

Rafael Silva Valle de Almeida

**AÇÃO DA ANGIOTENSINA II CENTRAL SOBRE O BALANÇO
TÉRMICO E O DESEMPENHO FÍSICO**

EEFFTO/UFMG

Belo Horizonte

2012

Rafael Silva Valle de Almeida

AÇÃO DA ANGIOTENSINA II CENTRAL SOBRE O BALANÇO TÉRMICO E O DESEMPENHO FÍSICO

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências dos Esportes da Faculdade de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências dos Esportes com área de concentração em Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Cândido Celso Coimbra

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Laura Hora Rios Leite

Belo Horizonte

2012

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, na vigência dos auxílios concedidos pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenadoria de Apoio ao Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Pró-Reitoria de Pesquisa da UFMG (PRPq).

AGRADECIMENTOS

À minha família pelo amor e incentivo.

À Bruna Emanuela pelo carinho, companheirismo e dedicação.

Ao meu orientador Prof. Cândido Celso Coimbra pelo incentivo, pela paciência e pela excelente orientação na realização deste trabalho.

À minha co-orientadora Prof^a Laura Hora Rios Leite pelos conhecimentos compartilhados e pela boa vontade em contribuir com a realização do projeto.

A todos os colegas do Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos da ativação de vias angiotensinérgicas sobre o desempenho e a relação entre o balanço térmico e a determinação da fadiga em ratos não treinados submetidos ao exercício físico. Foram utilizados ratos Wistar com peso entre 250 e 350g. Os animais foram implantados com cânula guia no ventrículo cerebral lateral direito para administração de solução de angiotensina II (ANG II) através da injeção intracerebroventricular (icv) nas doses de 0,25 µg, 1 µg, 2 µg e 4 µg ou de Salina (n = 8). Os animais passaram por pelo menos 3 situações experimentais. A temperatura corporal interna (T_c) foi determinada por telemetria através de um sensor de temperatura implantado na cavidade intraperitoneal do animal e a temperatura da cauda (T_{cauda}) foi determinada através de um sensor de temperatura fixado à cauda do animal. Ambas as temperaturas foram medidas continuamente enquanto os animais realizaram exercício físico submáximo em esteira metabólica para roedores, a uma velocidade de 18m/min e 5% de inclinação, até a fadiga. Os resultados mostraram que a disponibilidade central de ANG II apresenta a característica de uma curva dose-resposta com formato de U invertido. Houve uma relação positiva e crescente entre a dose de ANG II e o desempenho físico observada até a dose de 2 µg. Entretanto uma relação negativa foi observada entre a dose de 4 µg e o desempenho físico. A partir dos dados obtidos foram calculados: taxa de aquecimento corporal (BHR), taxa de acúmulo de calor (HSR), limiar de temperatura corporal interna para vasodilatação cutânea (TT_cV) e o trabalho realizado (W). A administração icv de ANG II 2 µg induziu aumento do tempo de exercício (TE) (Salina: $16,95 \pm 1,9$ min vs ANG II 2 µg: $27,32 \pm 0,28$ min, $p < 0,05$) e W (Salina: $5,22 \pm 0,47$ Kgm vs ANG II 2 µg: $8,18 \pm 0,47$ Kgm, $p < 0,05$) comparado ao grupo controle. Em contrapartida, a administração icv de ANG II 4 µg provocou redução no TE (Salina: $16,95 \pm 1,9$ min vs ANG II 4 µg: $10,24 \pm 1,49$ min, $p < 0,05$) e W (Salina: $5,22 \pm 0,47$ Kgm vs ANG II 4 µg: $2,26 \pm 0,38$ Kgm, $p < 0,05$) comparado ao grupo controle. Esta redução se mostrou relacionada à elevação significativa da BHR (Salina: $0,03 \pm 0,01$ °C/min vs ANG II 4µg: $0,07 \pm 0,01$ °C/min, $p < 0,05$), da HSR (Salina: $8,67 \pm 0,93$ cal/min vs ANG II 4µg: $21,16 \pm 1,06$ cal/min, $p < 0,05$) e do TT_cV (Salina: $37,85 \pm 0,03$ °C vs

ANG II 4 μ g: 38,28 \pm 0,04 $^{\circ}$ C, p < 0,05) e maior elevação na T_c comparado ao grupo controle. Estes resultados sugerem que a maior disponibilidade central de ANG II provoca efeitos distintos durante o exercício físico conforme a dose administrada, assumindo um comportamento de curva em U invertido. Apesar da administração de doses intermediárias de ANG II resultar em melhora do desempenho físico a mais alta dose administrada provocou redução do desempenho físico relacionada ao aumento acentuado da T_c, da BHR e da HSR, todos decorrentes da menor capacidade de dissipar calor.

Palavras chave: Angiotensina II, termorregulação, exercício físico, fadiga.

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the effects of increased central nervous system availability of angiotensin II (ANG II) over exercise performance and the relationship between the thermal balance and determination of fatigue in untrained rats subjected to physical exercise. Wistar rats weighing between 250 and 350g. The animals were implanted with a guide cannula in the right lateral ventricle for administration of ANGII by intracerebroventricular injection (icv) at doses of 0,25 μg , 1 μg , 2 μg e 4 μg or Saline (n = 8). The animals spent at least 3 experimental situations. The internal body temperature (T_b) was determined by telemetry via temperature sensor implanted in the animal's intraperitoneal cavity. The tail temperature (T_{tail}) was measured using a temperature sensor attached to the animal's tail. Both temperatures were measured continuously while the animals performed a submaximal exercise in a rodent metabolic treadmill, at a speed of 18m/min and 5% inclination, until failure. The results showed that the central availability of ANG II induced a dose-response curve with an inverted U shape. There was a positive relationship between the increasing dose of ANG II and physical performance observed up to a dose of 2 μg . However a negative relationship was observed between the dose of 4 μg and physical performance. From the data obtained were calculated: body heat storage (BHR), heat storage rate (HSR), body temperature threshold for vasodilation (TT_{bV}), exercise time (ET) and work (W). The icv administration of ANG II 2 μg induced an increase in ET (Salina: 16.95 ± 1.9 min vs. ANG II 2 μg : 27.32 ± 0.28 min, $p < 0.05$) and W (Salina: $5,22 \pm 0.47$ vs. ANG II 2 μg Kgm: 8.18 ± 0.47 Kgm, $p < 0.05$) compared to the control group. The icv administration of ANG II 4 μg caused significant reductions in ET (Salina: 16.95 ± 1.9 min vs. ANG II 4 μg : 10.24 ± 1.49 min, $p < 0.05$) and W (Salina: $5, 22 \pm 0.47$ vs. ANG II 4 μg Kgm: 2.26 ± 0.38 Kgm, $p < 0.05$) compared to the control group. This reduction is related to the significant increase shown in the BHR (Saline: 0.03 ± 0.01 °C / min vs. Ang II 4 μg : 0.07 ± 0.01 °C / min, $p < 0.05$), HSR (Salina: 8.67 ± 0.93 cal / min vs ANG II 4 μg : 21.16 ± 1.06 cal / min, $p < 0.05$), TT_{bV} (Salina: 37.85 ± 0.03 °C vs ANG 4 μg II: 38.28 ± 0.04 °C, $p < 0.05$) and higher elevation in T_b compared to the control group. These results suggest that the availability central ANG II causes distinct

effects during exercise depending on the administered dose, assuming a behavior of inverted U-shaped curve. In intermediate doses causes an increase in performance demonstrated by increased time to fatigue, possibly related to other factors besides the central thermoregulation. At high doses, the central ANG II causes a reduction in performance related to the sharp increase in T_b , BHR, HSR and TT_bV , but without changes in T_{tail} , indicating that these changes are related to the increase in heat produced during exercise.

Keywords: angiotensin II, thermoregulation, exercise, fatigue.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- GRÁFICO 1. Efeito da injeção icv de 2µL de ANG II [0,25µg, n = 3 (Círculo preto vazado); 1µg, n = 3 (Círculo cinza); 2µg, n = 5 (Círculo cinza escuro); 4µg, n = 5(Círculo Preto)] ou de 0,15 M NaCl [Salina, n = 8 (Círculo vazado)] sobre o desempenho durante um exercício físico até a fadiga em esteira a uma velocidade de 18m/min e 5% de inclinação.27
- GRÁFICO 2. Efeito da injeção intracerebroventricular de 2µL de ANG II (2µg; 4µg) ou de Salina no tempo total de exercício até a fadiga e sobre o trabalho realizado (n = 5).29
- GRÁFICO 3. Efeito da injeção icv de 2 µL de ANG II (2µg; 4µg) ou Salina na variação (delta) da temperatura corporal interna (Tc) (GRÁFICO 3A) e da temperatura da cauda (Tcauda) (GRÁFICO 3B) durante o exercício até a fadiga (n = 5).31
- GRÁFICO 4. Efeito da injeção icv de 2 µL de ANG II (2µg; 4µg) ou de Salina sobre a taxa de aquecimento corporal (BHR) (GRÁFICO 4A) e a taxa de acúmulo de calor (HSR) (GRÁFICO 4B) durante o exercício até a fadiga (n = 5).33
- GRÁFICO 5. Correlações entre BHR e TTE (GRÁFICO 5A) e HSR e TTE (GRÁFICO 5B). Salina: círculo vazado; ANG II 2µg: círculo cinza; ANG II 4µg: círculo preto; Média ANG II 2µg: quadrado cinza; Média ANG II 4µg: quadrado preto (n = 5).35
- GRÁFICO 6. Efeito da injeção icv de 2 µL de ANG II (2µg; 4µg) ou de Salina sobre o limiar de vasodilatação da cauda (TTcV) durante o exercício até a fadiga (n = 5). ..37
- GRÁFICO 7. Correlações entre BHR e TTcV (GRÁFICO 7A) e HSR e TTcV (GRÁFICO 7B). Salina: círculo vazado; ANG II 2µg: círculo cinza; ANG II 4µg: círculo preto (n = 5).....39
- GRÁFICO 8. Razão entre o calor acumulado (HS) e o trabalho realizado (W) (GRÁFICO 8A) e correlação entre HS/W e TE (GRÁFICO 8B).41

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	12
1.1 - Regulação da temperatura corporal interna	12
1.2 - Regulação da temperatura corporal interna durante o exercício físico até a fadiga	15
1.3 - O Sistema Renina-Angiotensina e a termorregulação durante o exercício físico	17
1.4 - Objetivo	20
1.5 - Objetivo específico.....	20
2 - MATERIAIS E MÉTODOS	21
2.1 - Animais	21
2.2 - Procedimentos cirúrgicos	21
2.2.1 - Canulação central	21
2.2.2 - Implante do sensor de temperatura	22
2.3 - Temperaturas ambiente, corporal e da cauda.....	23
2.4 - Exercício físico	23
2.5 - Procedimento experimental.....	24
2.6 - Cálculos	25
2.7 - Análise estatística	26
3 - RESULTADOS	27
3.1 - Efeito da injeção icv de ANG II (0,25µg; 1µg; 2µg; 4µg) sobre o desempenho durante o exercício físico até a fadiga.....	27
3.2 - Efeito da injeção icv de ANG II (2µg; 4µg) sobre o tempo de exercício (TE) e sobre o trabalho (W) durante o exercício físico até a fadiga	29
3.3 - Efeito da injeção icv de ANG II (2µg; 4µg) sobre a temperatura corporal interna (T _c) e da temperatura da cauda (T _{cauda}) durante o exercício físico até a fadiga	31

3.4 - Efeito da injeção icv de ANG II (2µg; 4µg) sobre a taxa de aquecimento corporal (BHR) e a taxa de acúmulo de calor (HSR) durante o exercício físico até a fadiga ..	33
3.5 - Correlação entre taxa de aquecimento corporal (BHR), taxa de acúmulo de calor (HSR) e o desempenho físico durante o exercício até a fadiga.....	35
3.6 - Efeito da injeção icv de ANG II (2µg; 4µg) sobre o limiar de vasodilatação da cauda (TT _c V) durante o exercício físico até a fadiga.....	37
3.7 - Correlação entre taxa de aquecimento corporal (BHR), a taxa de acúmulo de calor (HSR) e o limiar de vasodilatação da cauda (TT _c V) durante o exercício físico até a fadiga.....	39
3.8 - Efeito da injeção icv de ANG II (2µg; 4µg) sobre a relação entre o calor acumulado e o trabalho realizado (HS/W) durante o exercício físico até a fadiga ...	41
4 - DISCUSSÃO	43
5 - CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS	49
APÊNDICE	53
TABELA 1 - Média (± EPM) da variação da temperatura corporal interna (T _c) em °C durante o exercício físico até a fadiga.....	53
TABELA 2 - Média (± EPM) da variação da temperatura da cauda (T _{cauda}) em °C durante o exercício físico até a fadiga.....	54
TABELA 3 - Média (± EPM) da Taxa de aquecimento corporal (BHR) e Taxa de acúmulo de calor (HSR) durante o exercício físico até a fadiga.....	55

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - REGULAÇÃO DA TEMPERATURA CORPORAL INTERNA

A temperatura corporal interna (T_c) é um sinal vital que se refere à temperatura dos órgãos internos, principalmente vísceras e encéfalo. Em animais homeotérmicos este valor apresenta pouca variação ($\pm 1^\circ\text{C}$) devido aos ajustes circulatórios e alterações na dissipação de calor. De fato, a termodinâmica corporal é assimétrica, ou seja, a temperatura média corporal está posicionada próxima ao limite superior de tolerância para a sobrevivência, o que pode ser determinado pela desnaturação de proteínas regulatórias. Desse modo, o aquecimento corporal ameaça mais a sobrevivência do que o resfriamento. Principalmente considerando o caso dos animais endotérmicos, que produzem calor a partir do próprio metabolismo corporal (ROMANOVSKY, 2007).

Em ratos o valor basal da T_c varia entre 37°C e 38°C e sofre influência do ciclo circadiano sendo que no período noturno, que corresponde ao período de maior atividade dos animais, quando os maiores valores são atingidos. Além disso, a T_c responde rapidamente quando os animais são confrontados com situações de estresse, como por exemplo o manuseio, que pode elevar a T_c por tempo prolongado (BRIESE, 1998).

Tanto em ambientes frios como em ambientes quentes, a T_c em animais homeotérmicos é regulada através da integração entre mecanismos autonômicos e comportamentais. Embora os mecanismos autonômicos sejam vitais e eficazes, os mecanismos de termorregulação comportamentais são essenciais para a adequação da T_c e permitem, por exemplo, que humanos sejam expostos à temperaturas extremamente baixas como a superfície da lua ou extremamente altas como o ar ao redor de uma cápsula espacial quando entra em contato com a atmosfera terrestre, cerca de 2000°C (NAGASHIMA, 2006; ROMANOVSKY, 2007).

Os mecanismos de termorregulação autonômicos podem ser divididos entre aqueles responsáveis pela produção de calor e aqueles responsáveis pela sua dissipação. A produção de calor ocorre principalmente em decorrência do metabolismo celular (RICQUIER, 2006). Frente à exposição ao frio, o mecanismo de termogênese por tremor eleva a atividade muscular esquelética e assim, a produção de calor. Além deste mecanismo, a mobilização e utilização de substratos calorigênicos intensifica a produção de calor, caracterizando o mecanismo de termogênese sem tremor, sendo que nos roedores este último ocorre em tecidos especializados como o tecido adiposo marrom (NAGASHIMA, 2000). A perda de calor é determinada principalmente por dois fatores: através da perda evaporativa, por exemplo, pela sudorese em humanos e pela salivação nos roedores, e pela perda não evaporativa que possibilita a dissipação de calor dos tecidos centrais para a periferia através da vasodilatação cutânea (STOCKS *et al.*, 2004). Estas respostas variam de acordo com a temperatura do ambiente (T_a) no qual o animal se encontra e mantêm uma relação de equilíbrio dinâmico entre a produção e a dissipação de calor. Em outras palavras, alterações na T_a induzem alterações como a ativação ou inibição de mecanismos de produção e dissipação de calor. Além dos mecanismos acima citados, tanto a dissipação quanto a conservação do calor podem acontecer de maneira passiva com o ambiente através da condução, convecção e radiação (NAGASHIMA, 2000).

Em ratos, além dos mecanismos de regulação autonômica, o controle da temperatura depende de mecanismos comportamentais. Nestes animais os primeiros traços destes mecanismos ocorrem logo na primeira semana de nascimento. Ratos recém-nascidos tratados com noradrenalina, que estimula a termogênese a partir do tecido adiposo marrom, buscam locais do ambiente onde a temperatura é mais baixa e assumem uma posição corporal onde a superfície corporal fica mais exposta, permitindo maior conforto térmico (FARRELL; ALBERTS, 2007). A perda de calor não evaporativo através de mecanismos autonômicos em ratos se dá principalmente através da cauda, onde o aumento do fluxo sanguíneo provocado pela vasodilatação periférica facilita a dissipação do calor. Esta resposta é induzida por neurônios sensíveis ao calor e ao frio, presentes no sistema nervoso central (NAGASHIMA, 2006).

Nos mamíferos, as áreas do sistema nervoso central que são ativadas por alterações na T_a e que mediam as respostas termorregulatórias a estas alterações estão localizadas principalmente no hipotálamo. A área pré-óptica e o hipotálamo anterior (POA/AH) têm sido apontados como os sítios primários de integração de sinais térmicos originados em diferentes locais do corpo (GORDON, 1990). Nestes centros controladores estão presentes os neurônios sensíveis ao calor e ao frio que atuam como sensores térmicos e respondem às oscilações de temperatura, sendo os neurônios sensíveis ao calor os principais efetores tanto da perda quanto da produção de calor. Estes neurônios geram sinais excitatórios para a dissipação de calor e inibitórios para a produção de calor através do bloqueio dos neurônios sensíveis ao frio (BOULAND, 2000; NAGASHIMA, 2006; ROMANOVSKY, 2007).

Além de processar informações provenientes dos sensores térmicos centrais, a POA/AH também recebe informações a partir de termorreceptores, ou neurônios termosensíveis periféricos, que detectam a temperatura na pele e mucosas oral e urogenital. A maior parte destes receptores é sensível ao frio, o que seria esperado diante da especialização dos receptores centrais nas respostas ao aquecimento. Frente à redução da T_a estes receptores aumentam sua frequência de disparo enviando seus sinais através de fibras mielinizadas (McCLESKEY, 1997). Em camadas mais profundas da derme estão localizados em menor quantidade sensores sensíveis ao calor, que enviam seus sinais através de fibras não mielinizadas. A informação gerada nos receptores periféricos ascende para sistema nervoso central através do sistema somatosensorial, via trato espinotalâmico que converge a informação para o córtex passando pelo corno dorsal da medula espinhal e para a POA/AH através da formação reticular. As respostas termorregulatórias são desencadeadas quando a exposição a alterações térmicas é suficiente para afetar a troca de calor entre o corpo e o ambiente. A regulação da T_c através destes sensores térmicos apresenta um perfil politérmico, constituído de diferentes mecanismos tanto para a perda quanto para a produção de calor, apresentando limiares de pontos de referência distintos e independentes. Desta forma, dentro de uma ampla zona de balanço da temperatura, a T_c representa

o resultado de uma transferência ativa e passiva de calor entre o animal e o ambiente (ROMANOVSKY, 2004; 2007).

1.2 - REGULAÇÃO DA TEMPERATURA CORPORAL INTERNA DURANTE O EXERCÍCIO FÍSICO ATÉ A FADIGA

Durante o exercício físico a T_c aumenta proporcionalmente à intensidade e duração da atividade, este aumento acontece devido ao aumento do metabolismo corporal para suprir as demandas energéticas dos músculos em atividade. A eficiência de conversão da energia química em energia mecânica durante o processo de contração muscular é de aproximadamente 25%, ou seja, 75% da energia utilizada neste processo são convertidos em calor. Durante os primeiros minutos de exercício a produção de calor acontece mais rapidamente do que sua dissipação, resultando em aumento abrupto da T_c . A vasoconstrição periférica mediada pelo sistema nervoso simpático impossibilita a perda de calor durante este estágio do exercício, denominado fase dinâmica do balanço térmico (HARTLEY *et al.*, 1972). A produção de calor tem sido apontada como o principal fator que desencadeia a resposta de dissipação de calor. Desse modo, a fase estável do balanço térmico do exercício tem início quando o limiar térmico para vasodilatação (TT_cV) é atingido. Nesse momento a perda de calor por dissipação é facilitada e se aproxima da taxa de produção de calor, atenuando o aumento da T_c que por sua vez permanece assim até atingir um limite crítico, contribuindo para o desencadeamento do processo de fadiga como mecanismo de proteção que ocorre independente dos estoques energéticos musculares (WALTERS *et al.*, 2000).

Em ratos, o principal mecanismo de dissipação de calor durante o exercício é caracterizado pela vasodilatação da cauda, uma vez que a perda de calor através de mecanismos comportamentais como o espalhamento de saliva pelo corpo não pode ser realizado durante a atividade. A vasodilatação da cauda é responsável pela dissipação de cerca de 25% da produção de calor em repouso e cerca de 40% durante o exercício. Dessa forma, qualquer

alteração neste mecanismo dificultará os ajustes da T_c , podendo acelerar o processo de fadiga (WILSON *et al.*, 1978).

A fadiga é um fenômeno relatado desde a antiguidade. O termo é usado na Bíblia relacionando-o a sofrimento por causas físicas ou mentais. É um termo derivado do latim '*fatigãre*' e o seu uso na língua portuguesa data de 1844 (CUNHA, 1999). A fadiga provocada pelo exercício físico é um fenômeno multifatorial que envolve interação entre fatores fisiológicos e psicológicos. Pode ser definida como incapacidade de manter a taxa de trabalho (FERNSTROM; FERNSTROM, 2006; FOLEY; FLESHNER, 2008; MEEUSEN *et al.*, 2007; NIELSEN; NYBO, 2003). A fadiga é considerada como mecanismo de defesa por prevenir ameaças à homeostase através da redução forçada da intensidade da atividade física ou a interrupção da mesma (GANDEVIA, 2001; KAY; MARINO, 2000; NOAKES, 1998). Os fatores que desencadeiam a fadiga têm origem periférica e/ou central, sendo que sua origem central é consequência de uma falha no SNC em proporcionar motivação adequada para a manutenção do exercício (GANDEVIA, 2001; KAY; MARINO, 2000; NOAKES, 1998) Os mecanismos fisiológicos propostos como precipitadores da fadiga incluem perturbações metabólicas, cardiovasculares e do SNC, que podem ser associados à elevação da T_c (FERNSTROM; FERNSTROM, 2006; FOLEY; FLESHNER, 2008; MEEUSEN *et al.*, 2007; NIELSEN; NYBO, 2003).

O rápido aumento da T_c que ocorre devido ao exercício físico dinâmico é um fator crítico para a manutenção do desempenho por períodos prolongados e parece ser uma das causas da indução à fadiga. Estudos anteriores mostraram que uma T_c elevada limita o desempenho, sendo o tempo de exercício até a fadiga inversamente relacionado com a T_c no momento do início da atividade física e diretamente relacionado com a taxa de acúmulo de calor (LACERDA *et al.*, 2005; NIELSON *et al.*, 1993; SOARES *et al.*, 2004).

1.3 - O SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA E A TERMORREGULAÇÃO DURANTE O EXERCÍCIO FÍSICO

O sistema renina-angiotensina (SRA) é bem conhecido pelo seu envolvimento na regulação da pressão arterial sanguínea e no balanço hidroeletrolítico. Classicamente, o SRA é conhecido como um sistema endócrino, sendo a angiotensina II (ANG II) seu peptídeo ativo mais estudado. Este octapeptídeo é um importante fator humoral cujo precursor angiotensinogênio é produzido principalmente pelo fígado. Na corrente sanguínea, o angiotensinogênio é convertido no decapeptídeo angiotensina I (ANG I) sob ação da enzima renina, que é produzida e liberada nos rins. Ao nível dos capilares pulmonares a ANG I é convertida em ANG II pela ação da enzima conversora de angiotensina (ECA). A ANG II, através da corrente sanguínea, age sistemicamente sobre vários órgãos alvo, como os próprios vasos sanguíneos, córtex-adrenal, rins, coração e cérebro (McKINLEY *et al.*, 2003).

O peptídeo ANG II atua principalmente através dos receptores transmembrana de angiotensina tipo 1 (AT1) e tipo 2 (AT2). Os receptores AT1 estão presentes em maior volume nos vasos sanguíneos, córtex-adrenal, rins, fígado e cérebro enquanto que os receptores AT2 são encontrados principalmente em tecido mesenquimal, medula adrenal, útero e folículos ovarianos e, em menor quantidade, no cérebro. A capacidade dos receptores AT1 em manter a pressão arterial sanguínea e regular o balanço hidroeletrolítico é bem estabelecida e confirmada por modelos onde estes receptores são bloqueados ou estimulados em tecidos específicos. Periféricamente, estes receptores estão associados à ação vasoconstritora direta, à estimulação da síntese e liberação de aldosterona pelo córtex-adrenal, que induz a reabsorção de sódio e conseqüentemente de água pelos túbulos renais, e também à hipertrofia da musculatura lisa vascular e cardíaca (THOMAS; MENDELSON, 2003). No cérebro, os receptores AT1 e AT2 são encontrados em abundância em várias regiões, como o hipotálamo, a área pré-optica, a lâmina terminális, medula ventrolateral e o núcleo do trato solitário.

Essas regiões são conhecidas pelas funções de regulação do sistema cardiovascular, balanço hidroeletrólítico e termorregulação. Além destes receptores, os peptídeos que compõem o SRA como a ANG II e sua molécula precursora angiotensinogênio, bem como as enzimas renina e ECA também são sintetizadas no cérebro (McKINLEY *et al.*, 2003).

O papel da ANG II como um hormônio regulador da temperatura corporal vem sendo amplamente investigado. Em ratos, existem evidências de que a ANG II pode ser um neurotransmissor central envolvido em mecanismos de dissipação de calor. Em repouso, a administração sistêmica de ANG II induz uma resposta hipotérmica de natureza dose-dependente manifestada através da diminuição da taxa metabólica e da vasodilatação da cauda que eleva a dissipação de calor em ratos (FREGLY; ROWLAND, 1996). Respostas similares foram obtidas após a injeção intracerebroventricular (icv) de ANG II em ratos sugerindo participação do SRA centralmente no controle da T_c (WILSON; FREGLY, 1985). Esta resposta hipotérmica induzida pela ANG II é abolida pelo tratamento com inibidores do SRA, através da inibição da ECA e antagonistas do receptor AT₁, sugerindo que tais efeitos são mediados centralmente pela ANG II principalmente via receptor AT₁ (FREGLY; ROWLAND, 1992).

As concentrações plasmáticas de ANG II durante o exercício físico estão elevadas, principalmente em decorrência do aumento da concentração de renina circulante, que se eleva em função da atividade simpática renal aumentada. A elevação da intensidade do exercício físico dinâmico provoca aumento progressivo da concentração periférica de ANG II (TIDGREN *et al.*, 1991). Tem sido demonstrado que durante o exercício físico a ANG II contribui para o controle da pressão arterial e redistribuição do débito cardíaco através da ação vasoconstritora direta e/ou pelo aumento da atividade simpática (STEBBINS; SYMONS, 1995).

Durante o exercício físico inibição da ECA não parece prejudicar significativamente respostas termorregulatórias, cardiovasculares ou renais (MITTLEMAN, 1996). Porém, através da inibição dos receptores AT₁ centrais, várias respostas foram identificadas. Em ratos, a administração icv de um

antagonista dos receptores AT1 (*losartan*), diminui a dissipação de calor e prejudica o desempenho durante o exercício físico. Esta diminuição está relacionada à elevação do limiar de temperatura corporal para vasodilatação (LEITE *et al.*, 2006). Além disso, o bloqueio destes receptores aumenta a taxa metabólica durante exercício, reduzindo a eficiência mecânica dos animais. Estes resultados indicam que o SRA central modula a produção de calor, aumentando a eficiência mecânica durante a fase estável do exercício (LEITE *et al.*, 2007). Esta redução de eficiência também está relacionada a ajustes metabólicos, pois o bloqueio central de receptores AT1 durante o exercício progressivo induz hiperglicemia e maior mobilização de ácidos graxos livres a partir do tecido adiposo, sugerindo participação central do SRA no balanço energético no decorrer da atividade (LEITE *et al.*, 2009). Além disso, foi demonstrado que a redução do desempenho durante o exercício físico provocada pela administração icv de *losartan* estava relacionada ao aumento da concentração de serotonina na área pré-optica. Estudos anteriores evidenciaram que a elevação do conteúdo de serotonina na área pré-optica apresenta efeitos semelhantes aos produzidos pela administração de *losartan* (SOARES *et al.*, 2003). Esta elevação contribui para a hipertermia e leva à fadiga central prematura (LEITE *et al.*, 2010).

1.4 - OBJETIVO

Investigar a importância da ANG II central sobre respostas termorregulatórias e seu papel no desempenho durante o exercício físico em ratos.

1.5 - OBJETIVO ESPECÍFICO

Investigar os efeitos da injeção intracerebroventricular de ANG II sobre:

- As respostas termorregulatórias: T_c , T_{cauda} , BHR, HSR e o TT_cV em ratos submetidos ao exercício submáximo em esteira;
- O TE, o W e a relação entre o balanço de calor e a determinação da fadiga em ratos submetidos ao exercício submáximo em esteira até a fadiga.

2 - MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 - ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar adultos, com peso corporal entre 250-350 g provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO/UFMG). Após os procedimentos cirúrgicos, os animais foram mantidos em gaiolas individuais, com fotoperíodo de 14h luz/ 10h escuro, sob uma temperatura ambiente de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, e livre acesso à ração para ratos (Nuvilab) e água.

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) e foram executados de acordo com o regulamento do Comitê.

2.2 - PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

2.2.1 - Canulação Central

Os animais foram anestesiados com uma associação de Ketamina (115 mg/Kg peso corporal, intraperitoneal) e Xilazina (5.75 mg/Kg peso corporal, via intraperitoneal), para canulação do ventrículo cerebral lateral direito (VLD). Em seguida, eles foram submetidos à tricotomia e assepsia da região da cabeça. Foi realizada incisão longitudinal da pele e do tecido subcutâneo na porção superior da cabeça. Foi aplicada localmente dose de xilocaína (1% 0,1mL; Anestésico L, Pearson) para analgesia e afastamento do periósteo.

A seguir, o animal foi adaptado ao estereotáxico para animais de pequeno porte (David Kopf Instruments, M-900, Tujunga, CA, USA). Foi feita craneotomia com o auxílio de broca odontológica (7 a 8 mm) para a

implantação de cânula guia de aço inoxidável (16 mm de comprimento x 0,7mm de diâmetro interno) no ventrículo lateral direito. A fixação da cânula foi feita através de dois parafusos ancorados no crânio. A cânula foi implantada obedecendo às coordenadas estereotáxicas estabelecidas pelo Atlas de De Groot (1959) cujos parâmetros foram: -1,5mm posterior ao bregma (ântero-posterior), -2,5mm a partir da linha mediana (látero-lateral) e -3,0mm a partir da dura mater (vertical). A cânula guia foi conectada a um tubo de polietileno (PE 50) adaptado a um manômetro contendo solução salina. O posicionamento correto da cânula na área desejada foi observado pelo deslocamento da coluna de líquido do manômetro (ANTUNES-RODRIGUES; McCANN, 1970). A cânula icv foi ancorada aos parafusos e fixada à calota craniada com cimento odontológico autopolimerizante. A cânula foi protegida com um capuz de polietileno PE 50 e com um mandril de nylon de modo a impedir sua obstrução.

2.2.2 - Implante do sensor de temperatura

Durante o mesmo ato cirúrgico de canulação central, o sensor de temperatura TR4000 VM-FH (Mini Mitter, Sun River, OR) foi implantado na cavidade intraperitoneal. Após assepsia e tricotomia da região abdominal, o sensor de temperatura foi inserido na cavidade intraperitoneal, através das camadas musculares, por meio de pequena incisão na linha Alba de aproximadamente 2 cm. O peritônio e a pele da região foram adequadamente suturados após o implante fixando o sensor à musculatura adjacente à incisão.

Ao término das cirurgias os animais receberam dose única de antibiótico (48.000 U – Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge) no volume de 0,2mL via intramuscular (0,1mL em cada pata traseira) e analgésico/anti-inflamatório subcutâneo (Banamine injetável, 1,1 mg/kg de peso corporal, Schering-Plough) no volume de 0,02mL em uma das patas traseiras, via subcutânea. Foi permitido aos animais um período de recuperação de no mínimo 5 dias antes de serem submetidos aos experimentos.

2.3 - TEMPERATURA AMBIENTE, CORPORAL E DA CAUDA

A temperatura corporal interna (T_c) foi registrada por telemetria utilizando o sensor de temperatura intraperitoneal previamente calibrado. Para determinação da temperatura da cauda (T_{cauda}) um termistor de cauda (Yellow Springs Instruments, 409-B) foi fixado sobre a pele com esparadrapo, cerca de 10mm de distância da base da cauda. Este termistor foi conectado a um leitor digital (Yellow Springs Instruments, 4600 Precision Thermometer). A temperatura ambiente (T_a) dentro da esteira metabólica foi registrada por meio de um termômetro digital fixado dentro do local (Minipa, ET-1400).

2.4 - EXERCÍCIO FÍSICO

A adaptação ao exercício físico constou de uma corrida diária em esteira metabólica para roedores (Columbus Instruments, OH, USA, Modular treadmill, série 96006-2) a velocidade de 15m/min, 5% de inclinação da esteira, durante 5 minutos, por 4 dias consecutivos. Este procedimento foi realizado visando familiarizar o animal ao local do experimento e à direção do exercício.

Durante os experimentos, os animais foram submetidos ao exercício em esteira à velocidade constante de 18m/min e 5% de inclinação. Esses parâmetros correspondem a um consumo de oxigênio de aproximadamente 66% do VO_{2max} (BROOKS; WHITE, 1978; HUSSAIN *et al.*, 2001). O ponto de fadiga foi definido como o ponto no qual o animal não mais conseguia manter o ritmo da esteira por mais de 10 segundos (LACERDA *et al.*, 2005). A estimulação elétrica utilizada foi estabelecida de acordo com a tolerância de cada animal, a ponto de causar desconforto, porém sem causar dor, que o fazia preferir permanecer na esteira ao invés da grade de estimulação elétrica (AMERICAN PHYSIOLOGICAL SOCIETY, 2006). A temperatura ambiente foi mantida dentro de uma faixa constante, entre $22 \pm 2^\circ\text{C}$, a fim de evitar qualquer alteração na T_c . Os experimentos foram realizados entre 8:00 e 12:00 horas.

2.5 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

No dia do experimento, após pesagem do animal, uma agulha (22G) foi introduzida na cânula guia e conectada a uma seringa Hamilton para infusão da droga por meio de um tubo de polietileno PE 10. Simultaneamente, o termistor para registro da temperatura da cauda foi fixado ao animal. Os animais foram escolhidos aleatoriamente para receber SAL ou ANG II. Todos os experimentos foram realizados utilizando método duplo-cego. O animal foi, então, colocado no local do experimento onde permaneceu por 60 minutos para adaptação. Para a colheita dos dados iniciais em repouso, os animais permaneceram em repouso por pelo menos mais 60 minutos na esteira metabólica.

Imediatamente antes do início da atividade física, 2,0µL de 0,15M NaCl (Salina, n = 8) ou 2,0µL de solução de ANG II nas seguintes doses: 0,25µg (ANG II 0,25 µg, n = 3); 1µg (ANG II 1µg n = 3); 2µg (ANG II 2µg, n = 5) e 4µg (ANG II 4µg, n = 5) foram administrados no ventrículo lateral direito. As doses de ANG II utilizadas foram estabelecidas utilizando curva dose-resposta para a droga a partir de dados da literatura (n=5) (WILSON; FREGLY, 1985). As doses examinadas foram de 0,25µg, 1µg, 2µg e 4µg. Foram selecionadas as doses que apresentaram diferenças significativas no tempo total de exercício, trabalho realizado e/ou parâmetros termorregulatórios.

As temperaturas foram registradas durante o repouso e a cada minuto continuamente durante o exercício físico. A T_c e a T_{cauda} foram utilizadas para determinar o limiar de vasodilatação da cauda, isto é, a temperatura corporal interna que corresponde ao momento no qual a T_{cauda} claramente começa a se elevar (vasodilatação).

2.6 - CÁLCULOS

A partir dos dados colhidos foram determinados:

Tempo de exercício (TE, min) = tempo total de exercício até a fadiga.

Trabalho (W, Kgm) = $m \cdot TE \cdot v \cdot \text{sen}\alpha$, onde m = massa corporal em kg; v = velocidade da esteira (m/min); $\text{sen}\alpha$ = inclinação da esteira (Brooks e White, 1978; Brooks *et al.*, 1984; Lima *et al.*, 2001).

Taxa de aquecimento Corporal ($BHR, ^\circ C/min$) = $\Delta T_C / (\text{tempo de exercício})$, onde ΔT_C = variação da temperatura interna ($T_f - T_i$); $T_f = T_C$ no ponto de fadiga; e $T_i = T_C$ inicial medida antes do exercício.

Taxa de acúmulo de calor ($HSR, cal/min$) = $(\Delta T_C) \cdot m \cdot c / (\text{tempo de exercício})$, onde m = massa corporal em gramas; e c = calor específico dos tecidos do animal ($0.826 \text{ cal} \cdot \text{g}^{-1} \cdot ^\circ \text{C}^{-1}$) (Gordon, 1993).

Relação entre calor acumulado e trabalho realizado = $HS (cal) / W (Kgm/min)$. Considerou-se $1Kgm = 473Kcal$ para conversão da razão em cal/cal.

2.7 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados estão apresentados como média \pm EPM. Diferenças entre os grupos e o efeito do tempo foram avaliados através de análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Newman-Keuls. Os dados também foram comparados utilizando o *Student's t-test* pareado e não pareado, conforme aplicabilidade. As correlações entre as variáveis termorregulatórias e do exercício foram definidas usando o coeficiente de correlação de Pearson. O nível de significância foi fixado em $p < 0,05$.

3 - RESULTADOS

3.1 - Efeito da injeção icv de ANG II (0,25µg; 1µg; 2µg; 4µg) sobre o desempenho durante o exercício físico até a fadiga.

O GRÁFICO 1 representa o tempo de exercício até a fadiga após a injeção icv de Salina e/ou diferentes concentrações de ANG II (0,25µg, n = 3; 1µg, n = 3; 2µg, n = 5; 4µg, n = 5). O efeito da injeção icv de ANG II observado sobre o tempo de exercício até a fadiga foi dose dependente com formato em U invertido (GRÁFICO 1A). Até a dose de 2µg a relação dose-resposta foi linear e positiva ($r = 0,952$; $p < 0,01$) (GRÁFICO 1B). Entretanto, a dose de 4µg, ao contrário outras doses testadas, apresentou um efeito inibitório sobre o desempenho físico. Como pode ser observado no GRÁFICO, o perfil apresenta-se dose dependente até a dose de 2µg demonstrando um efeito ergogênico nesta faixa quando visto pelo tempo de exercício. Por outro lado, a dose de ANG II 4µg se apresentou claramente inibitória, isto é, reduzindo em 60% o TE (Salina: $16,95 \pm 1,9$ min; ANG II 0,25µg: $18,7 \pm 0,89$ min; ANG II 1µg: $25,36 \pm 3,04$ min; ANG II 2µg: $27,32 \pm 0,28$ min; ANG II 4µg: $10,24 \pm 1,49$ min).

Levando em consideração estes resultados, as doses de ANG II 2µg e ANG II 4µg foram destacadas e uma vez que apresentaram respostas bem definidas em relação ao desempenho e parâmetros termorregulatórias serão analisadas separadamente para melhor visualização dos efeitos das doses e discussão dos resultados.

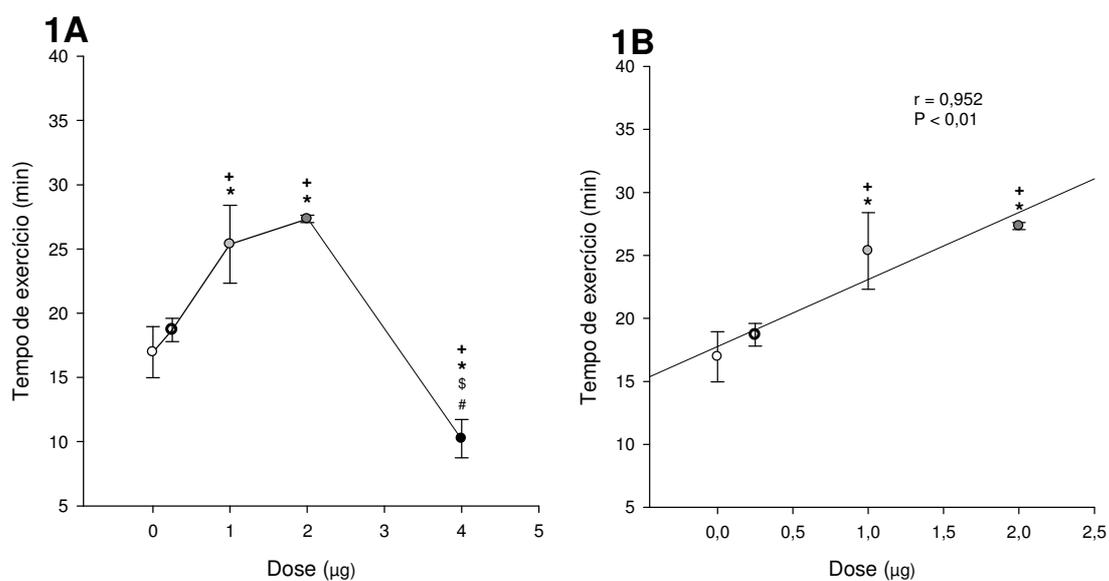


GRÁFICO 1. Efeito da injeção icv de 2µL de ANG II [0,25µg, n = 3 (Círculo preto vazado); 1µg, n = 3 (Círculo cinza); 2µg, n = 5 (Círculo cinza escuro); 4µg, n = 5(Círculo Preto)] ou de 0,15 M NaCl [Salina, n = 8 (Círculo vazado)] sobre o desempenho durante um exercício físico até a fadiga em esteira a uma velocidade de 18m/min e 5% de inclinação. A – Curva em formato de U invertido. B – Correlação dose/efeito entre as doses crescentes até 2µg. Dados expressos em média ± EPM. $r = 0,952$, $p < 0,01$. * $p < 0,05$ comparado ao grupo Salina; + $p < 0,05$ comparado ao grupo ANG II 0,25µg; # $p < 0,05$ comparado ao grupo de ANG II 1µg; \$ $p < 0,05$ comparado ao grupo de ANG II 2µg.

Fonte: Criação do próprio autor.

3.2 - Efeito da injeção icv de ANG II (2 μ g; 4 μ g) sobre o tempo de exercício (TE) e sobre o trabalho (W) realizado durante o exercício físico até a fadiga.

O GRÁFICO 2 representa as diferenças entre o TE e W entre os animais tratados com Salina, ANG II 2 μ g e ANG II 4 μ g (n = 5). A administração de ANG II 2 μ g promoveu aumento de 61% no TE quando comparado com o grupo controle, enquanto que a dose de 4 μ g promoveu redução de 60% no TE comparado ao grupo controle. Estes efeitos foram: ANGII 2 μ g: 27,32 \pm 0,28 min; ANG II 4 μ g: 10,24 \pm 1,49 min e Salina: 16,95 \pm 1,9 min; p < 0,05) (GRÁFICO 2A). Ao comparar os valores de W, pode-se perceber também um aumento de 56% para a dose de ANG II 2 μ g e redução de 43% para a dose de ANG II 4 μ g em relação ao grupo controle, conforme os dados que se seguem: ANG II 2 μ g: 8,18 \pm 0,47 Kgm; ANG II 4 μ g: 2,26 \pm 0,38 Kgm e Salina: 5,22 \pm 0,47 Kgm; p < 0,05)(GRÁFICO 2B).

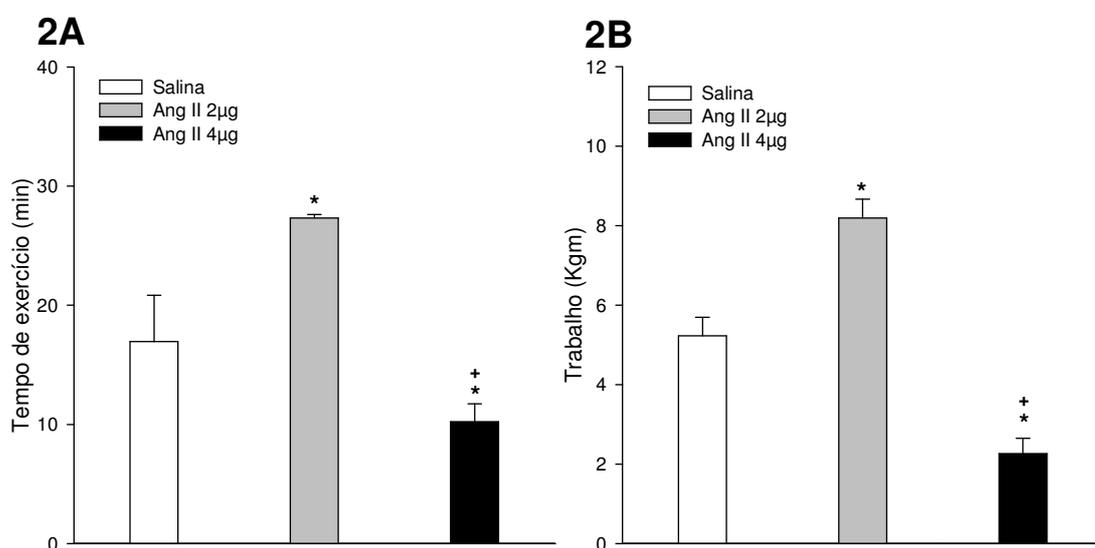


GRÁFICO 2. Efeito da injeção intracerebroventricular de 2µL de ANG II (2µg; 4µg) ou de Salina no tempo total de exercício até a fadiga e sobre o trabalho realizado (n = 5). Dados expressos em média ± EPM. * p < 0,05 comparado ao grupo Salina; + p < 0,05 comparado ao grupo ANG II 2µg.

3.3 - Efeito da injeção icv de ANG II (2 μ g; 4 μ g) sobre a temperatura corporal interna (T_c) e sobre a temperatura da cauda (T_{cauda}) durante o exercício físico até a fadiga.

O GRÁFICO 3A representa a curva de evolução da variação (delta) da T_c durante o exercício físico até a fadiga em animais tratados com Salina e ANG II. Tanto nos animais tratados com Salina, quanto nos tratados com as doses de 2 μ g e 4 μ g de ANG II foi observado aumento rápido e progressivo da T_c . A T_c apresentou elevação significativamente diferente do valor basal nos minutos 6, 5 e 1, respectivamente, para os grupos Salina, ANG II 2 μ g e ANG II 4 μ g ($p < 0,05$). No grupo tratado com ANG II 4 μ g a partir do 2º minuto de exercício já verificou-se aumento superior da T_c o qual permaneceu superior até a fadiga em comparação com o grupo controle ($p < 0,05$). Observou-se elevação da T_c no grupo tratado com ANG II 2 μ g em relação ao grupo Salina a partir do 13º minuto mantendo-se até a fadiga ($p < 0,05$).

Em relação à T_{cauda} , comparando as curvas de evolução do delta no GRÁFICO 3B é possível notar a vasoconstrição provocada inicialmente pelo exercício físico, visualizada através da queda da T_{cauda} , que atingiu o nadir aos 2, 5 e, novamente, 2 minutos de exercício para os grupos Salina, ANG II 2 μ g e ANG II 4 μ g, respectivamente. Esta vasoconstrição foi seguida de elevação gradativa do fluxo sanguíneo para a cauda constatada pela elevação da T_{cauda} . Isto indica que mecanismos de perda de calor foram ativados. A T_{cauda} apresentou elevação significativamente diferente do valor basal no minuto 9 para os três grupos ($p < 0,05$). Contudo, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos em qualquer período do exercício.

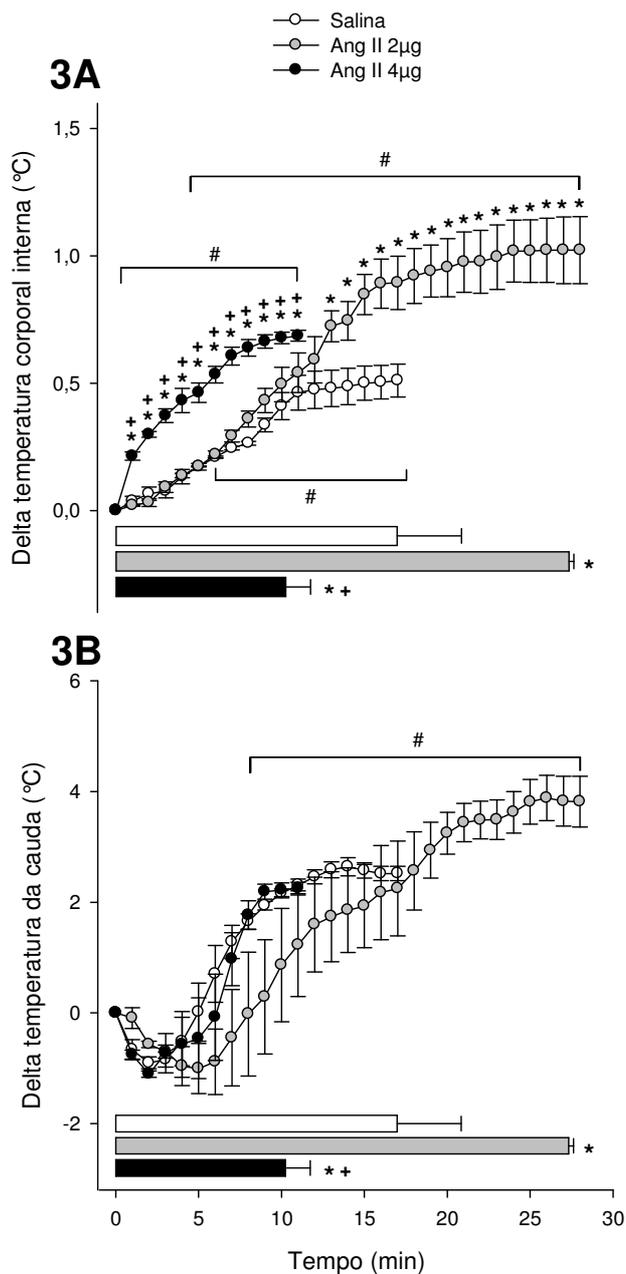


GRÁFICO 3. Efeito da injeção icv de 2 µL de ANG II (2µg; 4µg) ou Salina na variação (delta) da temperatura corporal interna (T_c) (GRÁFICO 3A) e da temperatura da cauda (T_{cauda}) (GRÁFICO 3B) durante o exercício até a fadiga ($n = 5$). As barras horizontais abaixo dos GRÁFICOS indicam o tempo total de exercício até a fadiga. Dados expressos em média \pm EPM. * $p < 0,05$ comparado ao grupo Salina; + $p < 0,05$ comparado ao grupo ANG II 2µg. # $p < 0,05$ comparado ao valor basal correspondente.

3.4 - Efeito da injeção icv de ANG II (2 μ g; 4 μ g) sobre a taxa de aquecimento corporal (BHR) e a taxa de acúmulo de calor (HSR) durante o exercício físico até a fadiga.

Com o objetivo de comparar os efeitos térmicos em todos os tratamentos, foram calculadas a BHR e a HSR durante o exercício físico até a fadiga (n= 5). Os valores estão ilustrados nos GRÁFICOS 4A e 4B.

Não foram observadas diferenças significativas sobre a BHR e a HSR quando comparados os grupos salina e ANG II 2 μ g. Porém o grupo ANG II 4 μ g apresentou valores significativamente maiores quando comparado com os dois grupos anteriores ($p < 0,05$). Os valores foram: BHR: $0,03 \pm 0,01$ °C/min, Salina; $0,03 \pm 0,01$ °C/min, ANG II 2 μ g; $0,07 \pm 0,01$ °C/min, ANG II 4 μ g; HSR: $8,67 \pm 0,93$ cal/min, Salina; $9,43 \pm 1,19$ cal/min, ANG II 2 μ g; $21,16 \pm 1,06$ cal/min, ANG II 4 μ g.

Para ilustrar a relação linear de resposta às doses administradas de ANG II foram calculadas as correlações entre BHR, HSR e as concentrações testadas. Foram observadas correlações significativas onde maiores concentrações de ANG II estão associadas a maiores valores de BHR e HSR, inclusive para a maior concentração testada, de 4 μ g (GRÁFICOS 4C e 4D).

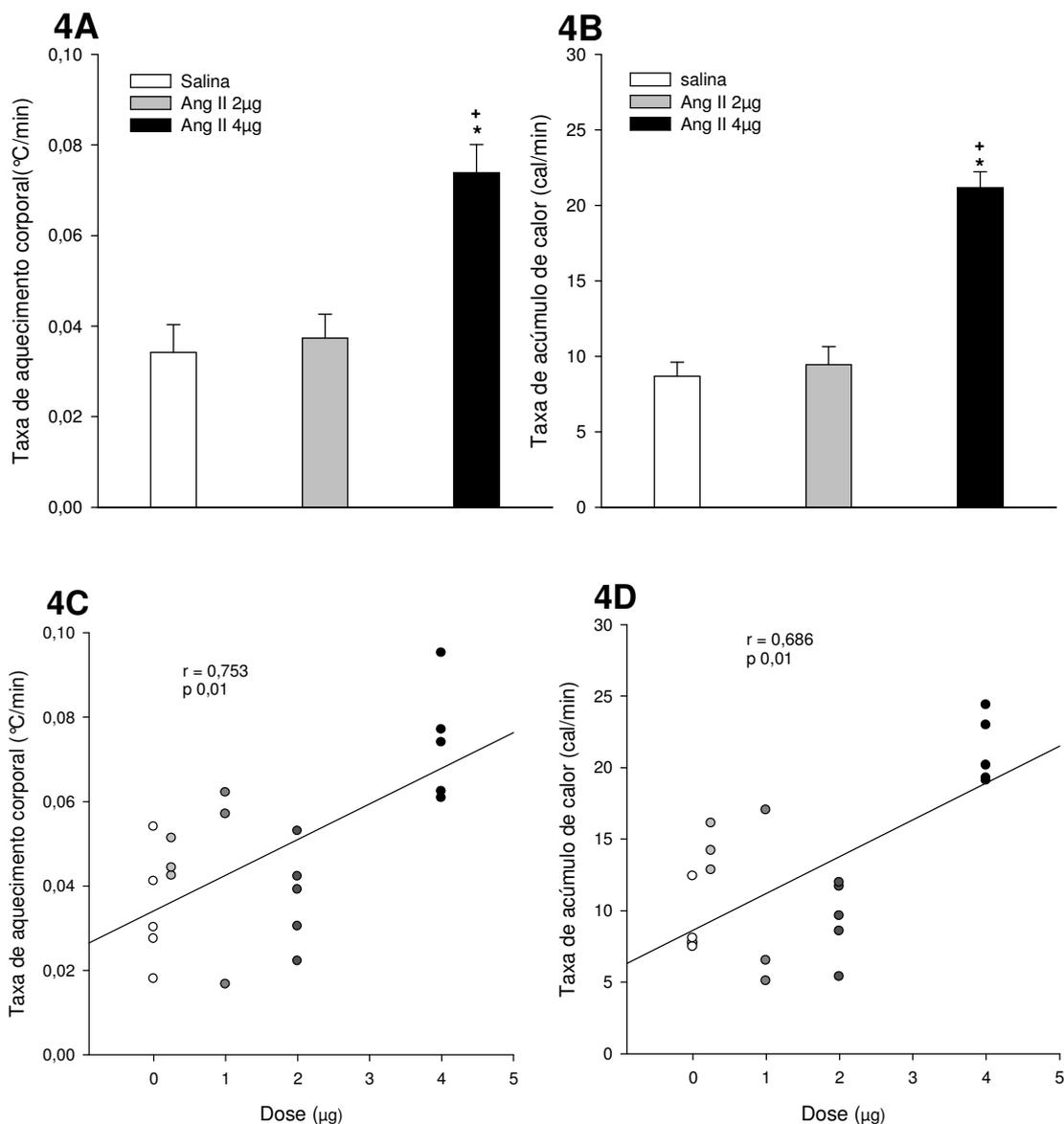


GRÁFICO 4. Efeito da injeção icv de 2 µL de ANG II (2µg; 4µg) ou de Salina sobre a taxa de aquecimento corporal (BHR) (GRÁFICO 4A) e a taxa de acúmulo de calor (HSR) (GRÁFICO 4B) durante o exercício até a fadiga (n = 5). Correlação entre BHR (GRÁFICO 4C), HSR (GRÁFICO 4D) e a concentração de ANG II (salina: círculo vazado; ANG II 0,25 µg: círculo cinza claro; ANG II 1 µg: círculo cinza; ANG II 2 µg: círculo cinza escuro; ANG II 4 µg: círculo preto). Dados expressos em média ± EPM. * $p < 0,05$ comparado ao grupo Salina; + $p < 0,05$ comparado ao grupo ANG II 2µg.

3.5 - Correlação entre taxa de aquecimento corporal (BHR), taxa de acúmulo de calor (HSR) e desempenho durante o exercício físico até a fadiga.

Foram observadas correlações entre BHR e TE (GRÁFICO 5A, $r = 0,711$, $p < 0,01$) e HSR e TE (GRÁFICO 5B, $r = 0,684$, $p < 0,01$). Pode-se observar no GRÁFICO uma relação negativa entre BHR, HSR e o desempenho durante o exercício físico onde a maior concentração de ANG II ($4\mu\text{g}$) está associada à redução do tempo de exercício em relação ao grupo controle. Por outro lado, pode-se observar um deslocamento para a direita e para baixo do grupo tratado com $2\mu\text{g}$ de ANG II quando comparado ao tratamento com $4\mu\text{g}$ de ANG II ($p < 0,05$), indicando uma alteração na sensibilidade destes animais ao acúmulo de calor.

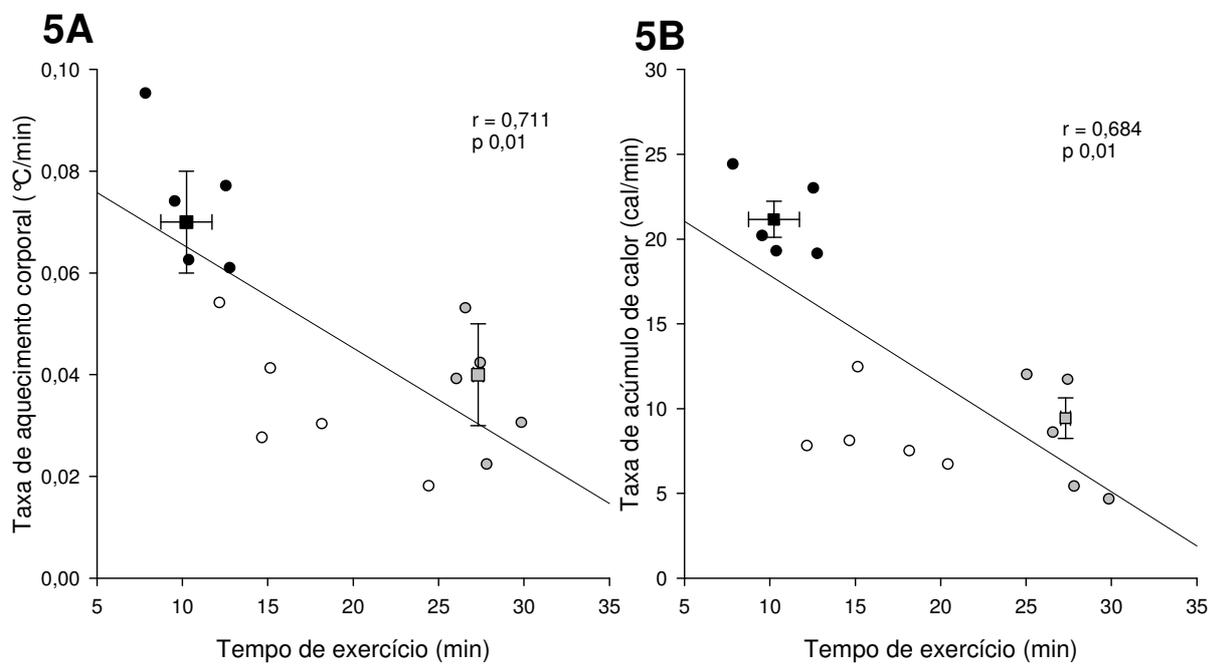


GRÁFICO 5. Correlações entre BHR e TTE (GRÁFICO 5A) e HSR e TTE (GRÁFICO 5B). Salina: círculo vazado; ANG II 2 μ g: círculo cinza; ANG II 4 μ g: círculo preto; Média ANG II 2 μ g: quadrado cinza; Média ANG II 4 μ g: quadrado preto (n = 5).

3.6 - Efeito da injeção icv de ANG II (2 μ g; 4 μ g) sobre o limiar de vasodilatação da cauda (TT_cV) durante o exercício físico até a fadiga.

Para verificar se o tratamento com ANG II afetaria os mecanismos de dissipação de calor durante o exercício através da vasodilatação da cauda, o TT_cV foi calculado. O resultado está ilustrado no GRÁFICO 6. Não foram observadas diferenças entre os grupos Salina e ANG II 2 μ g, porém o grupo ANG II 4 μ g apresentou TT_cV significativamente maior quando comparado aos dois grupos anteriores ($p < 0,05$). Os dados são: 37,85 \pm 0,03 °C, Salina; 37,92 \pm 0,13 °C, ANG II 2 μ g; 38,28 \pm 0,04 °C, ANG II 4 μ g.

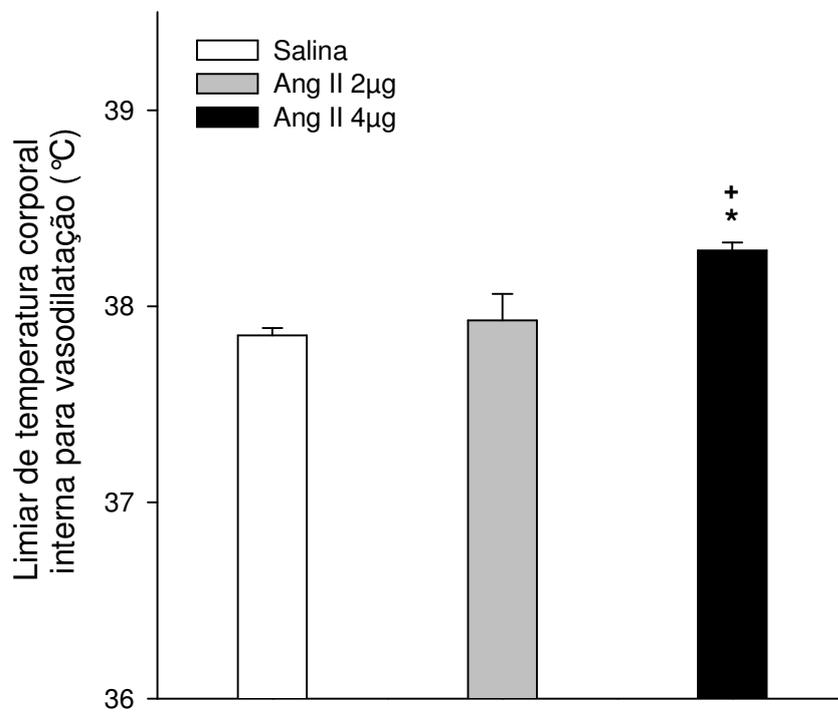


GRÁFICO 6. Efeito da injeção icv de 2 µL de ANG II (2µg; 4µg) ou de Salina sobre o limiar de vasodilatação da cauda (TT_{cV}) durante o exercício até a fadiga (n = 5). Dados expressos em média ± EPM. * p < 0,05 comparado ao grupo Salina; + p < 0,05 comparado ao grupo ANG II 2µg.

3.7 - Correlações entre taxa de aquecimento corporal (BHR), a taxa de acúmulo de calor (HSR) e o limiar de vasodilatação da cauda (TT_cV) durante o exercício físico até a fadiga.

Foram observadas correlações entre BHR e TT_cV (GRÁFICO 7A, $r = 0,811$, $p < 0,01$) e HSR e TT_cV (GRÁFICO 7B, $r = 0,711$, $p < 0,01$). Pode-se visualizar através do GRÁFICO que a elevação do TT_cV está diretamente relacionada ao aumento da BHR e HSR, inclusive em relação à maior dose de ANG II administrada (4 μ g) onde pode-se perceber um deslocamento do grupo para a direita e para cima com relação aos demais tratamentos.

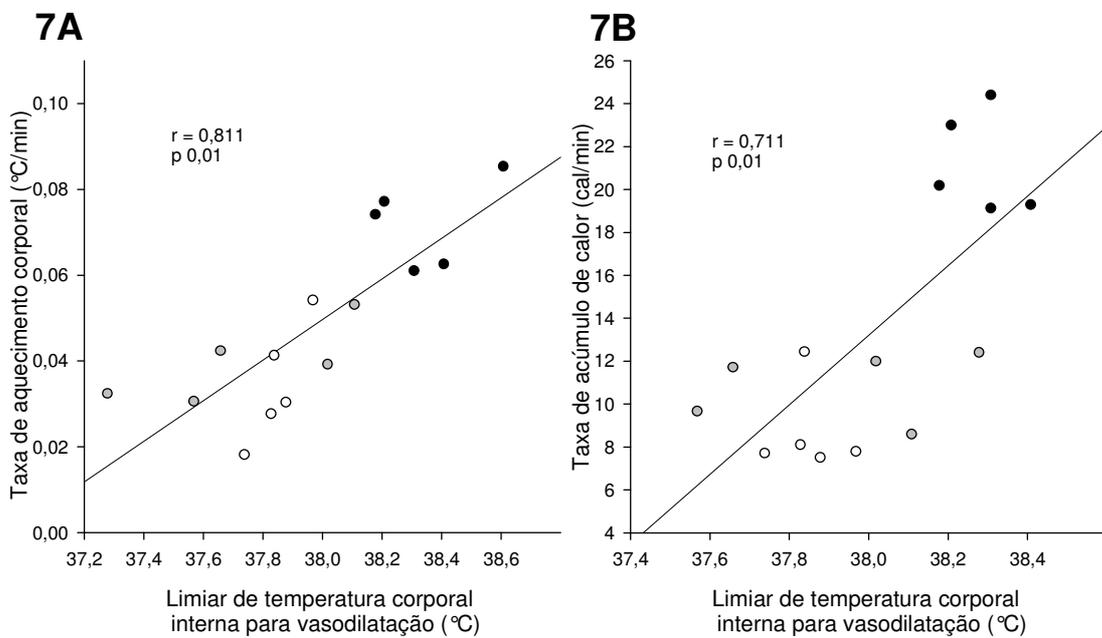


GRÁFICO 7. Correlações entre BHR e TT_cV (GRÁFICO 7A) e HSR e TT_cV (GRÁFICO 7B).
Salina: círculo vazado; ANG II $2\mu\text{g}$: círculo cinza; ANG II $4\mu\text{g}$: círculo preto ($n = 5$).

3.8 - Efeito da injeção icv de ANG II (2 μ g; 4 μ g) sobre a relação entre o calor acumulado e o trabalho realizado (HS/W) durante o exercício físico até a fadiga.

Visando comparar os efeitos dos tratamentos na eficiência dos mecanismos termorregulatórios foi calculada a relação entre calor acumulado e o trabalho realizado (HS/W) (GRÁFICO 8A). A partir deste cálculo foi testada a ocorrência de uma possível correlação entre HS/W e TE ($r = 0,877$, $p < 0,01$) (GRÁFICO 8B). No GRÁFICO pode-se observar claramente que a melhora de desempenho durante o exercício físico provocada pela dose de ANG II 2 μ g está estreitamente relacionada à menor quantidade de calor acumulado por trabalho realizado. Da mesma forma, é possível observar que a redução do desempenho provocada pela administração da dose mais alta de ANG II (4 μ g) está relacionada à maior quantidade calor acumulado por trabalho realizado.

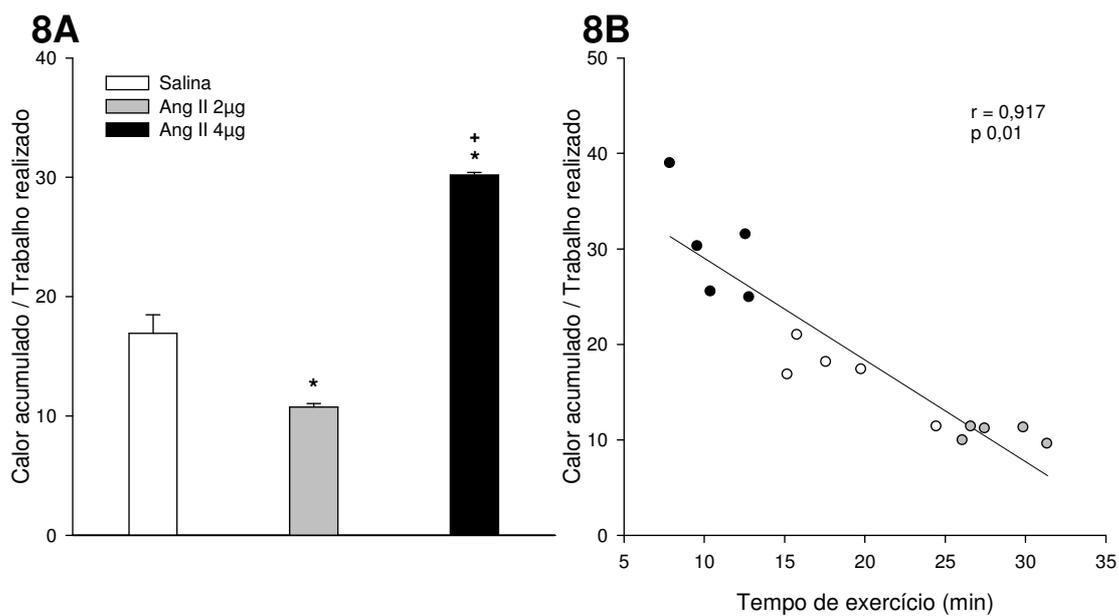


GRÁFICO 8. Razão entre o calor acumulado (HS) e o trabalho realizado (W) (GRÁFICO 8A) e correlação entre HS/W e TE (GRÁFICO 8B). Salina: círculo vazado; ANG II 2µg: círculo cinza; ANG II 4µg: círculo preto (n = 5).

4 - DISCUSSÃO

Os resultados encontrados neste estudo mostraram claramente que a maior disponibilidade central de ANG II interfere no desempenho durante o exercício físico. Através destes resultados pode ser constatada a importância fisiológica central deste peptídeo na modulação do desempenho durante o exercício físico. Foi observada uma curva dose-resposta com a característica de U invertido, onde uma correlação linear e positiva foi observada até a dose de 2 µg. Para doses mais elevadas foi observada uma diminuição no efeito ergogênico do peptídeo. Além de alterações no desempenho a ANG II também mostrou uma influência sobre o balanço térmico durante o exercício físico. Principalmente para as doses mais elevadas, onde a HSR e BHR tiveram uma relação dose-dependente direta com a concentração administrada. De maneira interessante, foram observadas duas curvas distintas dose-dependentes para os efeitos da administração central de ANG II. Em relação ao desempenho e o trabalho realizado foi observada uma curva em formato de U invertido, enquanto que sobre o balanço térmico foi observada uma correlação positiva, dose-dependente e crescente quando avaliada através da HSR e BHR. Quando analisados em conjunto os dois efeitos da ANG II sobre o desempenho e o balanço térmico, estes estão coerentes com os dados presentes na literatura e com resultados anteriores do laboratório, onde foi constatado que para HSR e BHR elevadas ocorre uma redução no desempenho durante o exercício físico (SOARES *et al.*, 2003; LACERDA *et al.*, 2005; LEITE *et al.*, 2006). Seria importante assinalar que na dose onde a ANG II apresentou seu efeito ergogênico mais pronunciado não foram verificadas alterações importantes na HSR e BHR, embora o animal tenha atingido maior valor de T_c no plateau da fase estável do exercício, inclusive no ponto de fadiga. Estes resultados reforçam a hipótese de que não seria o valor absoluto da temperatura ou do calor acumulado que contribuiriam para a diminuição do desempenho, mas sim a velocidade com que variam, como um sinalizador dinâmico, tendo em vista que a T_c final, assim como o calor acumulado total durante o exercício foram mais elevados no animal com maior desempenho (ROMANOVSKY, 2007). Esta hipótese é reforçada pelas correlações entre

HSR, BHR e desempenho ilustradas no GRÁFICO 5. Levando em consideração que a demanda metabólica do exercício leva a um aumento na produção de calor a dissipação de calor é um fator importante para a manutenção do exercício evitando uma hipertermia excessiva (WEBB, 1995). Em ratos, a vasodilatação da cauda é o principal mecanismo de dissipação de calor durante o exercício (WILSON *et al.*, 1978). Dessa forma uma alteração no TT_cV poderia levar a uma alteração no balanço térmico. É importante assinalar que na dose mais elevada de ANG II utilizada neste experimento foi verificada uma elevação no TT_cV , que provavelmente teria sido responsável pela maior HSR e BHR durante o exercício e conseqüente redução do desempenho, como visualizado no GRÁFICO 7. É interessante observar que nos animais com menor desempenho houve um maior acúmulo de calor por trabalho realizado, indicando uma menor eficiência mecânica ou nos mecanismos de dissipação de calor. Por outro lado, ao contrário dos animais tratados com as doses mais elevadas foi observado um menor acúmulo de calor por trabalho realizado dos tratados com doses abaixo de 2 μ g. Estes resultados estão coerentes com os trabalhos que indicam um possível efeito ergogênico da ANG II (LEITE *et al.*, 2006; 2007; 2009).

Estudos prévios evidenciaram que o SRA central poderia ter um possível papel na termorregulação durante o exercício físico. Estes estudos mostraram que a administração central e periférica de ANG II em repouso induz uma resposta hipotérmica caracterizada pelo aumento da dissipação de calor através da vasodilatação da cauda, da queda da taxa metabólica e da T_c (FREGLY; ROWLAND, 1992; WILSON; FREGLY, 1985). Levando em consideração que o aumento da dissipação de calor durante o exercício físico poderia atenuar a hipertermia durante a atividade o aumento da atividade de ANG II no SNC poderia acarretar o aumento do desempenho físico. Esta hipótese de que a ANG II poderia exercer um efeito ergogênico está, pelo menos em parte, de acordo com os resultados obtidos no presente estudo. Estes resultados mostraram claramente que a maior disponibilidade de ANG II central leva a um maior desempenho durante o exercício físico. Entretanto, apesar de não ter sido observada uma atenuação na hipertermia induzida pelo exercício o aumento do desempenho induzido pelo tratamento com ANG II

abaixo de 2 µg poderia ter sido ocasionado por uma melhoria na eficiência mecânica, uma vez que não foi observada uma influência sobre os mecanismos de dissipação de calor. Outra possibilidade seria que este tratamento teria influenciado a relação dopamina/serotonina centralmente. Essa relação tem sido mostrada em alguns estudos estar relacionada com o desencadeamento da fadiga central, isto é, uma maior relação aumentaria o desempenho enquanto a diminuição nessa relação produziria o efeito contrário (LEITE, *et al.*, 2010). Essas evidências foram também mostradas em estudos anteriores em que o bloqueio dos receptores de ANG II centrais AT1, provocava a redução do desempenho durante o exercício físico por mecanismos muito semelhantes aos encontrados no presente estudo. Isto é, por alterar mecanismos termorregulatórios reduzindo a dissipação de calor (LEITE, *et al.*, 2006), por influenciar a disponibilidade de substratos energéticos (LEITE, *et al.*, 2009), reduzir a eficiência mecânica e aumentar o custo energético durante a atividade (LEITE, *et al.*, 2007).

Outra evidência que corrobora com a hipótese de que o tratamento com ANG II poderia influenciar o metabolismo de dopamina centralmente são estudos em que foi verificado que a administração icv deste neurotransmissor provocou melhora no desempenho durante o exercício físico em ratos. Esta melhora foi mediada pelo aumento na tolerância ao acúmulo de calor e aumento na taxa metabólica durante o exercício progressivo (BALTHAZAR *et al.*, 2008). Este efeito foi muito semelhante ao observado durante o tratamento com a dose de ANG II 2 µg em que foi evidenciado que o animal, apesar de não apresentar um aumento da taxa de aquecimento, mostrou um desempenho 61% maior e uma maior tolerância à hipertermia durante o exercício físico. Possivelmente a interação entre a ANG II e a dopamina possa ter contribuído para a melhoria do desempenho observada no presente estudo, principalmente considerando o fato de que a ANG II seria um fator que desencadearia respostas periféricas a partir do sistema nervoso central (McKINLEY *et al.*, 2003), por exemplo alteração do TT_{cV} . Dessa forma, seria possível assumir que o aumento do desempenho durante o exercício físico devido à estimulação central com ANG II poderia ter relação não somente com o controle termorregulatório, mas também com outras funções exercidas por este

peptídeo, como aumento na disponibilidade de substratos, da eficiência mecânica e do aporte sanguíneo para a musculatura, causado pela vasodilatação (JONES; WOODS, 2003).

Por outro lado, foi observado que em doses altas de ANG II teve um efeito ergolítico e hipertérmico. Esta característica de drogas que apresentam curvas dose-resposta em formato de U invertido está presente também nos efeitos centrais da dopamina, onde numa concentração central intermediária são observados efeitos positivos enquanto que em altas concentrações deste neurotransmissor ocorre uma inversão deste efeito. Estes resultados sugerem que poderia haver uma faixa ótima para determinados efeitos também para dopamina (MONTE-SILVA *et al.*, 2009).

Ao analisar a correlação entre BHR e HSR (GRÁFICO 5) pode-se observar um deslocamento do tratamento com ANG II 2 µg para a direita e para baixo, onde o tempo de exercício está aumentado para uma menor BHR e HSR quando se compara ao grupo tratado com ANG II 4 µg. Este resultado aponta possível alteração na percepção ou sensibilidade ao calor produzido durante o exercício, permitindo maior tempo em atividade para quantidades semelhantes de BHR e HSR. Esta relação negativa entre o desempenho e o aumento da HSR e BHR tem sido relatada ocorrer quando o conteúdo de serotonina está aumentado na POA/AH. Semelhante aos resultados encontrados neste estudo para as doses mais elevadas, a administração icv do aminoácido triptofano, precursor do neurotransmissor serotonina, provocou redução do desempenho, reduzindo o tempo de fadiga durante o exercício físico. Esta redução se correlacionou ao aumento na BHR e HSR provocada pela disponibilidade aumentada de triptofano (SOARES *et al.*, 2003; 2004). O mesmo poderia ter ocorrido em função do tratamento com as doses elevadas de ANG II.

Em resumo, os resultados apresentados neste estudo sugerem que a maior disponibilidade central de ANG II provoca efeitos distintos durante o exercício físico conforme a dose administrada, assumindo um comportamento de curva em U invertido, comum em outras drogas. Em doses intermediárias provoca aumento no desempenho demonstrado pelo aumento do tempo de fadiga não acompanhado por alterações na T_c , T_{cauda} , BHR, HSR e TT_cV . Estes

dados indicam que este aumento no desempenho pode estar relacionado a outros fatores centrais além da termorregulação. Em doses altas, a ANG II central provoca redução no desempenho acompanhada de aumento acentuado na T_c , BHR, HSR e TT_{cV} , porém sem alterações na T_{cauda} , indicando que esta alteração no desempenho poderia se dar em função do aumento no calor produzido durante o exercício bem como em alterações nos mecanismos de dissipação de calor.

5 - CONCLUSÃO

Os resultados sugerem que a ativação de vias angiotensinérgicas centrais através da injeção icv de ANG II provoca efeitos distintos durante o exercício físico conforme a dose administrada. Em doses intermediárias resulta em aumento no desempenho físico demonstrado pelo aumento do tempo de fadiga não acompanhado por alterações na T_c , T_{cauda} , BHR, HSR e TT_cV . Em doses altas, a ANG II central provoca redução no desempenho físico acompanhada de aumento acentuado na T_c , BHR, HSR e TT_cV indicando que a alteração no desempenho se dá em função do agravamento da hipertermia do exercício decorrente da menor capacidade de dissipar calor.

REFERÊNCIAS

- AMERICAN PHYSIOLOGICAL SOCIETY. *Resource book for the design of animal exercise protocols*. 2006.
- ANTUNES-RODRIGUES J; MCCANN S.M. Water, sodium chloride, and food intake induced by injections of cholinergic and adrenergic drugs into the third ventricle of the rat brain. *Proc Soc Exp Biol Med* 133: 1464-1470, 1970.
- BALTHAZAR C.H. *et al.* Performance-enhancing and thermoregulatory effects of intracerebroventricular dopamine in running rats. *Pharmacol Biochem Behav* 93-4: 465-469, 2009.
- BOULANT J.A. Role of the preoptic-anterior hypothalamus in thermoregulation and fever. *Clin Infect Dis* 31-5: 157-161, 2000.
- BRIESE E. Normal body temperature of rats: the setpoint controversy. *Neurosci Biobehav Rev* 22: 427-436, 1998.
- BROOKS G.A.; WHITE T.P. Determination of metabolic and heart rate responses of rat to treadmill exercise. *J Appl Physiol* 45: 1009-1015, 1978.
- CUNHA AG. *Dicionário etimológico da língua portuguesa*. 2^a ed. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1999.
- DE GROOT J.D. *The rat forebrain in the stereotaxic coordinates*. Amsterdam, Noord-Hollandsche Uitg. Mij., 1959.
- FARRELL W.J.; ALBERTS J.R. Rat behavioral thermoregulation integrates with noshivering thermogenesis during postnatal development. *Behav Neurosci* 121-6: 1333-1341, 2007.
- FERNSTROM J.D.; FERNSTROM M.H. Exercise, serum free tryptophan, and central fatigue. *J Nutr* 136-2: 553-559, 2006.
- FOLEY T.E.; FLESHNER M. Neuroplasticity of dopamine circuits after exercise: implications for central fatigue. *Neuromuscular Med* 10-2: 67-80, 2008.
- FREGLY M.J.; ROWLAND N.E. Effect of losartan potassium and deoxycorticosterone acetate on tail skin temperature response to acute administration of angiotensin II. *Pharmacol Biochem Behav* 43: 229-233, 1992.
- FREGLY M.J.; ROWLAND N.E. Centrally mediated vasodilation of the rat's tail by angiotensin II. *Physiol Behav* 60: 861-865, 1996.
- GANDEVIA M. Spinal and supraspinal factors in human muscle fatigue. *Physiol Rev* 81-4: 1725-1789, 2001.

GORDON C.J. Thermal biology of the laboratory rat. *Physiol Behav* 47: 963-991, 1990.

HARTLEY L.H. *et al.* Multiple hormonal responses to graded exercise in relation to physical training. *J Appl Physiol* 33: 602-606, 1972.

HUSSAIN S.O. *et al.* Cardiac function in rat selectively bred for low and high capacity running. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281: 1787-1791, 2001.

JONES A.; WOODS D.R. Skeletal muscle RAS and exercise performance. *Int J Biochem Cell Biol* 35-6: 855-866, 2003.

KAY D.; MARINO F.E. Fluid ingestion and exercise hyperthermia: implications for performance, thermoregulation, metabolism and the development of fatigue. *J Sports Sci* 18-2: 71-82, 2000.

LACERDA A.C.; MARUBAYASHI U.; COIMBRA C.C. Nitric oxide pathways is an important modulator of heat loss in rat during exercise. *Brain Res Bull* 67-2: 106-110, 2005.

LEITE L.H. *et al.* Central angiotensin AT1-receptor blockade affects thermoregulation and running performance in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291-3: 603-607, 2006.

LEITE L.H. *et al.* Central AT1 receptor blockade increases metabolic cost during exercise reducing mechanical efficiency and running performance in rats. *Neuropeptides* 41: 189-194, 2007.

LEITE L.H. *et al.* Central angiotensin AT1 receptors are involved in metabolic adjustments in response to grade exercise in rats. *Peptides* 30: 1931-1935, 2009.

LEITE L.H. *et al.* Central fatigue induced by losartan involves brain serotonin and dopamine content. *Med Sci Sports Exerc* 42-8: 1469-1476, 2010.

McALLISTER R.M.; HIRAI T.; MUSCH T.I. Contribution of endothelium-derived nitric oxide (EDNO) to the skeletal muscle blood flow response to exercise. *Med Sci Sports Exerc* 27-8: 1145-1151, 1995.

McCLESKY E.W. Thermoreceptors: recent heat in thermosensation. *Curr Biol* 7: 679-681, 1997.

McKINLEY M.J. *et al.* The brain renin-angiotensin system: location and physiological roles. *Int J Biochem Cell Biol* 35-6: 901-918, 2003.

MITTLEMAN K.D. Influence of angiotensin II blockade during exercise in the heat. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 72: 542-547, 1996.

- MONTE-SILVA K. *et al.* Dose-dependent inverted U-shaped effect of dopamine (D2-like) receptor activation on focal and nonfocal plasticity in humans. *J Neurosci* 29-9: 6124-6131, 2009.
- NAGASHIMA K. *et al.* Neuronal circuitries involved in thermoregulation. *Auton Neurosci* 85: 18-25, 2000.
- NAGASHIMA K. Central mechanisms for thermoregulation in a hot environment. *Industr Health* 44: 359-367, 2006.
- NIELSEN B.; NYBO L. Cerebral changes during exercise in the heat. *Sports Med* 33: 1-11, 2003.
- NIELSEN B. *et al.* Human circulatory and thermoregulatory adaptations with heat acclimation and exercise in a hot, dry environment. *J Physiol* 460: 467-485, 1993.
- NOAKES T.D. Fluid and electrolyte disturbances in heat illness. *Int J Sports Med* 19-2: 146-149, 1998.
- RICQUIER D. Fundamental mechanisms of thermogenesis. *C R Biol* 329: 578-586, 2006.
- ROMANOVSY A.A. Thermoregulation: some concepts have changed. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292: 37-46, 2007.
- SOARES D.D. *et al.* Evidence that tryptophan reduces mechanical efficiency and running performance in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 74-2: 357-362, 2003.
- SOARES D.D. *et al.* Intracerebroventricular tryptophan increases heating and heat storage rate in exercise rats. *Pharmacol Biochem Behav* 78: 255-261, 2004.
- STEBBINS C.L.; SYMONS J.D. Role of angiotensin II in hemodynamic responses to dynamic exercise in miniswine. *J Appl Physiol* 78: 185-190, 1995.
- STOCKS J.M. *et al.* Human physiological responses to cold exposure. *Aviat Space Environ Med* 75: 444-457, 2004.
- THOMAS W.G.; MENDELSON F.A. Angiotensin receptors: form and function and distribution. *Int J Biochem Cell Biol* 35-6: 774-779, 2003.
- TIDGREN B. *et al.* Renal neurohormonal and vascular responses to dynamic exercise in humans. *J Appl Physiol* 70: 2279-2286, 1991.
- WALTERS T.J. *et al.* Exercise in the heat is limited by a critical internal temperature. *J Appl Physiol* 89: 799-806, 2000.

WEBB P. The physiological of heat regulation. *Am J Physiol* 268: 838-850, 1995.

WILSON N.C. *et al.* Colonic and tail-skin temperature responses of the rat at selected running speeds. *J Appl Physiol* 44: 571-575, 1978.

WILSON K.M.; FREGLY M.J. Factors affecting angiotensin II-induced Hypothermia in rats. *Peptides* 6: 695-701, 1985.

APÊNDICE C

TABELA 3 - Média (\pm EPM) da Taxa de aquecimento corporal (BHR) e Taxa de acúmulo de calor (HSR) durante o exercício físico até a fadiga.

	Salina (n = 8)		ANGII 0,25 μ g (n = 3)		ANGII 1 μ g (n = 3)		ANGII 2 μ g (n = 5)		ANGII 4 μ g (n = 5)	
	Méd	\pm EPM	Méd	\pm EPM	Méd	\pm EPM	Méd	\pm EPM	Méd	\pm EPM
BHR	0,034	0,004	0,046	0,003	0,045	0,014	0,037	0,005	0,074	0,006
HSR	8,514	0,678	8,371	0,944	9,533	3,763	9,437	1,199	21,163	1,060