A APO ocupa uma posição crucial entre as estruturas que participam da função termorregulatória. Esta área contém neurônios termossensíveis, na qual mudam sua atividade frente às alterações na temperatura cerebral, recebe informações térmicas provenientes de termorreceptores centrais e periféricos e processa essas informações para ajustar a temperatura corporal de acordo com as condições fisiológicas e comportamentais. Neurônios sensíveis ao calor são ativados pelo aumento da temperatura local, e neurônios sensíveis ao frio são ativados pela diminuição da temperatura local, mediando os mecanismos de perda e produção de calor, respectivamente. Os sinais provenientes dos neurônios sensíveis ao calor apresentam maior influência nos sinais eferentes para o controle tanto dos mecanismos de perda, quanto dos mecanismos de produção de calor, quando comparados aos neurônios sensíveis ao frio, uma vez que os neurônios sensíveis ao calor podem enviar tanto sinais excitatórios para a perda de calor, quanto inibitórios para a produção de calor [73, 131, 171].

A ativação dos neurônios na APO pelo exercício e pelo estresse térmico parece ser importante para a manutenção da homeostase corporal relacionada aos ajustes

termorregulatórios, pois o aquecimento da APO evoca vasodilatação da pele, a principal resposta efetora de perda de calor não- evaporativa [164] e envia sinais excitatórios aos neurônios no SON, um importante centro envolvido no controle do balanço hidroeletrólítico que poderia ser ameaçado frente à uma hipertermia indutora de desidratação [152].

Por fim, o recrutamento do SON pelo exercício, por sua vez, parece controlar principalmente o balanço fluido, uma vez que a mudança dos líquidos corporais do espaço vascular para os espaços intersticiais e intracelulares e a sudorese em virtude da hipertermia pelo metabolismo muscular durante o exercício podem aumentar a osmolalidade plasmática [148, 172]. Quando animais são expostos ao calor, verifica-se aumento nos níveis plasmáticos de vasopressina, levando à maior conservação de água quando a resposta de perda de calor evaporativa é ativada [173, 174].

Estudos recentes desenvolvidos no laboratório mostraram que a ativação neuronal, especialmente no PVN, contribui para os ajustes termorregulatórios durante o exercício que, por sua vez, se relaciona com a melhora do desempenho físico. Esta hipótese foi confirmada tanto por meio de administração de droga que reduz o desempenho físico e conseqüentemente, reduz a expressão de c-Fos no PVN; quanto pelo treinamento físico, que produziu efeitos contrários [150, 175].

Neste aspecto, o maior recrutamento neuronal encontrado no PVN e mPOA poderia ser em virtude de uma potencialização conjunta envolvendo os estímulos térmicos, motivacionais e da própria AEA. Isto é, o exercício físico e a AEA estimulariam a expressão neuronal de c-Fos, enquanto que a AEA como ativador de vias mesolímbicas, induziria melhora do desempenho físico; o maior tempo de atividade promoveria maior aumento da Ti durante o exercício; que juntos, continuariam a promover maior recrutamento neuronal.

As ações mediadas pelo SEC central parecem estar relacionadas principalmente à ativação do receptor CB₁. Estudos revelam que a expressão do receptor CB₁ já é encontrada logo no estágio inicial do desenvolvimento embrionário e o SEC é importante para o desenvolvimento cerebral durante a vida [176-178]. De igual maneira, o exercício / atividade / treinamento físico geram mudanças no desenvolvimento cerebral, sendo que algumas dessas funções estão relacionadas ao SEC [65-67, 179].

Alguns estudos investigaram o processo de maturação do SEC durante o desenvolvimento pós-natal [177, 178]. A maior concentração de receptor CB₁ tem sido

observada entre P30 – P40 (dias após nascimento), e parece declinar durante o período da adolescência até atingir os valores encontrados na fase adulta (medidos em P70) [178]. Sabe-se que a adolescência é caracterizada por uma fase de aumentada plasticidade neuronal e marcante sensibilidade à estímulos externos [180, 181].

Considerando que o SEC é ativado por demanda e o exercício físico é um estímulo indutor desta ativação é possível que o treinamento físico, como estimulador diário e crônico, possa alterar os componentes do SEC na fase adulta.

O treinamento físico é definido como repetições frequentes e sistematizadas de sessões isoladas de exercício físico com aumento gradativo da potência capaz de promover adaptações aos sistemas fisiológicos e induzir um novo padrão de atividade autonômica [182]. Nossos resultados demonstraram a efetividade do nosso modelo onde o treinamento físico de 8 semanas melhorou o desempenho físico dos animais. Além disso, os animais do grupo treinado tiveram menor ganho de peso corporal no decorrer do seu desenvolvimento, além de um indicativo de maior sensibilidade à insulina, uma vez que apresentaram menores níveis de insulina plasmática, frente à uma mesma glicemia, quando comparado aos animais do grupo controle.

Com relação ao efeito do treinamento físico sobre a expressão de componentes do SEC central, o grupo treinado apresentou mudanças na expressão do receptor CB₁ nas regiões do córtex frontal e hipotálamo, levando ao aumento e redução, respectivamente. A expressão da enzima responsável pela síntese da AEA, a NAPE-PLD, não foi diferente em nenhuma área analisada, indicando que a síntese de AEA parece não ser modificada pelas sessões de exercício físico diário.

Os mecanismos que poderiam estar envolvidos nestas alterações da sinalização canabinoidérgica pelo exercício ou por outros fatores externos ainda não estão elucidados; porém, os aumentos nas concentrações plasmáticas de endocanabinoides após a prática de atividade física [55-59] podem justificar o resultado dessas alterações.

Considerando outras formas de modulações sobre o SEC, o que estaria mais definido até então é que o tempo do estímulo seria o principal contribuinte para estes tipos de respostas modulatórias. Neste contexto, estímulos agudos e crônicos, poderiam induzir, respectivamente, *up-* ou *down-regulation* dos receptores, ou modificar sua funcionalidade de igual maneira.

Há experimentos mostrando que administração crônica periférica de um inibidor da enzima responsável pela hidrólise da AEA entre 38 – 43 dias, reduz a taxa de ligação do receptor CB₁ em diversas áreas cerebrais, como estriado, núcleo accumbens, área do tegumento ventral e hipocampo [183]; ademais, tratamento crônico com agonistas canabinoides também resulta em *down-regulation* da expressão do receptor CB₁ no cérebro [184, 185]. Por outro lado, administração periférica de AEA por apenas 5 dias resultou em significativo aumento na densidade do receptor CB₁ no hipocampo [186].

Similarmente, é o que ocorre com o exercício físico. Curto período de atividade voluntária na roda (8 dias) ou exercício de corrida em esteira (7 dias) aumentaram a taxa de ligação ou expressão do receptor CB₁ no hipocampo [66, 187] e uma única sessão de exercício de corrida forçado em esteira até a fadiga ou exercício de força também aumentaram a expressão do receptor CB₁ no cérebro [60, 61]. Já o treinamento físico de corrida em esteira por 6 semanas (P21 – P60) promoveu redução na expressão do receptor CB₁ no hipocampo e estriado [179].

Padrão semelhante pôde ser verificado também neste estudo com o tratamento crônico utilizando a dieta palatável, estímulo metabólico não associado a um estímulo mecânico que, a exemplo do exercício físico, também pode modular a produção de endocanabinoides centrais [188-190]. A dieta palatável é caracterizada pela elevada taxa de umidade e pelos acréscimos de sacarose ou lipídeos, onde roedores alimentados com essa dieta constituem um modelo animal amplamente utilizado para mimetizar em laboratório as alterações metabólicas e cardiovasculares induzidas pela obesidade [191, 192]. Como esperado, o tratamento de 8 semanas induziu maior índice de adiposidade nos animais, efeito este que pode estar relacionado ao balanço energético positivo induzido pela dieta palatável que aumenta a deposição de gordura [192-194].

Com relação ao seu efeito sobre os componentes do SEC, a dieta palatável reduziu a expressão do receptor CB₁ no cerebelo e no hipotálamo e promoveu mudanças na expressão da enzima NAPE-PLD reduzindo-a no hipotálamo e POA.

Em outros estudos, a dieta palatável também afetou a densidade de receptores CB₁ cerebrais. Dez semanas de tratamento com dieta palatável revelou uma diminuição significativa na taxa de ligação do receptor CB₁ em regiões límbicas [195] e 13 semanas de dieta também reduziu a expressão de mRNA para o receptor CB₁ em regiões do hipotálamo e córtex [196]; ademais, o tratamento de apenas 3 semanas

elevou a taxa de ligação do receptor CB₁ em algumas regiões cerebrais, dentre elas, o hipotálamo, enquanto que 20 semanas de tratamento promoveu efeito contrário na substância nigra e área do tegumento ventral [197].

Em resumo, a hipótese para estas respostas temporais pode se encontrar no aumento dos níveis de endocanabinoides no SNC induzidos pelos modelos crônicos de estimulação, já que tanto níveis elevados de endocanabinoides ou tratamento crônico com agonistas, estão associados com uma diminuição compensatória da densidade do receptor e expressão de mRNA para o receptor CB₁ [198, 199].

7 – CONCLUSÕES

- 1) A estimulação do SEC central, por meio da administração i.c.v. de AEA, pode induzir aumento da T_i de forma independente de alterações comportamentais, como mudanças na atividade locomotora e ingestão alimentar.
- 2) O efeito térmico da AEA central durante o repouso não é imediato, iniciando-se aproximadamente em 30 min após administração; porém é potente o suficiente para sobrepujar os maiores valores de T_i encontrados nas fases de maior atividade em roedores, e persistente podendo prolongar-se por até 8 h após administração.
- 3) O aumento da T_i induzido pela AEA central, acima de valores fisiológicos máximos atingidos durante toda a fase do ritmo circadiano, inverte a relação direta comumente encontrada entre a ALE e T_i , sugerindo a redução da ALE como uma resposta adaptativa ao aumento pronunciado da T_i induzido pela AEA.
- 4) O aumento da biodisponibilidade de AEA central apresenta menor influência nas respostas termorregulatórias durante o exercício físico forçado de corrida em esteira, induzindo maior resposta hipertérmica apenas nos momentos finais que antecedem a fadiga.
- 5) A AEA central potencializa a ativação neuronal induzida pelo exercício físico em centros hipotalâmicos, em especial no PVN e POA, e aumenta o desempenho físico dos animais, tornando-os mais resistentes à hipertermia.
- 6) Estímulos crônicos responsáveis pela ativação recorrente do SEC, como o treinamento físico e uso de dieta palatável, alteram a expressão de componentes do SEC, como o receptor CB_1 e a enzima NAPE-PLD, em regiões cerebrais envolvidas no controle autonômico, emocional e motor, como hipotálamo, POA, córtex e cerebelo.

8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. De Petrocellis, L., M.G. Cascio, and V. Di Marzo, *The endocannabinoid system: a general view and latest additions*. Br J Pharmacol, 2004. **141**(5): p. 765-74.
2. Fonseca, B.M., M.A. Costa, M. Almada, G. Correia-da-Silva, and N.A. Teixeira, *Endogenous cannabinoids revisited: a biochemistry perspective*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2013. **102-103**: p. 13-30.
3. Adams, I.B. and B.R. Martin, *Cannabis: pharmacology and toxicology in animals and humans*. Addiction, 1996. **91**(11): p. 1585-614.
4. Mechoulam, R. and Y. Gaoni, *A Total Synthesis of *Δ*-Delta-1-Tetrahydrocannabinol, the Active Constituent of Hashish*. J Am Chem Soc, 1965. **87**: p. 3273-5.
5. Razdan, R.K., *Structure-activity relationships in cannabinoids*. Pharmacol Rev, 1986. **38**(2): p. 75-149.
6. Devane, W.A., F.A. Dysarz, 3rd, M.R. Johnson, L.S. Melvin, and A.C. Howlett, *Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain*. Mol Pharmacol, 1988. **34**(5): p. 605-13.
7. Matsuda, L.A., S.J. Lolait, M.J. Brownstein, A.C. Young, and T.I. Bonner, *Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA*. Nature, 1990. **346**(6284): p. 561-4.
8. Munro, S., K.L. Thomas, and M. Abu-Shaar, *Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids*. Nature, 1993. **365**(6441): p. 61-5.
9. Lutz, B., *Molecular biology of cannabinoid receptors*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2002. **66**(2-3): p. 123-42.
10. Elphick, M.R. and M. Egertova, *The phylogenetic distribution and evolutionary origins of endocannabinoid signalling*. Handb Exp Pharmacol, 2005(168): p. 283-97.
11. McPartland, J.M. and M. Glass, *Functional mapping of cannabinoid receptor homologs in mammals, other vertebrates, and invertebrates*. Gene, 2003. **312**: p. 297-303.
12. Herkenham, M., A.B. Lynn, M.R. Johnson, L.S. Melvin, B.R. de Costa, and K.C. Rice, *Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study*. J Neurosci, 1991. **11**(2): p. 563-83.
13. Tsou, K., S. Brown, M.C. Sanudo-Pena, K. Mackie, and J.M. Walker, *Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system*. Neuroscience, 1998. **83**(2): p. 393-411.
14. Moldrich, G. and T. Wenger, *Localization of the CB1 cannabinoid receptor in the rat brain. An immunohistochemical study*. Peptides, 2000. **21**(11): p. 1735-42.
15. Pettit, D.A., M.P. Harrison, J.M. Olson, R.F. Spencer, and G.A. Cabral, *Immunohistochemical localization of the neural cannabinoid receptor in rat brain*. J Neurosci Res, 1998. **51**(3): p. 391-402.
16. Pertwee, R.G., A.C. Howlett, M.E. Abood, S.P. Alexander, V. Di Marzo, M.R. Elphick, P.J. Greasley, H.S. Hansen, G. Kunos, K. Mackie, R. Mechoulam, and R.A. Ross, *International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB(1) and CB(2)*. Pharmacol Rev, 2010. **62**(4): p. 588-631.

17. Pagotto, U., G. Marsicano, D. Cota, B. Lutz, and R. Pasquali, *The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance*. *Endocr Rev*, 2006. **27**(1): p. 73-100.
18. Howlett, A.C., *The cannabinoid receptors*. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2002. **68-69**: p. 619-31.
19. Zelasko, S., W.R. Arnold, and A. Das, *Endocannabinoid metabolism by cytochrome P450 monooxygenases*. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2015. **116-117**: p. 112-23.
20. Lynn, A.B. and M. Herkenham, *Localization of cannabinoid receptors and nonsaturable high-density cannabinoid binding sites in peripheral tissues of the rat: implications for receptor-mediated immune modulation by cannabinoids*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1994. **268**(3): p. 1612-23.
21. Galiegue, S., S. Mary, J. Marchand, D. Dussossoy, D. Carriere, P. Carayon, M. Bouaboula, D. Shire, G. Le Fur, and P. Casellas, *Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations*. *Eur J Biochem*, 1995. **232**(1): p. 54-61.
22. Devane, W.A., L. Hanus, A. Breuer, R.G. Pertwee, L.A. Stevenson, G. Griffin, D. Gibson, A. Mandelbaum, A. Etinger, and R. Mechoulam, *Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor*. *Science*, 1992. **258**(5090): p. 1946-9.
23. Mechoulam, R., S. Ben-Shabat, L. Hanus, M. Ligumsky, N.E. Kaminski, A.R. Schatz, A. Gopher, S. Almog, B.R. Martin, D.R. Compton, and et al., *Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors*. *Biochem Pharmacol*, 1995. **50**(1): p. 83-90.
24. Hanus, L., S. Abu-Lafi, E. Fride, A. Breuer, Z. Vogel, D.E. Shalev, I. Kustanovich, and R. Mechoulam, *2-arachidonoyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(7): p. 3662-5.
25. Leggett, J.D., S. Aspley, S.R. Beckett, A.M. D'Antona, and D.A. Kendall, *Oleamide is a selective endogenous agonist of rat and human CB1 cannabinoid receptors*. *Br J Pharmacol*, 2004. **141**(2): p. 253-62.
26. Porter, A.C., J.M. Sauer, M.D. Knierman, G.W. Becker, M.J. Berna, J. Bao, G.G. Nomikos, P. Carter, F.P. Bymaster, A.B. Leese, and C.C. Felder, *Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002. **301**(3): p. 1020-4.
27. Huang, S.M., T. Bisogno, M. Trevisani, A. Al-Hayani, L. De Petrocellis, F. Fezza, M. Tognetto, T.J. Petros, J.F. Krey, C.J. Chu, J.D. Miller, S.N. Davies, P. Geppetti, J.M. Walker, and V. Di Marzo, *An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(12): p. 8400-5.
28. Sugiura, T., S. Kondo, A. Sukagawa, S. Nakane, A. Shinoda, K. Itoh, A. Yamashita, and K. Waku, *2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995. **215**(1): p. 89-97.
29. Pertwee, R.G., *The pharmacology of cannabinoid receptors and their ligands: an overview*. *Int J Obes (Lond)*, 2006. **30 Suppl 1**: p. S13-8.
30. Mechoulam, R., E. Fride, and V. Di Marzo, *Endocannabinoids*. *Eur J Pharmacol*, 1998. **359**(1): p. 1-18.
31. Zygmunt, P.M., J. Petersson, D.A. Andersson, H. Chuang, M. Sorgard, V. Di Marzo, D. Julius, and E.D. Hogestatt, *Vanilloid receptors on sensory nerves*

- mediate the vasodilator action of anandamide.* Nature, 1999. **400**(6743): p. 452-7.
32. Smart, D. and J.C. Jerman, *Anandamide: an endogenous activator of the vanilloid receptor.* Trends Pharmacol Sci, 2000. **21**(4): p. 134.
 33. O'Sullivan, S.E., *Cannabinoids go nuclear: evidence for activation of peroxisome proliferator-activated receptors.* Br J Pharmacol, 2007. **152**(5): p. 576-82.
 34. Kozak, K.R., R.A. Gupta, J.S. Moody, C. Ji, W.E. Boeglin, R.N. DuBois, A.R. Brash, and L.J. Marnett, *15-Lipoxygenase metabolism of 2-arachidonoylglycerol. Generation of a peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist.* J Biol Chem, 2002. **277**(26): p. 23278-86.
 35. Felder, C.C., E.M. Briley, J. Axelrod, J.T. Simpson, K. Mackie, and W.A. Devane, *Anandamide, an endogenous cannabimimetic eicosanoid, binds to the cloned human cannabinoid receptor and stimulates receptor-mediated signal transduction.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(16): p. 7656-60.
 36. Piomelli, D., *The molecular logic of endocannabinoid signalling.* Nat Rev Neurosci, 2003. **4**(11): p. 873-84.
 37. Bisogno, T., *Endogenous cannabinoids: structure and metabolism.* J Neuroendocrinol, 2008. **20 Suppl 1**: p. 1-9.
 38. Wang, J. and N. Ueda, *Biology of endocannabinoid synthesis system.* Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2009. **89**(3-4): p. 112-9.
 39. Yates, M.L. and E.L. Barker, *Inactivation and biotransformation of the endogenous cannabinoids anandamide and 2-arachidonoylglycerol.* Mol Pharmacol, 2009. **76**(1): p. 11-7.
 40. Freund, T.F., I. Katona, and D. Piomelli, *Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling.* Physiol Rev, 2003. **83**(3): p. 1017-66.
 41. Kano, M., T. Ohno-Shosaku, Y. Hashimoto-dani, M. Uchigashima, and M. Watanabe, *Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission.* Physiol Rev, 2009. **89**(1): p. 309-80.
 42. Castillo, P.E., T.J. Younits, A.E. Chavez, and Y. Hashimoto-dani, *Endocannabinoid signaling and synaptic function.* Neuron, 2012. **76**(1): p. 70-81.
 43. Ohno-Shosaku, T., A. Tanimura, Y. Hashimoto-dani, and M. Kano, *Endocannabinoids and retrograde modulation of synaptic transmission.* Neuroscientist, 2012. **18**(2): p. 119-32.
 44. Hiley, C.R. and W.R. Ford, *Cannabinoid pharmacology in the cardiovascular system: potential protective mechanisms through lipid signalling.* Biol Rev Camb Philos Soc, 2004. **79**(1): p. 187-205.
 45. Caspersen, C.J., K.E. Powell, and G.M. Christenson, *Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research.* Public Health Rep, 1985. **100**(2): p. 126-31.
 46. Salmon, P., *Effects of physical exercise on anxiety, depression, and sensitivity to stress: a unifying theory.* Clin Psychol Rev, 2001. **21**(1): p. 33-61.
 47. Dietrich, A. and W.F. McDaniel, *Endocannabinoids and exercise.* Br J Sports Med, 2004. **38**(5): p. 536-41.
 48. Martinsen, E.W., *Physical fitness, anxiety and depression.* Br J Hosp Med, 1990. **43**(3): p. 194, 196, 199.
 49. Steptoe, A. and N. Butler, *Sports participation and emotional wellbeing in adolescents.* Lancet, 1996. **347**(9018): p. 1789-92.

50. Farrell, P.A., A.B. Gustafson, W.P. Morgan, and C.B. Pert, *Enkephalins, catecholamines, and psychological mood alterations: effects of prolonged exercise*. *Med Sci Sports Exerc*, 1987. **19**(4): p. 347-53.
51. Paluska, S.A. and T.L. Schwenk, *Physical activity and mental health: current concepts*. *Sports Med*, 2000. **29**(3): p. 167-80.
52. Scully, D., J. Kremer, M.M. Meade, R. Graham, and K. Dudgeon, *Physical exercise and psychological well being: a critical review*. *Br J Sports Med*, 1998. **32**(2): p. 111-20.
53. Ameri, A., *The effects of cannabinoids on the brain*. *Prog Neurobiol*, 1999. **58**(4): p. 315-48.
54. Hollister, L.E., *Health aspects of cannabis*. *Pharmacol Rev*, 1986. **38**(1): p. 1-20.
55. Sparling, P.B., A. Giuffrida, D. Piomelli, L. Roskopf, and A. Dietrich, *Exercise activates the endocannabinoid system*. *Neuroreport*, 2003. **14**(17): p. 2209-11.
56. Raichlen, D.A., A.D. Foster, A. Seillier, A. Giuffrida, and G.L. Gerdeman, *Exercise-induced endocannabinoid signaling is modulated by intensity*. *Eur J Appl Physiol*, 2013. **113**(4): p. 869-75.
57. Heyman, E., F.X. Gamelin, M. Goekint, F. Piscitelli, B. Roelands, E. Leclair, V. Di Marzo, and R. Meeusen, *Intense exercise increases circulating endocannabinoid and BDNF levels in humans--possible implications for reward and depression*. *Psychoneuroendocrinology*, 2012. **37**(6): p. 844-51.
58. Feuerecker, M., D. Hauer, R. Toth, F. Demetz, J. Holzl, M. Thiel, I. Kaufmann, G. Schelling, and A. Chouker, *Effects of exercise stress on the endocannabinoid system in humans under field conditions*. *Eur J Appl Physiol*, 2012. **112**(7): p. 2777-81.
59. Raichlen, D.A., A.D. Foster, G.L. Gerdeman, A. Seillier, and A. Giuffrida, *Wired to run: exercise-induced endocannabinoid signaling in humans and cursorial mammals with implications for the 'runner's high'*. *J Exp Biol*, 2012. **215**(Pt 8): p. 1331-6.
60. Galdino, G., T. Romero, J.F. Silva, D. Aguiar, A.M. Paula, J. Cruz, C. Parrella, F. Piscitelli, I. Duarte, V. Di Marzo, and A. Perez, *Acute resistance exercise induces antinociception by activation of the endocannabinoid system in rats*. *Anesth Analg*, 2014. **119**(3): p. 702-15.
61. Galdino, G., T.R. Romero, J.F. Silva, D.C. Aguiar, A.M. de Paula, J.S. Cruz, C. Parrella, F. Piscitelli, I.D. Duarte, V. Di Marzo, and A.C. Perez, *The endocannabinoid system mediates aerobic exercise-induced antinociception in rats*. *Neuropharmacology*, 2014. **77**: p. 313-24.
62. Chaouloff, F., S. Dubreucq, L. Bellocchio, and G. Marsicano, *Endocannabinoids and motor behavior: CB1 receptors also control running activity*. *Physiology (Bethesda)*, 2011. **26**(2): p. 76-7; author reply 78.
63. Keeney, B.K., D.A. Raichlen, T.H. Meek, R.S. Wijeratne, K.M. Middleton, G.L. Gerdeman, and T. Garland, Jr., *Differential response to a selective cannabinoid receptor antagonist (SR141716: rimonabant) in female mice from lines selectively bred for high voluntary wheel-running behaviour*. *Behav Pharmacol*, 2008. **19**(8): p. 812-20.
64. Rasmussen, E.B. and C. Hillman, *Naloxone and rimonabant reduce the reinforcing properties of exercise in rats*. *Exp Clin Psychopharmacol*, 2011. **19**(6): p. 389-400.
65. Dubreucq, S., M. Koehl, D.N. Arous, G. Marsicano, and F. Chaouloff, *CB1 receptor deficiency decreases wheel-running activity: consequences on*

- emotional behaviours and hippocampal neurogenesis*. *Exp Neurol*, 2010. **224**(1): p. 106-13.
66. Hill, M.N., A.K. Titterness, A.C. Morrish, E.J. Carrier, T.T. Lee, J. Gil-Mohapel, B.B. Gorzalka, C.J. Hillard, and B.R. Christie, *Endogenous cannabinoid signaling is required for voluntary exercise-induced enhancement of progenitor cell proliferation in the hippocampus*. *Hippocampus*, 2010. **20**(4): p. 513-23.
 67. Wolf, S.A., A. Bick-Sander, K. Fabel, P. Leal-Galicia, S. Tauber, G. Ramirez-Rodriguez, A. Muller, A. Melnik, T.P. Waltinger, O. Ullrich, and G. Kempermann, *Cannabinoid receptor CB1 mediates baseline and activity-induced survival of new neurons in adult hippocampal neurogenesis*. *Cell Commun Signal*, 2010. **8**: p. 12.
 68. Bligh, J., *A theoretical consideration of the means whereby the mammalian core temperature is defended at a null zone*. *J Appl Physiol* (1985), 2006. **100**(4): p. 1332-7.
 69. *Glossary of terms for thermal physiology. Second edition. Revised by The Commission for Thermal Physiology of the International Union of Physiological Sciences (IUPS Thermal Commission)*. *Pflugers Arch*, 1987. **410**(4-5): p. 567-87.
 70. Madden, C.J., D. Tupone, and S.F. Morrison, *Orexin modulates brown adipose tissue thermogenesis*. *Biomol Concepts*, 2012. **3**(4): p. 381-386.
 71. Burke, S. and M. Hanani, *The actions of hyperthermia on the autonomic nervous system: central and peripheral mechanisms and clinical implications*. *Auton Neurosci*, 2012. **168**(1-2): p. 4-13.
 72. Terrien, J., M. Perret, and F. Aujard, *Behavioral thermoregulation in mammals: a review*. *Front Biosci*, 2011. **16**: p. 1428-44.
 73. Nakamura, K., *Central circuitries for body temperature regulation and fever*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2011. **301**(5): p. R1207-28.
 74. Morrison, S.F. and K. Nakamura, *Central neural pathways for thermoregulation*. *Front Biosci*, 2011. **16**: p. 74-104.
 75. Romanovsky, A.A., *Thermoregulation: some concepts have changed. Functional architecture of the thermoregulatory system*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2007. **292**(1): p. R37-46.
 76. Holtzman, D., R.A. Lovell, J.H. Jaffe, and D.X. Freedman, *1-delta9-tetrahydrocannabinol: neurochemical and behavioral effects in the mouse*. *Science*, 1969. **163**(3874): p. 1464-7.
 77. Lomax, P., *Acute tolerance to the hypothermic effect of marihuana in the rat*. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*, 1971. **2**(2): p. 159-67.
 78. Lomax, P. and C. Campbell, *Phenitron and marihuana induced hypothermia*. *Experientia*, 1971. **27**(10): p. 1191-2.
 79. Sofia, R.D., *A paradoxical effect for 1 -tetrahydrocannabinol on rectal temperature in rats*. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*, 1972. **4**(2): p. 281-8.
 80. Borgen, L.A., G.C. Lott, and W.M. Davis, *Cannabis-induced hypothermia: a dose-effect comparison of crude marihuana extract and synthetic 9 -tetrahydrocannabinol in male and female rats*. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*, 1973. **5**(3): p. 621-6.
 81. Haavik, C.O. and H.F. Hardman, *Hypothermic action of delta 9-tetrahydrocannabinol, 11-hydroxy-delta 9-tetrahydrocannabinol and 11-hydroxy-delta 8-tetrahydrocannabinol in mice*. *Life Sci*, 1973. **13**(12): p. 1771-8.

82. Lawrence, D.K. and R.G. Pertwee, *Brain levels of delta1-tetrahydrocannabinol and its metabolites in mice tolerant to the hypothermic effect of delta1-tetrahydrocannabinol*. Br J Pharmacol, 1973. **49**(2): p. 373-5.
83. Fennessy, M.R. and D.A. Taylor, *The effect of delta9-tetrahydrocannabinol on body temperature and brain amine concentrations in the rat at different ambient temperatures*. Br J Pharmacol, 1977. **60**(1): p. 65-71.
84. Fennessy, M.R. and D.A. Taylor, *Antagonism of the effects on thermoregulation of delta9-tetrahydrocannabinol by clomipramine in the rat*. Br J Pharmacol, 1978. **63**(2): p. 267-73.
85. Malone, D.T. and D.A. Taylor, *Modulation of delta9-tetrahydrocannabinol-induced hypothermia by fluoxetine in the rat*. Br J Pharmacol, 1998. **124**(7): p. 1419-24.
86. Taylor, D.A. and M.R. Fennessy, *Biphasic nature of the effects of delta9-tetrahydrocannabinol on body temperature and brain amines of the rat*. Eur J Pharmacol, 1977. **46**(2): p. 93-9.
87. Fitton, A.G. and R.G. Pertwee, *Changes in body temperature and oxygen consumption rate of conscious mice produced by intrahypothalamic and intracerebroventricular injections of delta 9-tetrahydrocannabinol*. Br J Pharmacol, 1982. **75**(2): p. 409-14.
88. Lichtman, A.H. and B.R. Martin, *Cannabinoid-induced antinociception is mediated by a spinal alpha 2-noradrenergic mechanism*. Brain Res, 1991. **559**(2): p. 309-14.
89. Smith, P.B., D.R. Compton, S.P. Welch, R.K. Razdan, R. Mechoulam, and B.R. Martin, *The pharmacological activity of anandamide, a putative endogenous cannabinoid, in mice*. J Pharmacol Exp Ther, 1994. **270**(1): p. 219-27.
90. Nava, F., G. Carta, and G.L. Gessa, *Permissive role of dopamine D(2) receptors in the hypothermia induced by delta(9)-tetrahydrocannabinol in rats*. Pharmacol Biochem Behav, 2000. **66**(1): p. 183-7.
91. Benamar, K., M. Yondorf, J.J. Meissler, E.B. Geller, R.J. Tallarida, T.K. Eisenstein, and M.W. Adler, *A novel role of cannabinoids: implication in the fever induced by bacterial lipopolysaccharide*. J Pharmacol Exp Ther, 2007. **320**(3): p. 1127-33.
92. Fan, F., D.R. Compton, S. Ward, L. Melvin, and B.R. Martin, *Development of cross-tolerance between delta 9-tetrahydrocannabinol, CP 55,940 and WIN 55,212*. J Pharmacol Exp Ther, 1994. **271**(3): p. 1383-90.
93. Crawley, J.N., R.L. Corwin, J.K. Robinson, C.C. Felder, W.A. Devane, and J. Axelrod, *Anandamide, an endogenous ligand of the cannabinoid receptor, induces hypomotility and hypothermia in vivo in rodents*. Pharmacol Biochem Behav, 1993. **46**(4): p. 967-72.
94. Stein, E.A., S.A. Fuller, W.S. Edgemond, and W.B. Campbell, *Physiological and behavioural effects of the endogenous cannabinoid, arachidonylethanolamide (anandamide), in the rat*. Br J Pharmacol, 1996. **119**(1): p. 107-14.
95. Spina, E., A. Trovati, D. Parolaro, and G. Giagnoni, *A role of nitric oxide in WIN 55,212-2 tolerance in mice*. Eur J Pharmacol, 1998. **343**(2-3): p. 157-63.
96. Costa, B., S. Vailati, and M. Colleoni, *SR 141716A, a cannabinoid receptor antagonist, reverses the behavioural effects of anandamide-treated rats*. Behav Pharmacol, 1999. **10**(3): p. 327-31.
97. Rawls, S.M., J. Cabassa, E.B. Geller, and M.W. Adler, *CB1 receptors in the preoptic anterior hypothalamus regulate WIN 55212-2 [(4,5-dihydro-2-methyl-4(4-morpholinylmethyl)-1-(1-naphthalenyl-carbonyl)-6H-pyrr*

- olo[3,2,1ij]quinolin-6-one]-induced hypothermia. J Pharmacol Exp Ther, 2002. 301(3): p. 963-8.*
98. Rasmussen, B.A., E. Kim, E.M. Unterwald, and S.M. Rawls, *Methanandamide attenuates cocaine-induced hyperthermia in rats by a cannabinoid CB(1)-dopamine D(2) receptor mechanism. Brain Res, 2009.*
 99. Compton, D.R., L.H. Gold, S.J. Ward, R.L. Balster, and B.R. Martin, *Aminoalkylindole analogs: cannabimimetic activity of a class of compounds structurally distinct from delta 9-tetrahydrocannabinol. J Pharmacol Exp Ther, 1992. 263(3): p. 1118-26.*
 100. Compton, D.R., M.D. Aceto, J. Lowe, and B.R. Martin, *In vivo characterization of a specific cannabinoid receptor antagonist (SR141716A): inhibition of delta 9-tetrahydrocannabinol-induced responses and apparent agonist activity. J Pharmacol Exp Ther, 1996. 277(2): p. 586-94.*
 101. McGregor, I.S., F.N. Dastur, R.A. McLellan, and R.E. Brown, *Cannabinoid modulation of rat pup ultrasonic vocalizations. Eur J Pharmacol, 1996. 313(1-2): p. 43-9.*
 102. Ledent, C., O. Valverde, G. Cossu, F. Petitet, J.F. Aubert, F. Beslot, G.A. Bohme, A. Imperato, T. Pedrazzini, B.P. Roques, G. Vassart, W. Fratta, and M. Parmentier, *Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. Science, 1999. 283(5400): p. 401-4.*
 103. Zimmer, A., A.M. Zimmer, A.G. Hohmann, M. Herkenham, and T.I. Bonner, *Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB1 receptor knockout mice. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. 96(10): p. 5780-5.*
 104. Adams, I.B., D.R. Compton, and B.R. Martin, *Assessment of anandamide interaction with the cannabinoid brain receptor: SR 141716A antagonism studies in mice and autoradiographic analysis of receptor binding in rat brain. J Pharmacol Exp Ther, 1998. 284(3): p. 1209-17.*
 105. Fraga, D., C.I. Zanoni, G.A. Rae, C.A. Parada, and G.E. Souza, *Endogenous cannabinoids induce fever through the activation of CB1 receptors. Br J Pharmacol, 2009. 157(8): p. 1494-501.*
 106. Fraga, D., C.I. Zanoni, A.R. Zampronio, C.A. Parada, G.A. Rae, and G.E. Souza, *Endocannabinoids, through opioids and prostaglandins, contribute to fever induced by key pyrogenic mediators. Brain Behav Immun, 2016. 51: p. 204-11.*
 107. Brooks, G.A., C.M. Donovan, and T.P. White, *Estimation of anaerobic energy production and efficiency in rats during exercise. J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol, 1984. 56(2): p. 520-5.*
 108. Refinetti, R., *The circadian rhythm of body temperature. Front Biosci, 2010. 15: p. 564-94.*
 109. Buttner, D. and F. Wollnik, *Spontaneous short-term fluctuations in the daily pattern of heart rate, body temperature and locomotor activity in the laboratory rat. Lab Anim, 1982. 16(4): p. 319-26.*
 110. Sawka, M.N., R.R. Gonzalez, A.J. Young, S.R. Muza, K.B. Pandolf, W.A. Latzka, R.C. Dennis, and C.R. Valeri, *Polycythemia and hydration: effects on thermoregulation and blood volume during exercise-heat stress. Am J Physiol, 1988. 255(3 Pt 2): p. R456-63.*
 111. Wingo, J.E., *Exercise intensity prescription during heat stress: A brief review. Scand J Med Sci Sports, 2015. 25 Suppl 1: p. 90-5.*

112. Lacerda, A.C., U. Marubayashi, C.H. Balthazar, and C.C. Coimbra, *Evidence that brain nitric oxide inhibition increases metabolic cost of exercise, reducing running performance in rats*. *Neurosci Lett*, 2006. **393**(2-3): p. 260-3.
113. Lacerda, A.C., U. Marubayashi, and C.C. Coimbra, *Nitric oxide pathway is an important modulator of heat loss in rats during exercise*. *Brain Res Bull*, 2005. **67**(1-2): p. 110-6.
114. Leite, L.H., A.C. Lacerda, U. Marubayashi, and C.C. Coimbra, *Central angiotensin AT1-receptor blockade affects thermoregulation and running performance in rats*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2006. **291**(3): p. R603-7.
115. Soares, D.D., N.R. Lima, C.C. Coimbra, and U. Marubayashi, *Intracerebroventricular tryptophan increases heating and heat storage rate in exercising rats*. *Pharmacol Biochem Behav*, 2004. **78**(2): p. 255-61.
116. Balthazar, C.H., L.H. Leite, A.G. Rodrigues, and C.C. Coimbra, *Performance-enhancing and thermoregulatory effects of intracerebroventricular dopamine in running rats*. *Pharmacol Biochem Behav*, 2009. **93**(4): p. 465-9.
117. Cheung, S.S. and G.G. Sleivert, *Multiple triggers for hyperthermic fatigue and exhaustion*. *Exerc Sport Sci Rev*, 2004. **32**(3): p. 100-6.
118. Schlader, Z.J., A. Raman, R.H. Morton, S.R. Stannard, and T. Mundel, *Exercise modality modulates body temperature regulation during exercise in uncompensable heat stress*. *Eur J Appl Physiol*, 2011. **111**(5): p. 757-66.
119. Schlader, Z.J., S.R. Stannard, and T. Mundel, *Human thermoregulatory behavior during rest and exercise - a prospective review*. *Physiol Behav*, 2010. **99**(3): p. 269-75.
120. Rodrigues, L.O., A. Oliveira, N.R. Lima, and C.A. Machado-Moreira, *Heat storage rate and acute fatigue in rats*. *Braz J Med Biol Res*, 2003. **36**(1): p. 131-5.
121. Marino, F.E., *Anticipatory regulation and avoidance of catastrophe during exercise-induced hyperthermia*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2004. **139**(4): p. 561-9.
122. Frider, E. and R. Mechoulam, *Pharmacological activity of the cannabinoid receptor agonist, anandamide, a brain constituent*. *Eur J Pharmacol*, 1993. **231**(2): p. 313-4.
123. Frider, E., A. Perchuk, F.S. Hall, G.R. Uhl, and E.S. Onaivi, *Behavioral methods in cannabinoid research*. *Methods Mol Med*, 2006. **123**: p. 269-90.
124. Vinkers, C.H., N.M. de Jong, C.J. Kalkman, K.G. Westphal, R. van Oorschot, B. Olivier, S.M. Korte, and L. Groenink, *Stress-induced hyperthermia is reduced by rapid-acting anxiolytic drugs independent of injection stress in rats*. *Pharmacol Biochem Behav*, 2009. **93**(4): p. 413-8.
125. Vinkers, C.H., L. Groenink, M.J. van Bogaert, K.G. Westphal, C.J. Kalkman, R. van Oorschot, R.S. Oosting, B. Olivier, and S.M. Korte, *Stress-induced hyperthermia and infection-induced fever: two of a kind?* *Physiol Behav*, 2009. **98**(1-2): p. 37-43.
126. Steiner, A.A., A.Y. Molchanova, M.D. Dogan, S. Patel, E. Petervari, M. Balasko, S.P. Wanner, J. Eales, D.L. Oliveira, N.R. Gavva, M.C. Almeida, M. Szekely, and A.A. Romanovsky, *The hypothermic response to bacterial lipopolysaccharide critically depends on brain CB1, but not CB2 or TRPV1, receptors*. *J Physiol*, 2011. **589**(Pt 9): p. 2415-31.
127. Cristino, L., L. de Petrocellis, G. Pryce, D. Baker, V. Guglielmotti, and V. Di Marzo, *Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and vanilloid*

- transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse brain.* Neuroscience, 2006. **139**(4): p. 1405-15.
128. Herkenham, M., A.B. Lynn, M.D. Little, M.R. Johnson, L.S. Melvin, B.R. de Costa, and K.C. Rice, *Cannabinoid receptor localization in brain.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(5): p. 1932-6.
 129. Howlett, A.C., F. Barth, T.I. Bonner, G. Cabral, P. Casellas, W.A. Devane, C.C. Felder, M. Herkenham, K. Mackie, B.R. Martin, R. Mechoulam, and R.G. Pertwee, *International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors.* Pharmacol Rev, 2002. **54**(2): p. 161-202.
 130. Mackie, K., *Cannabinoid receptor homo- and heterodimerization.* Life Sci, 2005. **77**(14): p. 1667-73.
 131. Boulant, J.A., *Role of the preoptic-anterior hypothalamus in thermoregulation and fever.* Clin Infect Dis, 2000. **31 Suppl 5**: p. S157-61.
 132. Nagashima, K., S. Nakai, M. Tanaka, and K. Kanosue, *Neuronal circuitries involved in thermoregulation.* Auton Neurosci, 2000. **85**(1-3): p. 18-25.
 133. Coyle, E.F., *Physical activity as a metabolic stressor.* Am J Clin Nutr, 2000. **72**(2 Suppl): p. 512S-20S.
 134. Webb, P., *The physiology of heat regulation.* Am J Physiol, 1995. **268**(4 Pt 2): p. R838-50.
 135. Balthazar, C.H., L.H. Leite, R.M. Ribeiro, D.D. Soares, and C.C. Coimbra, *Effects of blockade of central dopamine D1 and D2 receptors on thermoregulation, metabolic rate and running performance.* Pharmacol Rep, 2010. **62**(1): p. 54-61.
 136. Oleson, E.B. and J.F. Cheer, *A brain on cannabinoids: the role of dopamine release in reward seeking.* Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(8).
 137. Solinas, M., S.R. Goldberg, and D. Piomelli, *The endocannabinoid system in brain reward processes.* Br J Pharmacol, 2008. **154**(2): p. 369-83.
 138. El Khoury, M.A., V. Gorgievski, L. Moutsimilli, B. Giros, and E.T. Tzavara, *Interactions between the cannabinoid and dopaminergic systems: evidence from animal studies.* Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2012. **38**(1): p. 36-50.
 139. Patel, N.A., R.L. Moldow, J.A. Patel, G. Wu, and S.L. Chang, *Arachidonylethanolamide (AEA) activation of FOS proto-oncogene protein immunoreactivity in the rat brain.* Brain Res, 1998. **797**(2): p. 225-33.
 140. McGregor, I.S., J.C. Arnold, M.F. Weber, A.N. Topples, and G.E. Hunt, *A comparison of delta 9-THC and anandamide induced c-fos expression in the rat forebrain.* Brain Res, 1998. **802**(1-2): p. 19-26.
 141. Wenger, T., K.A. Jamali, C. Juaneda, J. Leonardelli, and G. Tramu, *Arachidonyl ethanolamide (anandamide) activates the parvocellular part of hypothalamic paraventricular nucleus.* Biochem Biophys Res Commun, 1997. **237**(3): p. 724-8.
 142. Wenger, T., C. Ledent, and G. Tramu, *The endogenous cannabinoid, anandamide, activates the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in CB1 cannabinoid receptor knockout mice.* Neuroendocrinology, 2003. **78**(6): p. 294-300.
 143. Saito, T. and H. Soya, *Delineation of responsive AVP-containing neurons to running stress in the hypothalamus.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2004. **286**(3): p. R484-90.
 144. Soya, H., A. Mukai, C.C. Deocaris, N. Ohiwa, H. Chang, T. Nishijima, T. Fujikawa, K. Togashi, and T. Saito, *Threshold-like pattern of neuronal activation*

- in the hypothalamus during treadmill running: establishment of a minimum running stress (MRS) rat model.* *Neurosci Res*, 2007. **58**(4): p. 341-8.
145. Yanagita, S., S. Amemiya, S. Suzuki, and I. Kita, *Effects of spontaneous and forced running on activation of hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurons in rats.* *Life Sci*, 2007. **80**(4): p. 356-63.
 146. Barna, B.F., A.C. Takakura, and T.S. Moreira, *Pontomedullary and hypothalamic distribution of Fos-like immunoreactive neurons after acute exercise in rats.* *Neuroscience*, 2012. **212**: p. 120-30.
 147. Foley, T.E., L.R. Brooks, L.J. Gilligan, P.R. Burghardt, L.G. Koch, S.L. Britton, and M. Fleshner, *Brain activation patterns at exhaustion in rats that differ in inherent exercise capacity.* *PLoS One*, 2012. **7**(9): p. e45415.
 148. Nunez, P., B. Diaz, C. Perillan, M. Vijande, and J. Arguelles, *Progressive training effects on neuronal hypothalamic activation in the rat.* *Neurosci Lett*, 2012. **517**(2): p. 113-7.
 149. Timofeeva, E., Q. Huang, and D. Richard, *Effects of treadmill running on brain activation and the corticotropin-releasing hormone system.* *Neuroendocrinology*, 2003. **77**(6): p. 388-405.
 150. Lima, P.M., H.P. Santiago, R.E. Szawka, and C.C. Coimbra, *Central blockade of nitric oxide transmission impairs exercise-induced neuronal activation in the PVN and reduces physical performance.* *Brain Res Bull*, 2014. **108**: p. 80-7.
 151. McKittrick, D.J., *Expression of fos in the hypothalamus of rats exposed to warm and cold temperatures.* *Brain Res Bull*, 2000. **53**(3): p. 307-15.
 152. Yoshida, K., M. Maruyama, T. Hosono, K. Nagashima, Y. Fukuda, R. Gerstberger, and K. Kanosue, *Fos expression induced by warming the preoptic area in rats.* *Brain Res*, 2002. **933**(2): p. 109-17.
 153. Bratincsak, A. and M. Palkovits, *Activation of brain areas in rat following warm and cold ambient exposure.* *Neuroscience*, 2004. **127**(2): p. 385-97.
 154. Kiyohara, T., S. Miyata, T. Nakamura, O. Shido, T. Nakashima, and M. Shibata, *Differences in Fos expression in the rat brains between cold and warm ambient exposures.* *Brain Res Bull*, 1995. **38**(2): p. 193-201.
 155. Harikai, N., K. Tomogane, T. Sugawara, and S. Tashiro, *Differences in hypothalamic Fos expressions between two heat stress conditions in conscious mice.* *Brain Res Bull*, 2003. **61**(6): p. 617-26.
 156. Scammell, T.E., K.J. Price, and S.M. Sagar, *Hyperthermia induces c-fos expression in the preoptic area.* *Brain Res*, 1993. **618**(2): p. 303-7.
 157. Bachtell, R.K., N.O. Tsivkovskaia, and A.E. Ryabinin, *Identification of temperature-sensitive neural circuits in mice using c-Fos expression mapping.* *Brain Res*, 2003. **960**(1-2): p. 157-64.
 158. Swanson, L.W. and H.G. Kuypers, *The paraventricular nucleus of the hypothalamus: cytoarchitectonic subdivisions and organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex, and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence double-labeling methods.* *J Comp Neurol*, 1980. **194**(3): p. 555-70.
 159. Cham, J.L. and E. Badoer, *Hypothalamic paraventricular nucleus is critical for renal vasoconstriction elicited by elevations in body temperature.* *Am J Physiol Renal Physiol*, 2008. **294**(2): p. F309-15.
 160. Chen, F., M. Dworak, Y. Wang, J.L. Cham, and E. Badoer, *Role of the hypothalamic PVN in the reflex reduction in mesenteric blood flow elicited by hyperthermia.* *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2008. **295**(6): p. R1874-81.

161. Badoer, E., *Role of the hypothalamic PVN in the regulation of renal sympathetic nerve activity and blood flow during hyperthermia and in heart failure*. Am J Physiol Renal Physiol, 2010. **298**(4): p. F839-46.
162. Inenaga, K., T. Osaka, and H. Yamashita, *Thermosensitivity of neurons in the paraventricular nucleus of the rat slice preparation*. Brain Res, 1987. **424**(1): p. 126-32.
163. Kanosue, K., R. Matsuo, H. Tanaka, and T. Nakayama, *Effect of body temperature on salivary reflexes in rats*. J Auton Nerv Syst, 1986. **16**(3): p. 233-7.
164. Kanosue, K., M. Yanase-Fujiwara, and T. Hosono, *Hypothalamic network for thermoregulatory vasomotor control*. Am J Physiol, 1994. **267**(1 Pt 2): p. R283-8.
165. Kazuyuki, K., T. Hosono, Y.H. Zhang, and X.M. Chen, *Neuronal networks controlling thermoregulatory effectors*. Prog Brain Res, 1998. **115**: p. 49-62.
166. Owens, N.C., Y. Ootsuka, K. Kanosue, and R.M. McAllen, *Thermoregulatory control of sympathetic fibres supplying the rat's tail*. J Physiol, 2002. **543**(Pt 3): p. 849-58.
167. Kregel, K.C., P.T. Wall, and C.V. Gisolfi, *Peripheral vascular responses to hyperthermia in the rat*. J Appl Physiol (1985), 1988. **64**(6): p. 2582-8.
168. Cham, J.L. and E. Badoer, *Exposure to a hot environment can activate rostral ventrolateral medulla-projecting neurones in the hypothalamic paraventricular nucleus in conscious rats*. Exp Physiol, 2008. **93**(1): p. 64-74.
169. Dampney, R., *Medullary pathways regulating sympathetic outflow: the need for more lateral thinking*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2004. **286**(3): p. R446-8.
170. Leite, L.H., H. Zheng, C.C. Coimbra, and K.P. Patel, *Contribution of the paraventricular nucleus in autonomic adjustments to heat stress*. Exp Biol Med (Maywood), 2012. **237**(5): p. 570-7.
171. Kobayashi, S., *Warm- and cold-sensitive neurons inactive at normal core temperature in rat hypothalamic slices*. Brain Res, 1986. **362**(1): p. 132-9.
172. Chevront, S.N., R. Carter, 3rd, and M.N. Sawka, *Fluid balance and endurance exercise performance*. Curr Sports Med Rep, 2003. **2**(4): p. 202-8.
173. Doris, P.A., *Vasopressin and the regulation of evaporative water loss and body temperature in the cat*. Brain Res, 1982. **251**(1): p. 127-36.
174. Jasnica, N., J. Djordjevic, P. Vujovic, I. Lakic, S. Djurasevic, and G. Cvijic, *The effect of vasopressin 1b receptor (V1bR) blockade on HPA axis activity in rats exposed to acute heat stress*. J Exp Biol, 2013. **216**(Pt 12): p. 2302-7.
175. Santiago, H.P., L.H. Leite, P.M. Lima, G.V. Rodovalho, R.E. Szawka, and C.C. Coimbra, *The improvement of exercise performance by physical training is related to increased hypothalamic neuronal activation*. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 2015. **43**(1): p. 116-24.
176. McLaughlin, C.R. and M.E. Abood, *Developmental expression of cannabinoid receptor mRNA*. Brain Res Dev Brain Res, 1993. **76**(1): p. 75-8.
177. McLaughlin, C.R., B.R. Martin, D.R. Compton, and M.E. Abood, *Cannabinoid receptors in developing rats: detection of mRNA and receptor binding*. Drug Alcohol Depend, 1994. **36**(1): p. 27-31.
178. Rodriguez de Fonseca, F., J.A. Ramos, A. Bonnini, and J.J. Fernandez-Ruiz, *Presence of cannabinoid binding sites in the brain from early postnatal ages*. Neuroreport, 1993. **4**(2): p. 135-8.

179. Gomes da Silva, S., B.H. Araujo, A.C. Cossa, F.A. Scorza, E.A. Cavalheiro, G. Naffah-Mazzacoratti Mda, and R.M. Arida, *Physical exercise in adolescence changes CB1 cannabinoid receptor expression in the rat brain*. *Neurochem Int*, 2010. **57**(5): p. 492-6.
180. Chambers, R.A., J.R. Taylor, and M.N. Potenza, *Developmental neurocircuitry of motivation in adolescence: a critical period of addiction vulnerability*. *Am J Psychiatry*, 2003. **160**(6): p. 1041-52.
181. Spear, L.P., *Adolescent brain development and animal models*. *Ann N Y Acad Sci*, 2004. **1021**: p. 23-6.
182. Thompson, P.D., S.F. Crouse, B. Goodpaster, D. Kelley, N. Moyna, and L. Pescatello, *The acute versus the chronic response to exercise*. *Med Sci Sports Exerc*, 2001. **33**(6 Suppl): p. S438-45; discussion S452-3.
183. Marco, E.M., T. Rubino, W. Adriani, M.P. Viveros, D. Parolaro, and G. Laviola, *Long-term consequences of URB597 administration during adolescence on cannabinoid CB1 receptor binding in brain areas*. *Brain Res*, 2009. **1257**: p. 25-31.
184. Breivogel, C.S., S.R. Childers, S.A. Deadwyler, R.E. Hampson, L.J. Vogt, and L.J. Sim-Selley, *Chronic delta9-tetrahydrocannabinol treatment produces a time-dependent loss of cannabinoid receptors and cannabinoid receptor-activated G proteins in rat brain*. *J Neurochem*, 1999. **73**(6): p. 2447-59.
185. Sim-Selley, L.J. and B.R. Martin, *Effect of chronic administration of R-(+)-[2,3-Dihydro-5-methyl-3-[(morpholinyl)methyl]pyrrolo[1,2,3-de]-1,4-benzoxazinyl]- (1-naphthalenyl)methanone mesylate (WIN55,212-2) or delta(9)-tetrahydrocannabinol on cannabinoid receptor adaptation in mice*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002. **303**(1): p. 36-44.
186. Romero, J., L. Garcia, J.J. Fernandez-Ruiz, M. Cebeira, and J.A. Ramos, *Changes in rat brain cannabinoid binding sites after acute or chronic exposure to their endogenous agonist, anandamide, or to delta 9-tetrahydrocannabinol*. *Pharmacol Biochem Behav*, 1995. **51**(4): p. 731-7.
187. Ferreira-Vieira, T.H., C.P. Bastos, G.S. Pereira, F.A. Moreira, and A.R. Massensini, *A role for the endocannabinoid system in exercise-induced spatial memory enhancement in mice*. *Hippocampus*, 2014. **24**(1): p. 79-88.
188. Berger, A., G. Crozier, T. Bisogno, P. Cavaliere, S. Innis, and V. Di Marzo, *Anandamide and diet: inclusion of dietary arachidonate and docosahexaenoate leads to increased brain levels of the corresponding N-acyl ethanolamines in piglets*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(11): p. 6402-6.
189. Watanabe, S., M. Doshi, and T. Hamazaki, *n-3 Polyunsaturated fatty acid (PUFA) deficiency elevates and n-3 PUFA enrichment reduces brain 2-arachidonoylglycerol level in mice*. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2003. **69**(1): p. 51-9.
190. Matias, I., M. Leonhardt, J. Lesage, L. De Petrocellis, J.P. Dupouy, D. Vieau, and V. Di Marzo, *Effect of maternal under-nutrition on pup body weight and hypothalamic endocannabinoid levels*. *Cell Mol Life Sci*, 2003. **60**(2): p. 382-9.
191. Oscai, L.B., *Dietary-induced severe obesity: a rat model*. *Am J Physiol*, 1982. **242**(3): p. R212-5.
192. de Lima, D.C., S.A. Silveira, A.S. Haibara, and C.C. Coimbra, *The enhanced hyperglycemic response to hemorrhage hypotension in obese rats is related to an impaired baroreflex*. *Metab Brain Dis*, 2008. **23**(4): p. 361-73.
193. Manco, M., A. Bertuzzi, S. Salinari, A. Scarfone, M. Calvani, A.V. Greco, and G. Mingrone, *The ingestion of saturated fatty acid triacylglycerols acutely affects*

- insulin secretion and insulin sensitivity in human subjects.* Br J Nutr, 2004. **92**(6): p. 895-903.
194. Manco, M., M. Calvani, and G. Mingrone, *Effects of dietary fatty acids on insulin sensitivity and secretion.* Diabetes Obes Metab, 2004. **6**(6): p. 402-13.
 195. Harrold, J.A., J.C. Elliott, P.J. King, P.S. Widdowson, and G. Williams, *Down-regulation of cannabinoid-1 (CB-1) receptors in specific extrahypothalamic regions of rats with dietary obesity: a role for endogenous cannabinoids in driving appetite for palatable food?* Brain Res, 2002. **952**(2): p. 232-8.
 196. Timofeeva, E., E.D. Baraboi, A.M. Poulin, and D. Richard, *Palatable high-energy diet decreases the expression of cannabinoid type 1 receptor messenger RNA in specific brain regions in the rat.* J Neuroendocrinol, 2009. **21**(12): p. 982-92.
 197. South, T. and X.F. Huang, *Temporal and site-specific brain alterations in CB1 receptor binding in high fat diet-induced obesity in C57Bl/6 mice.* J Neuroendocrinol, 2008. **20**(11): p. 1288-94.
 198. Rubino, T., P. Massi, G. Patrini, I. Venier, G. Giagnoni, and D. Parolaro, *Chronic CP-55,940 alters cannabinoid receptor mRNA in the rat brain: an in situ hybridization study.* Neuroreport, 1994. **5**(18): p. 2493-6.
 199. Rubino, T., G. Patrini, M. Parenti, P. Massi, and D. Parolaro, *Chronic treatment with a synthetic cannabinoid CP-55,940 alters G-protein expression in the rat central nervous system.* Brain Res Mol Brain Res, 1997. **44**(2): p. 191-7.

9 – ANEXO