

Ana Caçado Kunstetter

**O AUMENTO DA TEMPERATURA CEREBRAL INDUZIDO
PELO EXERCÍCIO FÍSICO É EXACERBADO NA
AUSÊNCIA CRÔNICA DOS CANAIS TRPV1
ABDOMINAIS.**

Belo Horizonte
2013

Ana Cançado Kunstetter

**O AUMENTO DA TEMPERATURA CEREBRAL INDUZIDO
PELO EXERCÍCIO FÍSICO É EXACERBADO NA
AUSÊNCIA CRÔNICA DOS CANAIS TRPV1
ABDOMINAIS.**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado em Ciências do Esporte da Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências do Esporte.

Orientador: Dr. Samuel Penna Wanner

Belo Horizonte
2013

O presente estudo foi desenvolvido no Laboratório de Fisiologia do Exercício (LAFISE), da Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional (EEFFTO) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e contou com a colaboração do Dr. Cândido Celso Coimbra (Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo do Instituto de Ciências Biológicas- ICB/UFMG).

Os recursos financeiros necessários para a execução do trabalho foram concedidos pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Coordenação de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

AGRADECIMENTOS

À população brasileira que financiou os meus estudos desde a graduação até o mestrado e que, por intermédio da Coordenação de Pessoal de Nível Superior (CAPES), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) forneceram suporte financeiro para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Nilo Resende Viana Lima por investir na minha formação e por acreditar no meu trabalho e nas minhas capacidades. Você é um exemplo para mim de ética e de preocupação na formação de pessoas. Aprendi muito com você ao longo desses anos: você me ensinou a ser uma pessoa mais proativa e mais preocupada com o coletivo e com o laboratório.

Ao Dr. Samuel Penna Wanner pela motivação e preocupação com o meu trabalho. Obrigado por se dedicar diariamente à minha pesquisa, pelo apoio em todos os momentos, pela confiança, por ouvir minhas reclamações e por agüentar minha agitação e ansiedade. Obrigado pela paciência. Você não é só um exemplo de professor, mas também de ser humano.

Ao Dr. Cândido Celso Coimbra por disponibilizar a infra-estrutura do Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo para a realização dos cortes de tecidos cerebrais e da análise da localização das cânulas guias.

Ao Ms. Ubirajara Fumega pela ajuda no desenvolvimento do método para medida da temperatura cerebral.

Ao Wolmar Gabirobertz Pimenta pela boa vontade, pela ajuda com a solda dos termorresistores e pelas conversas esclarecedoras e divertidas.

Ao Dr. Andrej Romanovsky por fornecer a resiniferatoxina e pela contribuição para as discussões dos resultados.

Aos meus colegas de mestrado por compartilhar os momentos difíceis e alegres, pelas risadas, pelas conversas e até pelas brigas. Vocês me ajudaram a crescer.

À Renata e ao William, grandes amigos e os maiores presentes que recebi de Deus durante o mestrado. Admiro muito a ética e a sensibilidade que vocês têm. A nossa amizade me deu forças para seguir o caminho. Obrigada por me apoiarem, por estarem comigo mesmo nos meus momentos mais chatos. Obrigada pelas discussões polêmicas e pelos “quintecos”. Amo muito vocês.

Aos meus colegas da Natação pelos momentos de descontração, por me ajudar a esquecer um pouco o trabalho e o mestrado e pela dose diária de alegria e bom humor.

Ao Luis Henrique pelo apoio, por acreditar no meu sonho junto comigo. Obrigada pela compreensão, pelo amor e pela disposição em me ajudar. Obrigada por compartilhar comigo todos os momentos bons e ruins. Obrigada pela ajuda com os programas de computador e as formatações dos documentos. Amo você.

Aos meus pais por se preocuparem sempre com a minha educação e por não pouparem esforços para investir na minha formação profissional e pessoal. Eu aprendi com vocês o valor da educação, do conhecimento e que esse é o melhor meio para crescer como ser - humano. Obrigada por me apoiarem e por confiarem na minha escolha mesmo com o coração apertado por não saber direito aonde esse caminho vai me levar.

Às minhas irmãs pelo companheirismo, pelas brigas e discussões. Vocês me ajudaram a ser o que eu sou hoje.

A Deus por estar comigo em todos os momentos. Por estar perto mesmo quando eu estava longe. Obrigada por acreditar em mim mesmo quando eu mesmo não acreditava. Obrigada por me amar incondicionalmente, pela sua misericórdia, por estar ao meu lado buscando fazer de mim uma pessoa melhor e me mostrando que tudo tem um propósito. Obrigada por todos os dons que me destes os quais me capacitaram a estar aqui hoje.

RESUMO

O objetivo do primeiro delineamento experimental foi investigar o efeito da intensidade do exercício realizado em ambiente termoneutro sobre o aumento da temperatura cerebral. Nove ratos Wistar receberam o implante de uma cânula guia no córtex frontal direito e foram submetidos ao exercício até a interrupção voluntária do esforço (IVE) em três diferentes intensidades: 18 m/min (V18), 21 m/min (V21) e 24 m/min (V24). A temperatura cerebral foi medida por meio de um termorresistor inserido através da cânula guia. Com o aumento da intensidade do exercício, foram observadas reduções no tempo total de exercício (V24: 62 ± 11 min *versus* V21: 149 ± 14 min *versus* V18: 207 ± 15 min; $p < 0,001$) e maiores taxas de aumento da temperatura cerebral (V24: $0,058 \pm 0,009^{\circ}\text{C}/\text{min}$ *versus* V18: $0,017 \pm 0,002^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e V21: $0,021 \pm 0,002^{\circ}\text{C}/\text{min}$; $p < 0,001$). Contudo, a temperatura cerebral no momento da IVE não foi diferente entre as três intensidades (médias entre $40,1$ e $40,4^{\circ}\text{C}$). Assim, em ambiente termoneutro, a intensidade do exercício influencia taxa de aumento da temperatura cerebral, mas não modifica o valor de temperatura cerebral no qual o esforço é interrompido. No segundo delineamento, foi investigado se as lesões causadas pelo implante crônico da cânula guia ou pela inserção aguda do termorresistor no cérebro afetam o desempenho físico. Doze ratos foram alocados em um grupo que recebeu o implante da cânula guia ou em outro que não foi submetido a procedimentos cirúrgicos (controle). O implante da cânula guia, assim como a inserção do termorresistor, não afetou a velocidade máxima de corrida em relação ao grupo controle e ao primeiro exercício realizado antes da cirurgia (Primeiro exercício: $28,6 \pm 0,9$ m/min *versus* Cânula: $28,6 \pm 1,4$ m/min *versus* Termorresistor: $29,1 \pm 1,4$ m/min; $p = 0,977$). Esses resultados indicam que o método utilizado para a medida da temperatura cerebral não afeta o desempenho físico dos animais. No terceiro delineamento, o objetivo foi avaliar se os canais TRPV1 periféricos estão envolvidos na regulação da temperatura interna e do desempenho durante o exercício físico em ambiente termoneutro e quente. Vinte e oito ratos que receberam o implante de uma cânula guia cerebral foram submetidos a dois protocolos de exercício: progressivo ou constante. Dentro de cada protocolo, os ratos receberam uma injeção de resiniferatoxina (RTX: $20 \mu\text{g}/\text{kg}$ i.p.) para dessensibilizar os canais TRPV1 periféricos ou foram tratados com veículo. A dessensibilização não afetou o desempenho físico em nenhum protocolo de exercício ou temperatura ambiente. Entretanto, nos dois protocolos de exercício, os animais dessensibilizados apresentaram atraso no início do aumento da temperatura da pele da cauda

(exercício progressivo em ambiente termoneutro: minuto 14: RTX: $26,85 \pm 0,93^{\circ}\text{C}$ *versus* Controle: $30,28 \pm 0,89^{\circ}\text{C}$; $p < 0,05$) e maior aumento da temperatura cerebral, sendo que no exercício progressivo as diferenças na temperatura cerebral entre os grupos persistiram até a IVE (RTX: $39,85 \pm 0,23^{\circ}\text{C}$ *versus* Controle: $38,99 \pm 0,20^{\circ}\text{C}$; $p < 0,05$). Portanto, a dessensibilização dos canais TRPV1 periféricos afeta a termorregulação durante o exercício, sem modificar o desempenho físico.

Palavras-Chave: Desempenho físico. TRPV1. Dessensibilização. Corrida. Esteira rolante.

ABSTRACT

The first experimental design was aimed at evaluating the cortical brain temperature during different exercise intensities performed at thermoneutral conditions. Nine male Wistar rats were implanted with a cerebral guide cannula into the right frontal cortex and were subjected to running exercises until the voluntary interruption of effort (VIE) at three different speeds: 18 m/min (V18), 21 m/min (V21), and 24 m/min (V24). Brain temperature was measured by a thermistor inserted through the guide cannula. The highest exercise intensity was associated with a decreased total exercise time (V24: 62 ± 11 min *versus* V21: 149 ± 14 min *versus* V18: 207 ± 15 min; $p < 0.001$) and with higher rates of increase in brain temperature relative to the lower exercise intensities (V24: $0.058 \pm 0.009^\circ\text{C}/\text{min}$ *versus* V18: $0.017 \pm 0.002^\circ\text{C}/\text{min}$ and V21: $0.021 \pm 0.002^\circ\text{C}/\text{min}$; $p < 0.001$). However, the exercise intensity did not affect brain temperature at the IVE (mean values between 40.1 and 40.4°C). Therefore, at thermoneutral conditions, exercise intensity influences the rate of increase in brain temperature, without affecting the absolute values measured when the effort was voluntarily interrupted. The second set of experiments investigated if the lesions caused by the chronic implantation of a guide cannula or by the acute insertion of a thermistor into the brain affect exercise performance. Twelve rats were divided in two groups: a group that had a guide cannula implanted in the right frontal cortex, and another group that was not operated (control) The maximal treadmill velocity attained was not changed by the implant of the guide cannula or by the insertion of the thermistor when compared to the control group or to the first exercise performed before the surgery (First test: 28.6 ± 0.9 m/min *versus* Cannula: 28.6 ± 1.4 m/min *versus* Thermistor: 29.1 ± 1.4 m/min, $p = 0.977$). This results indicate that the experimental procedures used for measuring brain temperature do not affect the exercise performance. The third set of experiments was aimed at evaluating if the peripheral TRPV1 channels modulate the thermoregulation and physical performance during exercise performed at thermoneutral and warm environments. Twenty eight rats that were implanted with a cerebral guide cannula were subjected to two exercise protocols (progressive- or constant-speed) at two environmental conditions. During each protocol, the rats were treated with resiniferatoxin (RTX: 20 µg/kg i.p.) to desensitized the peripheral TRPV1 channels or were treated with vehicle. The treatment with RTX did not change the physical performance in either exercise protocol at both ambient temperatures. However, during the two exercises protocols, the desensitized rats presented a delay in the initial increase in tail skin temperature (progressive-

speed exercise at thermoneutral conditions: minute 14: RTX: $26.85 \pm 0.93^{\circ}\text{C}$ *versus* Control: $30.28 \pm 0.89^{\circ}\text{C}$; $p < 0.05$) and high values of brain temperature during exercise. This enhanced running hyperthermia persisted until the VIE during progressive-speed exercise (at thermoneutral conditions: RTX: $39.85 \pm 0.23^{\circ}\text{C}$ *versus* Control: $38.99 \pm 0.20^{\circ}\text{C}$; $p < 0.05$). Therefore, the desensitization of peripheral TRPV1 channels modulates thermoregulation during exercise, without affecting physical performance.

Keywords: Physical performance. TRPV1. Desensitization. Treadmill running.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1. Linha do tempo referente ao delineamento experimental 1.....	29
FIGURA 2. Linha do tempo referente ao delineamento experimental 2.....	30
FIGURA 3. Protocolos experimentais contidos no terceiro delineamento experimental.....	31
FIGURA 4. Linha do tempo referente ao delineamento experimental 3.....	32
FIGURA 5. Fotomicrografias de secções cerebrais coronais coradas com cresil violeta	45
FIGURA 6. Desenhos esquemáticos de secções cerebrais coronais, nos quais a localização da ponta do termorresistor está representada para cada um dos 9 animais do delineamento 1.....	46
FIGURA 7. Desenhos esquemáticos de secções cerebrais coronais, nas quais a extensão das lesões provocadas pelo implante da cânula guia e pela inserção aguda do termorresistor no cérebro está representada.....	56
FIGURA 8. Desenhos esquemáticos de secções cerebrais coronais, nos quais a localização da ponta do termorresistor está representada para cada um dos 14 animais utilizados no protocolo 1.	62
FIGURA 9. Desenhos esquemáticos de secções cerebrais coronais, nos quais a localização da ponta do termorresistor está representada para cada um dos 14 animais utilizados no protocolo 2	76
GRÁFICO 1. Correlação entre as coordenadas dorso-ventral e ântero-posterior e os parâmetros termorregulatórios: temperatura inicial e variação de temperatura durante o exercício	47
GRÁFICO 2. (A) Tempo total de exercício de ratos submetidos à corrida na esteira rolante com três velocidades constantes (18, 21 e 24 m/min). (B) Percentual de animais que permaneciam correndo em diferentes tempos de exercício para cada velocidade de corrida estudada.....	50
GRÁFICO 3. Temperatura cerebral de ratos durante a realização do exercício na esteira rolante com três velocidades constantes.	52
GRÁFICO 4. Temperatura cerebral de ratos, submetidos ao exercício em esteira rolante em três diferentes velocidades, durante o período de 30 minutos pós-exercício.	52
GRÁFICO 5. (A) Taxa de aumento na temperatura cerebral de ratos submetidos a três exercícios de velocidade constante na esteira rolante. (B) Correlação entre taxa de aumento na temperatura cerebral e tempo total de exercício para cada velocidade de corrida estudada. ...	54
GRÁFICO 6. Velocidade máxima de corrida atingida pelos animais controles durante o exercício inicial, o segundo e o terceiro exercícios e velocidade máxima atingida pelos animais do	

grupo Operado durante o exercício inicial, o exercício com a cânula implantada e o exercício com a inserção do termorresistor através da cânula guia.	59
GRÁFICO 7. Temperatura cerebral de ratos durante o exercício com velocidade constante de 24 m/min, e durante o exercício com aumentos progressivos da velocidade.....	60
GRÁFICO 8. Velocidade máxima atingida pelos animais dos grupos Controle e RTX durante os exercícios com aumentos progressivos da velocidade	65
GRÁFICO 9. Trabalho realizado pelos animais dos grupos Controle e RTX durante os exercícios com aumentos progressivos da velocidade.....	66
GRÁFICO 10. Temperatura cerebral e temperatura da pele da cauda de ratos dos grupos Controle e RTX durante o exercício com aumentos progressivos da velocidade realizado em ambiente termoneutro.....	68
GRÁFICO 11. IDC de ratos dos grupos Controle e RTX durante o exercício com aumentos progressivos da velocidade realizado em ambiente termoneutro.	69
GRÁFICO 12. Temperatura cerebral e temperatura da pele da cauda de ratos dos grupos Controle e RTX durante o exercício com aumentos progressivos da velocidade realizado em ambiente quente..	71
GRÁFICO 13. Curvas representando a temperatura da pele da cauda em função da temperatura cerebral medidas durante os exercícios com aumentos progressivos da velocidade realizados em ambiente termoneutro e quente.....	73
GRÁFICO 14. Tempo total de exercício dos animais dos grupos Controle e RTX durante os exercícios com velocidade constante.....	79
GRÁFICO 15. Trabalho realizado pelos animais dos grupos Controle e RTX durante os exercícios com velocidade constante.....	80
GRÁFICO 16. Temperatura cerebral e temperatura da pele da cauda de ratos dos grupos Controle e RTX durante o exercício com velocidade constante realizado em ambiente termoneutro....	82
GRÁFICO 17. IDC de ratos durante o exercício com velocidade constante realizado em ambiente termoneutro pelos animais dos grupos Controle e RTX.....	83
GRÁFICO 18. Temperatura cerebral e temperatura da pele da cauda de ratos dos grupos Controle e RTX durante o exercício com velocidade constante realizado em ambiente quente.....	85
GRÁFICO 19. Curvas representando a temperatura da pele da cauda em função da temperatura cerebral medidas durante os exercícios com velocidade constante realizados em ambiente termoneutro e quente.	86

GRÁFICO 20. Percentual de alteração na ingestão alimentar induzida por CCK nos ratos dos grupos controle e RTX	88
GRÁFICO 21. Número de movimentos com as patas para limpar os olhos, após a aplicação de 20 µl de NH ₄ OH 1% nos olhos, realizados pelos animais dos grupos controle e RTX	89
QUADRO 1. Quadrado latino utilizado durante o delineamento experimental 1.....	28

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Valores médios da temperatura ambiente no início do exercício e no momento da IVE durante a corrida na esteira realizada em três diferentes velocidades, e valores médios da massa corporal dos animais no dia da realização desses experimentos.	48
TABELA 2. Valores médios da temperatura ambiente no início do exercício e no momento da IVE durante os três exercícios com aumentos progressivos da velocidade. A tabela mostra ainda os valores médios da massa corporal dos animais de cada grupo.....	57
TABELA 3. Valores médios das coordenadas médio-laterais, dorso-ventrais e ântero-posteriores referentes à localização da ponta do termorresistor dos animais dos grupos Controle e RTX.	61
TABELA 4. Valores médios da temperatura ambiente no início e no momento da IVE durante os três exercícios com aumentos progressivos da velocidade realizados pelos animais dos grupos RTX e Controle. A tabela mostra ainda os valores médios da massa corporal dos animais de cada grupo.....	64
TABELA 5. Valores médios das coordenadas médio-laterais, dorso-ventrais e ântero-posteriores referentes à localização da ponta do termorresistor dos grupos Controle e RTX.	75
TABELA 6. Valores médios da temperatura ambiente no início e no momento da IVE durante os três exercícios com velocidade constante realizados pelos animais dos grupos RTX e Controle. A tabela ainda mostra os valores médios da massa corporal dos animais de cada grupo.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS

AID- córtex agranular insular dorsal

AIV- córtex agranular insular ventral

capsaicina- Capsaicina

CCK- colecistoquinina

CPu- caudado putamen

DI- córtex insular disgranular

FR3- área frontal 3

fmi- corpo caloso

IVE- interrupção voluntária do esforço

LO- córtex lateral orbital

M1- córtex motor primário

RTX- Resineferatoxina

S1J- córtex somatossensorial primário

TRPV1- Receptor de potencial transiente vanilóide 1

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Revisão de literatura	17
1.2	Objetivos	26
1.2.1	<i>Geral</i>	26
1.2.2	<i>Específicos</i>	26
2	MÉTODOS	27
2.1	Animais	27
2.2	Cuidados éticos	27
2.3	Delineamentos experimentais	27
2.3.1	<i>Delineamento experimental 1</i>	28
2.3.2	<i>Delineamento experimental 2</i>	29
2.3.3	<i>Delineamento experimental 3</i>	30
2.4	Procedimentos	32
2.4.1	<i>Delineamentos experimentais 1 e 2</i>	32
2.4.1.1	<u>Implante de cânula guia cerebral</u>	32
2.4.1.2	<u>Familiarização ao exercício em esteira rolante</u>	33
2.4.1.3	<u>Exercícios até a interrupção voluntária do esforço</u>	34
2.4.1.3.1	Exercício com velocidade constante.....	34
2.4.1.3.2	Exercício com aumentos progressivos da velocidade	34
2.4.1.4	<u>Situação repouso</u>	35
2.4.1.5	<u>Eutanásia</u>	35
2.4.2	<i>Delineamento experimental 3</i>	36
2.4.2.1	<u>Implante da cânula guia cerebral</u>	36
2.4.2.2	<u>Dessensibilização dos canais TRPV1</u>	36
2.4.2.3	<u>Familiarização ao exercício em esteira rolante</u>	37

2.4.2.4	<u>Exercícios até a interrupção voluntária do esforço</u>	37
2.4.2.4.1	Exercício com aumentos progressivos da velocidade	37
2.4.2.4.2	Exercício com velocidade constante	37
2.4.2.5	<u>Confirmação da dessensibilização</u>	38
2.4.2.6	<u>Eutanásia</u>	38
2.5	Verificação histológica	38
2.6	Variáveis	39
2.6.1	<i>Variáveis medidas</i>	39
2.6.1.1	<u>Massa corporal</u>	39
2.6.1.2	<u>Tempo total de exercício</u>	39
2.6.1.3	<u>Temperatura cerebral</u>	39
2.6.1.4	<u>Temperatura ambiente</u>	40
2.6.1.5	<u>Temperatura da pele da cauda</u>	40
2.6.2	<i>Variáveis calculadas</i>	40
2.6.2.1	<u>Taxa de elevação da temperatura cerebral (TETc)</u>	40
2.6.2.2	<u>Índice de dissipação de calor</u>	41
2.6.2.3	<u>Velocidade máxima de corrida</u>	41
2.6.2.4	<u>Trabalho</u>	42
2.7	Análise estatística	42
2.7.1	<i>Delineamentos experimentais 1 e 2</i>	42
2.7.2	<i>Delineamento experimental 3</i>	43
3	RESULTADOS	44
3.1	Delineamento experimental 1	44
3.1.1	<i>Análise histológica</i>	44
3.1.2	<i>Temperatura ambiente e massa corporal</i>	48
3.1.3	<i>Desempenho e temperatura cerebral</i>	48
3.2	Delineamento experimental 2	55

3.2.1	<i>Análise histológica</i>	55
3.2.2	<i>Temperatura ambiente e massa corporal</i>	57
3.2.3	<i>Desempenho</i>	57
3.3	Delineamento experimental 3	60
3.3.1	<i>Protocolo 1</i>	60
3.3.1.1	<u>Análise histológica</u>	60
3.3.1.2	<u>Temperatura ambiente e massa corporal</u>	63
3.3.1.3	<u>Desempenho</u>	64
3.3.1.4	<u>Termorregulação</u>	66
3.3.2	<i>Protocolo 2</i>	74
3.3.2.1	<u>Análise histológica</u>	74
3.3.2.2	<u>Temperatura ambiente e massa corporal</u>	77
3.3.2.3	<u>Desempenho</u>	78
3.3.2.4	<u>Termorregulação</u>	80
3.3.3	<i>Testes de dessensibilização</i>	87
4	DISCUSSÃO	90
5	CONCLUSÕES	103
	REFERÊNCIAS	104

1 INTRODUÇÃO

1.1 Revisão de literatura

Animais homeotérmicos, dentre os quais estão incluídos os seres humanos, controlam sua temperatura corporal interna dentro de limites estreitos, mesmo quando são expostos a uma variação ampla de temperaturas ambientes. Essa capacidade de regular precisamente a temperatura interna é importante para a manutenção da homeostase e, principalmente, das funções cerebrais (GISOLFI; MORA, 2000; KIYATKIN, 2007). Grandes oscilações da temperatura interna que ultrapassam esses limites estreitos sugerem a existência de uma condição patológica (ROMANOVSKY *et al.*, 2007), mas também podem ocorrer em animais homeotérmicos saudáveis ao realizarem exercício físico.

O exercício físico acelera a taxa de produção de calor, levando a um aumento da temperatura interna que pode rapidamente atingir 40°C dependendo da intensidade e da duração do esforço, assim como da temperatura ambiente em que o mesmo é realizado (GALLOWAY; MAUGHAN, 1997; NYBO *et al.*, 2001a). Essa hipertermia induzida pelo exercício estimula mecanismos de defesa dos animais, os quais aumentam a sensação de fadiga, contribuindo para a interrupção do esforço ou para a redução de sua intensidade. No entanto, em situações extremas (geralmente quando o animal não pode optar pela interrupção do exercício), uma hipertermia severa pode comprometer o funcionamento de vários órgãos e aumentar a permeabilidade das barreiras gastrointestinal e hematoencefálica (WATSON *et al.*, 2005; LEON; HELWING, 2010), produzindo resposta inflamatória exacerbada e edema cerebral (KIYATKIN; SHARMA, 2009) que podem levar à perda de consciência e à morte (ARMSTRONG *et al.*, 2007).

As alterações na temperatura interna, medida na cavidade abdominal, promovidas pelo exercício físico vêm sendo amplamente estudadas em diversos trabalhos realizados em nosso laboratório (RODRIGUES *et al.*, 2003; PIRES *et al.*, 2007; WANNER *et al.*, 2007; PIRES *et al.*, 2010; GUIMARÃES *et al.*, 2013). Esses trabalhos observaram que a temperatura abdominal é mantida entre 38,5 e 39,0°C durante os exercícios realizados em ambiente termoneutro (PIRES *et al.*, 2007; PIRES *et al.*, 2011) e que o aumento da intensidade e/ou da temperatura ambiente em que o exercício é realizado leva a maiores taxas de aumento da temperatura abdominal (RODRIGUES *et al.*, 2003). Além disso, Rodrigues *et al.* (2003)

mostraram que a temperatura abdominal atinge valores próximos de 40°C durante exercícios realizados em ambiente termoneutro e pode atingir valores próximos a 41°C durante esforços realizados em ambiente quente. O alcance desses valores elevados de temperatura pode representar um risco para a integridade de diversos tecidos corporais, mas principalmente para o tecido cerebral, uma vez que esse tecido é altamente sensível ao calor (KIYATKIN, 2007). Sendo assim, nós questionamos se, durante o exercício, a temperatura medida no cérebro aumentaria da mesma forma que a temperatura medida no abdômen. A nossa hipótese era que, durante o exercício, a temperatura cerebral seria mantida em valores menores do que aqueles previamente observados para a temperatura abdominal, o que protegeria o cérebro contra o dano térmico e permitiria ao animal sustentar o exercício por um maior período de tempo.

Devido ao fato de o tecido cerebral apresentar uma menor sensibilidade térmica, é sugerido que a temperatura cerebral seja um fator importante, dentre outros, envolvido na determinação da duração do exercício de intensidade moderada à alta, principalmente quando este é realizado em ambiente quente e sustentado por um tempo prolongado (CAPUTA *et al.*, 1996; NYBO, 2011). O aumento da temperatura cerebral está associado a alterações na função cerebral (NYBO; NIELSEN, 2001b; FTAITI *et al.*, 2010) e pode direta ou indiretamente inibir a atividade de áreas cerebrais responsáveis pelo controle motor, como o córtex frontal (NYBO; NIELSEN 2001a). Além disso, Nybo e Nielsen (2001b) sugerem que, durante o exercício, um maior aumento da temperatura cerebral está relacionado com uma maior percepção subjetiva do esforço.

O aumento da temperatura do cérebro induzido pelo exercício pode também afetar a função de outras estruturas cerebrais que não estão envolvidas diretamente no controle motor, tais como o córtex piriforme, o córtex temporal, o hipotálamo e o hipocampo (KIYATKIN; SHARMA, 2009). De fato, a temperatura cerebral influencia diretamente a atividade neuronal e sugere-se que a capacidade de regular a temperatura cerebral em uma faixa estreita de variação tenha sido essencial para o desenvolvimento e funcionamento de um cérebro com circuitos e conexões mais complexos ao longo da evolução. O cérebro com maior número de células e conexões tornou-se capaz de controlar de forma integrada sistemas fisiológicos mais complexos, como os sistemas endócrinos, termorregulatório, somatossensorial e motor (GISOLFI; MORA, 2000). Dessa forma, o aumento na temperatura cerebral para valores acima de 40°C pode comprometer não apenas a função motora, como também a regulação de diversos sistemas fisiológicos. Portanto, é importante compreender qual é a magnitude das alterações da temperatura cerebral promovidas pelo exercício e quais fatores podem afetar a

regulação da temperatura cerebral em animais submetidos ao esforço físico. Contudo, até o momento, somente um estudo realizado em nosso laboratório mediu a temperatura cerebral durante o exercício (FONSECA, 2012). Sendo assim, no presente estudo, antes de investigar um possível fator envolvido na regulação da temperatura cerebral durante o exercício, dois delineamentos experimentais foram realizados com o objetivo de se avaliar a sensibilidade do nosso método para medida da temperatura cerebral, bem como a influência do mesmo sobre o desempenho físico.

Vários estudos mediram a temperatura cerebral em ratos durante o exercício, sendo que a maioria desses experimentos foram realizados em ambiente quente (CAPUTA *et al.*, 1991; FULLER *et al.*, 1998; WALTERS *et al.*, 1998a; WALTERS *et al.*, 2000) ou compararam a magnitude da hipertermia induzida pelo exercício realizado na mesma intensidade em duas diferentes temperaturas ambientes (WALTERS *et al.*, 1998b; HASEGAWA *et al.*, 2008). Como esperado, valores elevados de temperatura cerebral foram associados com a redução do desempenho físico no calor (WALTERS *et al.*, 2000), e observou-se que o aumento da temperatura cerebral foi maior durante a corrida realizada em ambiente quente em comparação ao ambiente frio (HASEGAWA *et al.*, 2008) e ao termoneutro (WALTERS *et al.*, 1998). Entretanto, nenhum estudo investigou a resposta da temperatura cerebral durante diferentes intensidades de exercício em uma temperatura ambiente fixa, contida dentro da faixa de termoneutralidade de ratos. Esse foi o primeiro objetivo do primeiro delineamento experimental e a nossa hipótese era que maiores intensidades de exercício iriam induzir maior aumento e/ou aumento mais rápido da temperatura cerebral durante a corrida, o que reduziria a capacidade do animal de sustentar o esforço físico.

Os procedimentos utilizados, no presente estudo, para medida da temperatura cerebral lesionaram áreas corticais envolvidas na modulação da atividade motora, tais como o córtex motor primário e outras regiões do córtex pré-frontal (NONNEMAN; CORWIN 1983; RHODES *et al.*, 2003). Já foi demonstrado que animais com livre acesso à corrida na roda de atividade apresentam um aumento na atividade neuronal do córtex pré-frontal quando o acesso à roda é bloqueado, sugerindo que esta estrutura cerebral está envolvida na motivação para o exercício voluntário (RHODES *et al.*, 2003). Além disso, Nonneman e Corwin (1981) mostraram que lesões no córtex pré-frontal de ratos promoveram um aumento na atividade voluntária realizada na roda. Portanto, é possível que as lesões no córtex frontal provocadas pelo implante da cânula guia e/ou pela inserção aguda do termorresistor no cérebro possam alterar o desempenho durante a corrida na esteira. Dessa forma, o objetivo do segundo

delineamento experimental foi verificar qual é o impacto dos procedimentos utilizados para a medida da temperatura cerebral sobre o desempenho físico de ratos.

Após verificar se o método utilizado para medida da temperatura cerebral é sensível aos efeitos da intensidade do exercício e se as lesões provocadas pelo termorresistor e pela cânula guia afetam o desempenho físico dos animais, nós realizamos o terceiro delineamento experimental com o objetivo de avaliar se a ausência de parte das aferências provenientes do abdômen envolvidas no controle dos efetores termorregulatórios afeta a regulação da temperatura cerebral durante o exercício.

É bem aceito que o controle da temperatura corporal depende da percepção da temperatura local por receptores presentes principalmente nas terminações nervosas localizadas na pele, nos órgãos internos e no sistema nervoso central. Quando esses receptores são ativados, potenciais de ação são gerados no neurônio termossensível e esses impulsos nervosos são conduzidos, por meio de vias aferentes, até os núcleos cerebrais envolvidos no controle da resposta termofetora (ROMANOVSKY *et al.*, 2009). Em conjunto, a informação térmica aferente proveniente de diversos locais do corpo coordena as respostas termofetoras e, dessa forma, a regulação da temperatura corporal interna. Estudos do nosso laboratório vêm procurando entender as vias cerebrais eferentes envolvidas no controle dos efetores termorregulatórios (PIRES *et al.*, 2007; WANNER *et al.*, 2007; GUIMARÃES *et al.*, 2013). Porém, ainda não foi investigada a participação das vias sensoriais aferentes, envolvidas na condução de estímulos térmicos, na termorregulação e no desempenho durante o exercício físico.

Dentre os receptores envolvidos na percepção da temperatura de diversos locais do corpo, pode-se citar os canais iônicos sensíveis à variação de temperatura, denominados receptores de potencial transiente (TRP). A família dos canais TRP é constituída de aproximadamente 30 proteínas, divididas em seis subfamílias. Dentre os canais TRP, nove são altamente sensíveis à temperatura, sendo que dois deles são ativados pelo frio (TRPM8 e TRPA1) e sete são ativados pelo calor (TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPM2, TRPM4 e TRPM5). Conjuntamente, esses canais conseguem perceber variações de temperatura que vão do frio nocivo ao calor nocivo (ROMANOVSKY *et al.*, 2007). Todos os canais TRP termossensíveis são ativados em resposta a variações na temperatura local, sendo cada canal sensível a uma determinada faixa de temperatura.

O presente estudo focará no canal TRPV1 que foi isolado e identificado por Caterina *et al.* (1997). Esses autores mostraram, em estudos *in vitro*, que o canal TRPV1 é sensível a uma faixa de temperatura que corresponde ao calor nocivo (43°C). Além de ser ativado pelo

calor, o TRPV1 também é sensível à redução do pH extracelular e ao aumento do pH intracelular (DHAKA *et al.*, 2009); a ligantes exógenos, conhecidos como vanilóides, por exemplo, capsaicina e resiniferatoxina (CATERINA *et al.*, 1997; CATERINA *et al.*, 2000); e a ligantes endógenos (produtos da lipoxigenase, anandamida e N-acyl-dapaminas), denominados, em conjunto, de endovanilóides (CATERINA; JULIUS, 2001; Van Der STELT; Di MARZO, 2004). Quando um destes fatores se liga a sítios específicos presentes na molécula do TRPV1, esse canal é aberto, gerando um influxo de cálcio nas células que expressam o TRPV1 e promovendo despolarização da membrana celular (CATERINA; JULIUS, 2001; NUMAZAKI; TOMINAGA, 2004).

Os canais TRPV1 estão presentes principalmente em fibras nervosas mielinizadas (tipo A δ) e não mielinizadas (tipo C) de nociceptores, cujos corpos neurais estão no gânglio da raiz dorsal e no gânglio trigeminal (CATERINA *et al.*, 1997). Contudo, também já foi demonstrada expressão desses receptores no nervo vago, no gânglio nodoso e no núcleo do trato solitário (SZALLASI *et al.*, 1995; PELES *et al.*, 2009). Além disso, os canais TRPV1 também estão presentes em tecidos não neuronais como os músculos esqueléticos (LUO *et al.*, 2011), o trato urinário e o estômago (ROMANOVSKY *et al.*, 2009).

Devido ao fato de estarem expressos principalmente em nociceptores, os canais TRPV1 são importantes mediadores da percepção de diversos estímulos nocivos (TOMINAGA *et al.*, 1998; CATERINA *et al.*, 2000). Já foi demonstrado que a ativação desse canal pela administração de agonistas exógenos provoca comportamentos associados à sensação de dor, além de provocar inflamação no local da injeção (CATERINA; JULIUS, 2000). Devido ao seu importante papel na modulação da dor, o canal TRPV1 vem recebendo atenção nos dias atuais (CATERINA *et al.*, 2000). Antagonistas desse canal estão sendo desenvolvidos para serem utilizados como potentes analgésicos. Estudos clínicos observaram que o bloqueio farmacológico dos canais TRPV1 produziu analgesia após extração do dente molar (modelo de dor aguda causada por cirurgia); no entanto, todos os indivíduos tratados com o antagonista apresentaram hipertermia duradoura, sendo que em um voluntário a temperatura interna atingiu valores superiores a 40°C (GAVVA *et al.*, 2008). Esse efeito colateral de aumento da temperatura interna é consequência da diminuição da dissipação de calor e do aumento da termogênese (GAVVA *et al.*, 2007; STEINER *et al.*, 2007), sugerindo que os canais TRPV1 estão tonicamente ativos *in vivo*, inibindo as vias de produção e conservação do calor, estimulando as vias de dissipação de calor e, portanto, contribuindo para a manutenção da temperatura interna dentro de uma estreita faixa de variação (STEINER *et al.*, 2007). A administração de antagonistas remove essa ação tônica do TRPV1 sobre os

efetores termorregulatórios, provocando hipertermia. Embora esses resultados pareçam contrastar com a observação de que o canal TRPV1 é ativado pelo calor nocivo (CATERINA *et al.*, 1997), Garami *et al.* (2010) indicam que a ativação desses receptor por prótons e/ou outros ligantes endógenos parece ter papel determinante na manutenção da atividade tônica do canal em comparação com a ativação mediada pelo estímulo térmico. Esses efeito colateral de hipertermia vem limitando, até o momento, o uso de antagonistas do canal TRPV1 para o tratamento da dor.

Embora o canal TRPV1 só tenha sido identificado em 1997, os efeitos da capsaicina e da resiniferatoxina (RTX) sobre a temperatura corporal são conhecidos desde a década de 1970 (JANCSÓ-GABOR, *et al.*, 1970a; DONNERER; LEMBECK, 1983) e 1980 (SZALLASI; BLUMBERG, 1989), respectivamente. A capsaicina é uma substância presente nas pimentas vermelhas, sendo responsável pela sensação picante provocada por esse condimento. Já a RTX é derivada de plantas do gênero *Euphorbia* e é um agonista do canal TRPV1 20 vezes mais potente do que a capsaicina (CATERINA *et al.*, 1997). Já foi mostrado que a capsaicina e a RTX provocam diminuição da temperatura interna (DONNERER; LEMBECK, 1983; WOODS *et al.*, 1994; ALMEIDA *et al.* 2006), aumento da dissipação de calor (JANCSÓ-GABOR *et al.*, 1970a; DONNERER; LEMBECK, 1983), e redução na taxa de consumo de oxigênio (WOODS *et al.*, 1994; ROMANOVSKY *et al.*, 2009). Além disso, a administração de RTX levou à escolha por uma menor temperatura ambiente de preferência (ALMEIDA *et al.*, 2006). Esses efeitos dos agonistas sobre a regulação da temperatura interna não são observados nos animais *knockouts* para o TRPV1, sugerindo que esse canal é responsável por mediar as respostas provocadas pela capsaicina e RTX (CATERINA *et al.*, 2000).

Foi observado que o efeito hipotérmico causado pela administração de capsaicina ou RTX não é observado em animais que receberam doses baixas dessas drogas por dias consecutivos ou doses elevadas em uma única injeção (JANCSÓ-GÁBOR *et al.*, 1970a; JANCSÓ-GÁBOR *et al.*, 1970b; COMARECHE *et al.*, 1985; SZALLASI; BLUMBERG, 1989; STEINER *et al.*, 2007). O fenômeno que caracteriza essa ausência de respostas do animal à capsaicina ou à RTX, após a administração sucessiva ou de doses elevadas dessas drogas, é conhecido como dessensibilização dos canais TRPV1 ou dos neurônios que expressam o TRPV1 (ROMANOVSKY *et al.*, 2009). É sugerido que o processo de dessensibilização dos canais TRPV1 ocorre por dois mecanismos: a) inativação do canal TRPV1, tornando-o insensível aos diversos fatores endógenos e exógenos que promovem sua abertura; b) inativação ou morte do neurônio que expressa os canais TRPV1 (WINTER *et al.*,

1995). O primeiro processo parece ocorrer mais rapidamente e envolve a desfosforilação do canal TRPV1 mediada por proteínas dependentes de cálcio como a calcineurina (NUMAZAKI *et al.*, 2003; MOHAPATRA; NAU, 2005). Com relação à perda de função ou morte dos neurônios que expressam o TRPV1, já foi mostrado que a capsaicina é uma neurotoxina capaz de destruir os neurônios nociceptores (CATERINA *et al.*, 1997). Caterina *et al.* (1997) observaram que neurônios sensoriais, bem como outras células que expressam o TRPV1, morrem após algumas horas quando tratadas com capsaicina. Também já foi mostrado que o tratamento com doses elevadas de capsaicina, tanto em animais recém-nascidos quanto em animais adultos, promove redução no número de neurônios não mielinizados de pequeno diâmetro e no número de neurônios que expressam o TRPV1 no gânglio da raiz dorsal (JANCSÓ *et al.*, 1995; YAMASHITA *et al.*, 2008) e no gânglio nodoso (CZAJA *et al.*, 2008). Além disso, Szallasi *et al.* (1995) verificaram redução de sítios de ligação da RTX em secções da medula espinhal e em gânglios sensoriais isolados de ratos pré-tratados com capsaicina ou RTX. A perda na função do neurônio pode ocorrer devido à alterações morfológicas provocadas pela injeção de doses elevadas de capsaicina ou RTX, como o aumento do volume da mitocôndria (SZALLASI *et al.*, 1989; CZAJA *et al.*, 2008) e alterações na membrana celular e nas organelas citoplasmáticas (JANCSÓ *et al.*, 1995). Essas alterações morfológicas modificam enzimas e outros canais expressos pelos neurônios, levando à perda das suas funções neuronais e/ou à morte celular por necrose ou apoptose (JANCSÓ *et al.*, 1995; CZAJA *et al.*, 2008).

Os efeitos da dessensibilização dos receptores sensíveis à capsaicina na termorregulação também já vem sendo estudado desde a década de 1970 (JANCSO-GÁBOR *et al.*, 1970a; JANCSO-GÁBOR *et al.*, 1970b; SZIKSZAY *et al.*, 1982; COMARECHE *et al.*, 1985; SZALLASI; BLUMBER, 1989). Esses estudos observaram que ratos pré-tratados com capsaicina ou RTX apresentavam um maior aumento da temperatura interna durante a exposição ao ambiente quente em comparação aos animais não dessensibilizados. Essa incapacidade de regular adequadamente a temperatura interna durante a exposição ao calor está associada a alterações nas respostas de diversos termofetores (JANCSO-GÁBOR *et al.*, 1970a; OBÁL *et al.*, 1987). Obál *et al.* (1987) mostraram que animais adultos pré-tratados com capsaicina, apresentavam atraso no aumento da dissipação de calor cutânea e ausência de aumento no tempo gasto realizando o comportamento de *grooming* durante a exposição ao ambiente quente. Esses prejuízos na termorregulação também foram observados em animais recém-nascidos que foram tratados com capsaicina e expostos ao ambiente quente, quando adultos (OBÁL *et al.*, 1987). Além disso, foi observado que os animais dessensibilizados

preferiam um ambiente quente em detrimento de um ambiente frio, mesmo quando apresentavam temperatura interna elevada (OBÁL *et al.*, 1987). Jancsó-Gábor *et al.* (1970a) mostraram que os animais dessensibilizados possuem menor salivação durante a exposição ao calor. No entanto, Dib (1983) não encontraram diferenças entre animais dessensibilizados e controles no comportamento de pedido por ventilação durante a exposição ao ambiente quente. Portanto, é possível que nem todos os mecanismos efetores termorregulatórios sejam afetados pela dessensibilização dos canais TRPV1. Enquanto a resposta dos efetores autonômicos durante a exposição ao calor, principalmente o aumento da dissipação de calor na pele da cauda, está claramente comprometida nos animais dessensibilizados para os canais TRPV1, há controvérsias sobre as alterações nos mecanismos comportamentais (OBÁL *et al.*, 1983).

Apesar da dificuldade para termorregular em ambiente quente, os animais dessensibilizados apresentam, em ambiente termoneutro, temperatura interna semelhante àquela observada nos animais controles (JANCOS-GABÓR *et al.*, 1970a; DIB, 1983). Existem evidências mostrando que a dessensibilização dos canais TRPV1 também não modifica a capacidade de termorregular em ambiente frio (JANCOS-GABÓR *et al.*, 1970a; YAMASHITA *et al.*, 2008). Yamashita *et al.* (2008) mostraram que animais dessensibilizados e não dessensibilizados quando mantidos a 5°C apresentavam valores semelhantes de temperatura interna. Entretanto, até o momento, nenhum estudo avaliou o efeito da dessensibilização dos canais TRPV1 periféricos sobre a termorregulação durante o exercício físico, situação em que o aumento da temperatura interna é consequência principalmente do aumento do metabolismo corporal e não do ganho passivo de calor a partir do ambiente. Assim, supomos que a regulação da temperatura interna durante o exercício seria comprometida pela dessensibilização dos canais TRPV1, especialmente durante os esforços realizados em ambiente quente.

Este trabalho focará no estudo dos canais TRPV1 periféricos, localizados na cavidade abdominal. Embora diversos autores indiquem a presença de canais TRPV1 no sistema nervoso central (HORI; SHINOHARA, 1979; NAKAYAMA *et al.*, 1978; DIB, 1983; MCGARAUGHTY *et al.*, 2009), vários trabalhos vêm sugerindo que os canais TRPV1 presentes na cavidade abdominal são os principais envolvidos na regulação da temperatura interna (DONNERER; LEMBECK, 1983; COMARECHE *et al.*, 1985; OBÁL *et al.* 1987; GAVVA *et al.*, 2007; STEINER *et al.*, 2007). Hori e Shinohara (1979) mostraram que os neurônios hipotalâmicos de ratos aumentam sua frequência de disparo em resposta à injeção subcutânea de 10 µg de um agonista do canal TRPV1, o que sugere a existência desse canal

na região hipotalâmica. Contudo, Donnerer e Lembeck. (1983) sugeriram que a capsaicina administrada via subcutânea promove a redução na temperatura interna por meio da estimulação dos canais TRPV1 localizados fora do sistema nervoso central. Além disso, Steiner *et al.* (2007) mostraram que o aumento na temperatura interna induzido pela administração de antagonistas desse canal é abolido em animais submetidos à dessensibilização dos canais TRPV1 localizados na cavidade abdominal, sugerindo que o antagonista promove seus efeitos sobre a temperatura interna agindo nos canais intra-abdominais. Nesse mesmo sentido, a redução na capacidade termorregulatória observada nos animais dessensibilizados durante a exposição ao ambiente quente parece ocorrer devido à perda de canais TRPV1 periféricos (OBÁL *et al.*, 1983; OBÁL *et al.*, 1987). Foi mostrado que a injeção subcutânea de 50 a 160 mg/kg de capsaicina não altera a sensibilidade do hipotálamo a essa droga (DIB, 1983, OBÁL *et al.*, 1983; COMARECHE *et al.*, 1985); entretanto, a aplicação subcutânea das mesmas doses de capsaicina reduz a capacidade dos animais dessensibilizados de regular a temperatura interna em um ambiente de 38°C (JANCSO-GABÓR *et al.*, 1970a; JANCSO-GABÓR *et al.*, 1970b).

Além de afetar as respostas termorregulatórias, já foi mostrado que a dessensibilização dos canais TRPV1 em ratos recém-nascidos altera o desempenho físico desses animais. No estudo de Dousset *et al.* (2004), as ratas tratadas com capsaicina apresentaram um menor desempenho de corrida em ambiente termoneutro. No entanto, Trudel e Millot (1994) não encontraram diferenças no desempenho na natação em ratos dessensibilizados. É importante destacar que esses estudos não avaliaram as respostas termorregulatórias dos animais e se existia relação das mesmas com o desempenho físico, nem o efeito da temperatura ambiente sobre as respostas observadas. Além disso, esses trabalhos utilizaram uma dose elevada de capsaicina (50 mg/kg s.c.) capaz de promover uma dessensibilização sistêmica dos canais TRPV1, incluindo os canais presentes no sistema nervoso central (JANCSÓ *et al.*, 1995; YAMASHITA *et al.*, 2008). Portanto, nenhum estudo avaliou o efeito da dessensibilização dos canais TRPV1 localizados exclusivamente na cavidade abdominal sobre o desempenho físico. Esse foi o terceiro objetivo do presente estudo e a nossa hipótese era que a dessensibilização dos canais TRPV1 levaria à redução no desempenho físico que ocorreria, pelo menos em parte, em função de um maior aumento e/ou um aumento mais rápido da temperatura cerebral.

1.2 Objetivos

1.2.1 Geral

Avaliar se os canais TRPV1 periféricos estão envolvidos na regulação da temperatura interna e do desempenho durante o exercício físico em ambiente termoneutro e quente.

1.2.2 Específicos

Avaliar o efeito da intensidade do exercício sobre o aumento da temperatura cerebral induzido pela corrida na esteira rolante em ambiente termoneutro.

Investigar se as lesões causadas pelo implante crônico de uma cânula guia ou pela inserção aguda do termorresistor para medida da temperatura cerebral modifica o desempenho durante o exercício físico em ambiente termoneutro.

2 MÉTODOS

2.1 Animais

Foram usados ratos *Wistar* adultos ($n = 87$), pesando entre 250 e 350 g, provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os animais foram mantidos em uma sala com temperatura seca controlada em $24 \pm 2^\circ\text{C}$, sob um ciclo claro-escuro de 14:10 horas, e tiveram acesso livre à água e ração granulada (Nuvilab, SP, Brasil). Antes do implante cirúrgico de uma cânula guia no cérebro, os animais foram mantidos coletivamente em caixas de polietileno. Após a cirurgia, os mesmos foram mantidos em gaiolas individuais de polietileno. As caixas e as gaiolas individuais foram limpas a cada dois dias.

Para a realização dos três delineamentos experimentais apresentados nesta dissertação foram utilizados, com êxito, 49 dos 87 (56%) ratos disponibilizados. Os principais motivos para perda de animais foram:

- Parada cardiorrespiratória devido à anestesia para o implante de cânula guia no cérebro;
- O capacete soltou do crânio durante o experimento;
- O animal não quis correr;
- Parada cardiorrespiratória devido à injeção de RTX.

2.2 Cuidados éticos

Os procedimentos utilizados nesse estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG (protocolo 076 / 2011).

2.3 Delineamentos experimentais

Essa dissertação consistiu da realização de três delineamentos experimentais.

2.3.1 Delineamento experimental 1

O objetivo foi verificar o efeito da intensidade do esforço sobre as alterações na temperatura cerebral induzidas pelo exercício físico.

Neste delineamento foram utilizados nove animais, sendo que cada animal foi submetido a quatro situações experimentais: uma situação repouso e corridas na esteira com velocidade constante de 18 m/min (V18), 21 m/min (V21) e 24 m/min (V24), sempre com 5% de inclinação. As três situações de exercício foram realizadas até a interrupção voluntária do esforço (IVE) e em ordem randomizada, seguindo o delineamento em quadrado latino para impedir que a ordem das situações de exercício interferisse nos resultados (QUADRO 1). A situação repouso foi realizada ao final das três situações de exercício.

QUADRO 1.
Quadrado latino utilizado durante o delineamento experimental 1.

Ordem Rato	1 ^a Situação	2 ^a Situação	3 ^a Situação
Ratos 13, 21 e 31	Exercício 18 m/min	Exercício 21 m/min	Exercício 24 m/min
Ratos 16, 23 e 24	Exercício 21 m/min	Exercício 24 m/min	Exercício 18 m/min
Ratos 12, 17 e 22	Exercício 24 m/min	Exercício 18 m/min	Exercício 21 m/min

Para a realização destes experimentos, inicialmente os animais foram submetidos a uma cirurgia para implante de uma cânula guia no córtex pré-frontal direito. Após a recuperação da cirurgia, os ratos foram familiarizados ao exercício em esteira rolante por cinco dias e, em seguida, submetidos às quatro situações experimentais. Foram dados no mínimo dois dias de intervalo entre as situações. Após o término dos experimentos, os ratos foram eutanasiados. Todas as situações experimentais foram realizadas em ambiente termoneutro entre às 10 e 16 horas (FIGURA 1).

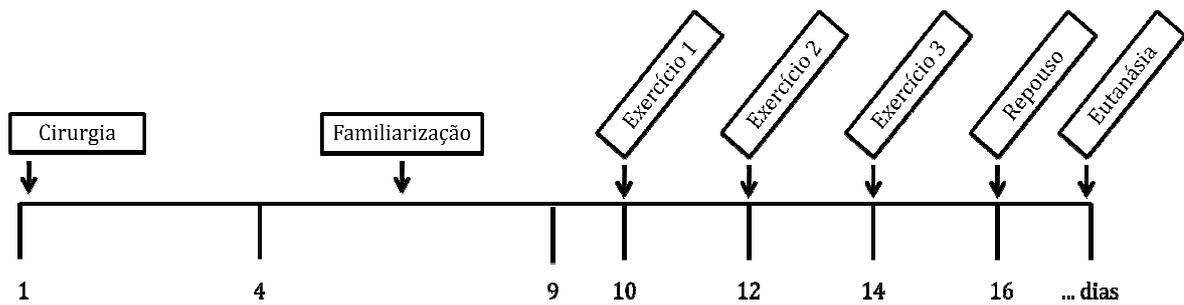


FIGURA 1. Linha do tempo referente ao delineamento experimental 1

2.3.2 Delineamento experimental 2

O objetivo foi avaliar se a lesão causada pelo implante crônico da cânula guia ou pela inserção aguda do sensor de temperatura no cérebro afeta o desempenho físico de ratos durante o exercício.

Outro grupo de animais ($n = 12$) foi utilizado neste segundo delineamento experimental. Após serem familiarizados ao exercício em esteira rolante por cinco dias, todos os animais foram submetidos ao primeiro exercício com aumentos progressivos da velocidade até IVE. No dia seguinte, os animais foram divididos em dois grupos: um grupo que foi submetido a uma cirurgia para implante de uma cânula guia no córtex pré-frontal direito (grupo Operado), e outro grupo que não foi submetido a nenhum procedimento cirúrgico (grupo Controle; os animais foram apenas transferidos de uma caixa coletiva para uma gaiola individual). Quatro dias após cirurgia (ou a transferência para a gaiola individual), os animais de ambos os grupos foram familiarizados ao exercício em esteira rolante por mais dois dias. Os ratos foram, então, novamente submetidos a outros dois exercícios com aumentos progressivos da velocidade. Foram dados pelo menos dois dias de intervalo entre os dois exercícios. Os animais que receberam o implante da cânula guia foram avaliados com e sem a inserção do termorresistor para medida da temperatura cerebral. A temperatura cerebral foi medida na situação em que o termorresistor foi inserido através da cânula guia. A ordem dos exercícios com e sem a inserção do termorresistor foi randomizada. Após o término do terceiro exercício com aumentos progressivos da velocidade, os animais foram eutanasiados. Todas as situações experimentais foram realizadas em ambiente termoneutro entre às 10 e 16 horas (FIGURA 2).

A escolha pela realização do exercício progressivo nesse segundo delineamento foi devido ao fato de o coeficiente de variação medido durante esse protocolo de exercício ($CV \approx 16\%$) ser menor do que aquele medido durante o exercício constante ($CV > 30\%$).

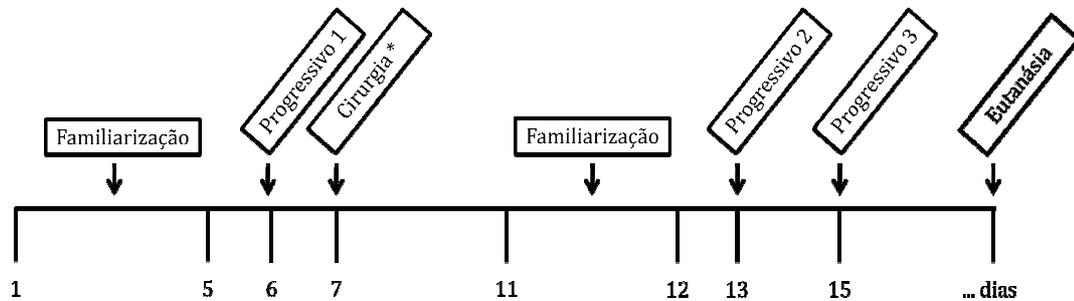


FIGURA 2. Linha do tempo referente ao delineamento experimental 2. *Ou transferência para uma gaiola individual.

2.3.3 Delineamento experimental 3

O objetivo foi avaliar o efeito da ausência crônica dos canais TRPV1 periféricos sobre a termorregulação e o desempenho durante o exercício físico.

Esse delineamento foi dividido em dois protocolos experimentais: os animais do primeiro protocolo foram submetidos a exercícios com aumentos progressivos da velocidade, enquanto os do segundo protocolo, a exercícios com velocidade constante (FIGURA 3). Para simplificar a leitura da dissertação a partir desse ponto, os dois protocolos de exercício serão descritos simplesmente como exercício “progressivo” ou exercício “constante”. Em ambos os protocolos os animais foram divididos em dois grupos contendo sete animais cada. Dentro de cada protocolo, o grupo experimental foi pré-tratado com RTX e o controle foi pré-tratado com veículo (ver tópico 2.4.2.2) Os ratos de cada grupo passaram por duas situações experimentais realizados até a IVE: exercício em ambiente termoneutro (24°C) e exercício em ambiente quente (30°C).

A escolha pela realização dos dois protocolos de exercício foi baseada nos resultados dos experimentos 1 e 2. Nesses experimentos foi observado que, durante o exercício progressivo, a temperatura cerebral no momento da IVE foi menor em relação aos exercícios constantes. Esse achado indica que fatores térmicos parecem ser mais importantes na

determinação do desempenho durante o exercício submáximo realizado com velocidade constante do que durante o exercício progressivo. Além disso, ao longo do exercício progressivo, os animais mantiveram uma menor temperatura cerebral em comparação com àquela mantida ao longo do exercício constante. Dessa forma, é possível que os efeitos causados pela dessensibilização dos canais TRPV1 na termorregulação variem conforme o protocolo de exercício utilizado durante os experimentos.

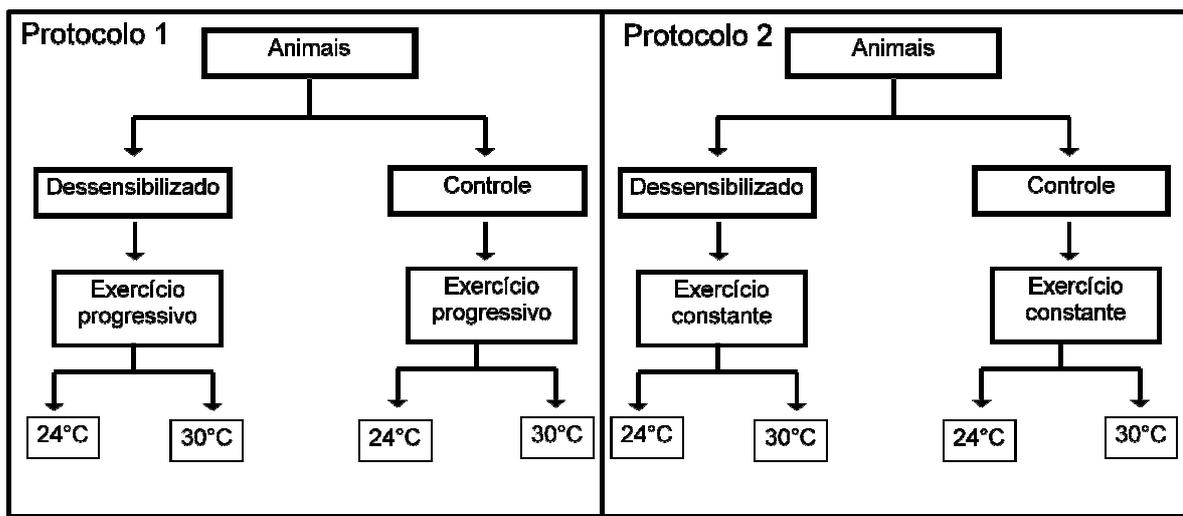


FIGURA 3. Protocolos experimentais contidos no terceiro delineamento experimental.

Os animais foram inicialmente submetidos ao implante de cânula guia no cérebro e, após um período de recuperação, foram familiarizados ao exercício em esteira rolante por quatro dias. Em seguida, os ratos foram submetidos a um exercício progressivo (protocolo 1) ou a um exercício constante de 21 m/min (protocolo 2), ambos realizados em ambiente termoneutro. Um dia após o exercício inicial, um grupo de ratos foi submetido à dessensibilização dos canais TRPV1 periféricos por meio da administração i.p. de RTX 20 µg/kg (grupo RTX), enquanto o outro grupo recebeu a injeção de veículo (etanol 20% dissolvido em salina estéril; grupo Controle). Cinco dias após a dessensibilização ou injeção do veículo, os animais foram familiarizados ao exercício por mais dois dias e, então, foram submetidos às duas situações experimentais: exercícios progressivos ou constantes em ambiente termoneutro e em ambiente quente. Foram dados dois dias de intervalo entre os experimentos. Todas as situações experimentais foram realizadas entre às 07 e 13 horas. Após o término das duas situações experimentais, dois testes foram realizados para confirmar que a

dessensibilização afetou exclusivamente os canais TRPV1 localizados na periferia do corpo e, em seguida, os ratos foram eutanasiados (FIGURA 4).

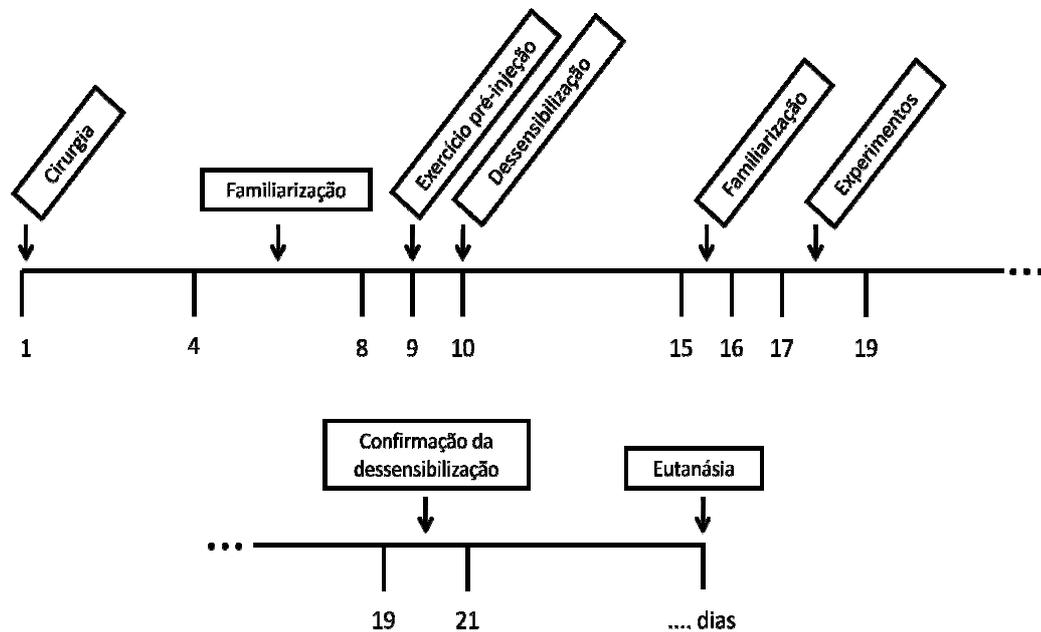


FIGURA 4. Linha do tempo referente ao delineamento experimental 3.

2.4 Procedimentos

2.4.1 Delineamentos experimentais 1 e 2

2.4.1.1 Implante de cânula guia cerebral

Todos os animais do experimento experimental 1 e os animais do grupo Operado do delineamento 2 foram submetidos ao implante de cânula guia cerebral. Os animais foram anestesiados com ketamina (80 mg/kg i.p.) e xilazina (10,5 mg/kg i.p.). Após realizar a tricotomia e a assepsia da porção superior da cabeça dos animais, a pele foi removida por meio de uma incisão longitudinal. Para expor o bregma e o lambda, referências anatômicas utilizadas para determinação das coordenadas estereotáxicas, o perióstio foi removido com o auxílio de uma solução de cloridrato de lidocaína 2% contendo adrenalina. Em seguida, os

ratos foram fixados a um estereotáxico para animais de pequeno porte (Insight Equipamentos – modelo ETX3/99, SP, Brasil) e uma cânula guia de aço inoxidável (13 mm de comprimento e 21 gauge) foi implantada no córtex pré-frontal (HASEGAWA *et al.*, 2008) de acordo com as seguintes coordenadas (PAXINOS e WATSON, 2007): ântero-posterior: +3,00 mm anterior ao bregma; látero-lateral: -3,00 mm à direita da linha média; dorso-ventral: - 1,8 mm de profundidade a partir do crânio. Para possibilitar a inserção da cânula guia no cérebro e, posteriormente, a sua fixação à calota craniana, foram feitos três orifícios no crânio com o auxílio de uma broca odontológica: um na coordenada previamente demarcada, e os outros dois para a fixação dos parafusos. A cânula guia foi ancorada aos parafusos por meio da aplicação de cimento odontológico em torno da cânula e dos parafusos.

Após a cirurgia, os ratos receberam uma dose profilática de 0,1 mL de antibiótico em cada pata traseira (48000 UI – Pentabiótico veterinário, via intramuscular), além de 0,1 mL de analgésico na região torácica dorsal (Flunixin meglumina, 1,1 mg/kg, via subcutânea). A luz da cânula guia foi protegida contra obstruções por meio de um mandril feito com fio de nylon.

2.4.1.2 Familiarização ao exercício em esteira rolante

Os animais foram familiarizados à corrida em uma esteira rolante para pequenos animais (Gaustec Magnetismo; Nova Lima, MG, Brasil) a uma velocidade constante de 18 m/min e inclinação de 5%. Cada sessão diária teve a duração de 10 minutos, sendo que, nos primeiros cinco minutos, foi permitido aos animais mover-se livremente na esteira e, nos cinco minutos finais, os ratos foram submetidos à corrida. Durante a familiarização, os ratos foram encorajados a correr por estímulos elétricos fornecidos por uma grade de choque (0,5 mA) posicionada ao final da esteira. O objetivo da familiarização foi ensinar aos animais em qual direção deveriam correr e diminuir a exposição dos mesmos ao estímulo elétrico durante as situações experimentais (WANNER *et al.*, 2007).

2.4.1.3 Exercícios até a interrupção voluntária do esforço

2.4.1.3.1 Exercício com velocidade constante

No delineamento experimental 1, todos os animais foram submetidos a corridas na esteira rolante com velocidade constante em três diferentes intensidades (18 m/min, 21 m/min e 24 m/min). O critério para determinar o momento da IVE foi a permanência do animal sobre a grade de estímulo elétrico por 10 s (WANNER *et al.*, 2007). As três intensidades utilizadas foram escolhidas com base nos trabalhos realizados anteriormente em nosso laboratório (RODRIGUES *et al.*, 2003; PIRES *et al.*, 2010). Estes trabalhos mostraram que, em ambiente termoneutro, os ratos conseguiram manter essas velocidades de corrida por pelo menos 25 minutos e, além disso, essas velocidades foram intensas o suficiente para aumentar a temperatura interna (abdominal) dos animais.

No dia do experimento, os animais foram retirados do biotério, pesados e levados dentro de suas caixas até a sala de experimentos. Em seguida, o termorresistor para medida da temperatura cerebral foi inserido no cérebro através da cânula guia. Imediatamente após a inserção do termorresistor, os animais foram submetidos ao exercício constante em ambiente termoneutro até a IVE. A temperatura cerebral foi medida em intervalos de 30 segundos durante todo exercício e durante 30 minutos após a interrupção do esforço (pós-exercício). A temperatura ambiente foi registrada a cada 4 minutos.

2.4.1.3.2 Exercício com aumentos progressivos da velocidade

Os animais do delineamento experimental 2 foram submetidos ao exercício progressivo em esteira rolante. A velocidade inicial da esteira foi ajustada em 10 m/min e, a cada 3 min de exercício, foi aumentada em 1 m/min até o momento em que os ratos não conseguiram manter o desempenho. O critério para determinar o momento da IVE foi o mesmo que aquele descrito para o exercício constante.

Nas situações em que a temperatura cerebral foi medida, os procedimentos utilizados foram semelhantes àqueles descritos para o exercício com velocidade constante, com exceção da medida pós-exercício que não foi realizada nesses experimentos.

2.4.1.4 Situação repouso

Após realizarem os três exercícios constantes, os animais do delineamento 1 foram submetidos à situação experimental de repouso. Os animais foram mantidos em suas caixas individuais e, após o período de estabilização da temperatura cerebral, esta foi medida em intervalos de 30 segundos durante sessenta minutos. A temperatura ambiente foi registrada a cada 4 minutos.

2.4.1.5 Eutanásia

Todos os ratos do delineamento experimental 1 e os animais do grupo Operado do delineamento 2 foram eutanasiados por meio de sangria induzida pelo procedimento de perfusão transcardíaca. Para isso, foram anestesiados profundamente com ketamina (120 mg/kg i.p.) e xilazina (15 mg/kg i.p.), e então foi feita a canulação da aorta ascendente, seguida de um corte no átrio direito para possibilitar a sangria. Na sequência, os animais foram perfundidos através da aorta ascendente com solução salina 0,9% (150 mL), seguida de formaldeído 4% (300 mL). Os cérebros foram retirados e pós-fixados *overnight* em formaldeído 4% a 4°C.

Os animais do grupo Controle do delineamento experimental 2 foram eutanasiados com uma sobredose de anestésico, que correspondeu a uma dose três vezes maior que aquela utilizada para a realização dos procedimentos cirúrgicos (ketamina: 240 mg/kg i.p.; xilazina: 31,5 mg/kg i.p.)

2.4.2 *Delineamento experimental 3*

2.4.2.1 Implante da cânula guia cerebral

Todos os ratos do delineamento 3, receberam o implante de uma cânula guia no córtex frontal direito conforme descrito no tópico 2.4.1.1.

2.4.2.2 Dessensibilização dos canais TRPV1

Sob anestesia com ketamina (80 mg/kg i.p.) e xilazina (10,5 mg/kg i.p.), os ratos do grupo RTX receberam uma injeção de RTX (20 µg/kg i.p.). Inicialmente foi preparada um solução estoque de RTX (100 µg/ml), diluindo-se 1 mg da droga em 10 mL de álcool etílico. No dia da injeção, pequenos volumes da solução estoque foram diluídos cinco vezes com salina a fim de obter uma solução de RTX na concentração de 20 µg/ml, cujo veículo correspondia a 20% de etanol dissolvido em salina estéril. Cada animal recebeu a injeção de 1 ml/kg da solução. Os animais do grupo Controle foram tratados com o veículo utilizado na preparação da droga (etanol 20% dissolvido em salina estéril) e receberam a aplicação do mesmo volume de solução (1 ml/kg). Na dose supracitada, o RTX dessensibiliza os canais TRPV1 presentes na cavidade abdominal, por pelo menos 19 dias, sem dessensibilizar os canais presentes em outros compartimentos corporais, incluindo o cérebro, conforme demonstrado por diferentes ensaios (STEINER *et al.*, 2007; DOGAN *et al.*, 2004). A escolha pela dessensibilização dos canais TRPV1 periféricos foi baseada nos resultados obtidos por Garami *et al.* (2011) e Steiner *et al.* (2007). Esses estudos mostraram que a supressão da atividade locomotora induzida por agonistas (GARAMI *et al.*, 2011) e a hipertermia provocada por antagonistas (STEINER *et al.*, 2007) do canal TRPV1 são mediadas pela ação dessas drogas na cavidade abdominal.

2.4.2.3 Familiarização ao exercício em esteira rolante

Os animais do delineamento experimental 3 foram familiarizados a corrida em esteira rolante conforme descrito no tópico 2.4.1.2.

2.4.2.4 Exercícios até a interrupção voluntária do esforço

2.4.2.4.1 Exercício com aumentos progressivos da velocidade

No protocolo 1 do delineamento experimental 3, os animais realizaram exercícios progressivos como descrito no tópico 2.4.1.3.

No dia do experimento, os animais foram retirados do biotério, pesados e levados dentro de suas caixas até a sala de experimentos. Em seguida, o termorresistor para medida da temperatura cerebral foi inserido no cérebro através da cânula guia e o termopar para medida da temperatura da pele foi afixado à cauda do animal. Imediatamente após a conexão dos sensores, os animais foram submetidos ao exercício progressivo em ambiente termoneutro ou quente até a IVE. A temperatura cerebral e a temperatura da pele da cauda foram medidas a cada minuto durante todo o exercício. A temperatura ambiente foi registrada a cada 3 minutos.

2.4.2.4.2 Exercício com velocidade constante

No delineamento experimental 3, os animais do protocolo 2 foram submetidos a um exercício com velocidade constante de 21 m/min em ambiente termoneutro e de 17 m/min em ambiente quente. Essas velocidades de corrida representaram entre 70-75% da velocidade máxima de corrida atingida pelos animais do protocolo 1 durante os exercícios progressivos em ambiente termoneutro ($28,6 \pm 0,7$ m/min) e quente ($23,3 \pm 0,8$ m/min), respectivamente.

A temperatura cerebral e da pele da cauda foram medidas conforme descrito no tópico anterior.

2.4.2.5 Confirmação da dessensibilização

Terminadas as situações experimentais, a extensão da dessensibilização dos canais TRPV1 foi avaliada por meio dos testes de limpeza dos olhos (para confirmar que a dessensibilização não atingiu níveis sistêmicos) e de saciedade induzida por colecistoquinina (CCK; para confirmar a dessensibilização abdominal). O teste de limpeza dos olhos consistiu da contagem do número de movimentos realizados com as patas para limpar o olho durante 30 segundos, após a aplicação de um produto químico irritante (20 µl de NH₄OH 1%, diluído em salina) na córnea. Já o teste de saciedade foi realizado em dois dias diferentes, sempre após 24 horas de privação alimentar. Cada rato foi injetado com CCK (6 µg/kg, i.p.) em um dia e com solução salina em outro, sendo a ordem das injeções aleatória. A ração padrão foi oferecida 5 min após as injeções e a massa de ração consumida durante 30 min foi medida. Para cada rato, a diferença na ingestão alimentar (teste com salina menos teste com CCK) foi expressa como uma percentagem da quantidade consumida no teste com salina.

2.4.2.6 Eutanásia

Os ratos do delineamento 3 foram eutanasiados por sangria induzida pelo procedimento de perfusão transcardíaca, conforme descrito no tópico 2.4.1.5.

2.5 Verificação histológica

A verificação histológica foi realizada para identificar em qual região do cérebro o termorresistor para medida da temperatura cerebral foi posicionado. Inicialmente o tecido cerebral foi imerso em solução contendo sacarose 30%, onde foi mantido por 72 h a 4°C. Após esse período, os cérebros foram congelados e seccionados (50 µm) em um criostato a -

18°C (Leica microsystems, Srt.Heidelberg, Alemanha). Secções contendo as estruturas de interesse foram coletadas, montadas em lâminas de vidro gelatinizadas e coradas com cresil-violeta (5 µg/ml de água destilada), um corante que colore de roxo-azul os corpos de Nissl no citoplasma de neurônios. As lâminas foram analisadas sob um microscópio de luz e localização do sensor foi identificada por meio da comparação das lesões presentes nas secções coradas com os desenhos esquemáticos das áreas cerebrais apresentados no atlas de Paxinos e Watson (2007).

2.6 Variáveis

2.6.1 Variáveis medidas

2.6.1.1 Massa corporal

A massa corporal dos animais foi registrada diariamente e antes de todas as situações experimental, utilizando-se uma balança eletrônica (Filizola®), como estimativa do estado de saúde dos animais.

2.6.1.2 Tempo total de exercício

O tempo total de exercício, medido em minutos, foi utilizado com índice de desempenho físico e correspondeu ao intervalo entre o início do exercício e o momento em que os animais interromperam o esforço.

2.6.1.3 Temperatura cerebral

O registro da temperatura cerebral foi realizado por meio de termorresistor (Beta Therm Corp., MA, EUA) que consiste de um cabo constituído por dois filamentos de níquel

sólido insulados e conectados a um termorresistor de 0,53 mm de diâmetro. Antes do início de cada situação experimental, o termorresistor foi fixado à cânula guia com o auxílio de um tubo de polietileno PE50, o qual foi previamente fixado ao cabo do termorresistor utilizando-se parafilme. A parte distal do fio, não insulada, foi conectada ao equipamento que mede as variações de resistência (Fluke, 289 FVF, WA, EUA). Os valores de resistência foram convertidos em valores de temperatura utilizando a equação de Steinhart-Hart.

2.6.1.4 Temperatura ambiente

A temperatura ambiente foi medida no interior da esteira por meio de um termopar (Yellow Spring Instruments – YSI, modelo 409B, OH, EUA) fixado na parte superior da caixa de acrílico que envolve a esteira e acoplado a um teletermômetro (YSI, modelo 400A). Durante as situações experimentais em ambiente termoneutro e em ambiente quente, a temperatura na esteira foi mantida em 24°C e 30°C, respectivamente. A temperatura ambiente foi controlada utilizando-se um ar condicionado e um aquecedor.

2.6.1.5 Temperatura da pele da cauda

A temperatura da cauda foi medida por meio de um termopar (Yellow Springs Instruments, OH, EUA) afixado na porção lateral à aproximadamente 1 cm da base da cauda do rato (YOUNG E DAWSON,1982).

2.6.2 *Variáveis calculadas*

2.6.2.1 Taxa de elevação da temperatura cerebral (TETc)

$$\text{TETc } (^\circ\text{C}/\text{min}) = \Delta\text{Tc}/\text{TTE}$$

Sendo:

ΔT_c : variação da temperatura cerebral ($^{\circ}C$);

TTE: tempo total de exercício (min).

2.6.2.2 Índice de dissipação de calor

O índice de dissipação de calor (IDC) representa uma estimativa da fração do calor corporal total perdido para o ambiente que ocorre como resultado da troca de calor não evaporativa entre a pele e o ambiente. Esse índice pode variar de 0 (que representa a vasoconstrição máxima possível, situação em que a temperatura da pele seria igual a temperatura ambiente) a 1 (que representa a vasodilatação máxima possível, situação em que a temperatura da pele seria igual a temperatura cerebral). O IDC foi calculado utilizando-se a equação (ROMANOVSKY et al., 2002):

$$IDC = (T_p - T_a) \div (T_c - T_a)$$

Sendo:

T_p : Temperatura da pele da cauda

T_a : Temperatura ambiente

T_c : Temperatura cerebral

2.6.2.3 Velocidade máxima de corrida

A velocidade máxima de corrida ($V_{m\acute{a}x}$) foi calculada, adaptando-se a equação proposta por Kuipers *et al.* (1985) para o cálculo da potência máxima:

$$V_{m\acute{a}x} = V_1 + (V_2 \times t/180)$$

Sendo :

V_1 : a velocidade da esteira atingida no último estágio completo;

V_2 : o incremento na velocidade da esteira a cada estágio;

t : o tempo gasto no estágio incompleto (em segundos).

2.6.2.4 Trabalho

$$T \text{ (kgm)} = m \cdot v \cdot \text{sen}\theta \cdot \text{TTE}$$

Sendo:

m: massa corporal (kg);

v: velocidade de esteira (m/min)

sen θ : seno do ângulo de inclinação da esteira;

TTE: tempo total de exercício (min).

2.7 **Análise estatística**

2.7.1 *Delineamentos experimentais 1 e 2*

Os dados foram expressos como média \pm EPM. Para comparar as curvas de temperatura cerebral foi utilizada uma análise de variância (ANOVA) de dois fatores com medidas repetidas, seguida de um teste *post hoc* de Tukey. Os dois fatores utilizados foram o tempo e a intensidade de exercício (V18, V21 e V24) ou o tempo e o tipo de exercício (constante ou progressivo).

No delineamento 1, para comparar a massa corporal dos animais e a temperatura ambiente entre os três exercícios constantes foi utilizada uma ANOVA de um fator (intensidade) e uma ANOVA de dois fatores (tempo e intensidade) com medidas repetidas, respectivamente, seguidas de um teste *post hoc* de Tukey. O tempo total de exercício e a taxa de aumento da temperatura cerebral foram comparados entre as três intensidades de exercício utilizando-se ANOVAs de um fator com medidas repetidas, seguidas de testes *post hoc* de Ducan. As curvas que descrevem o percentual de animais correndo em cada tempo de exercício foram comparadas entre as três velocidades de corrida utilizando-se o teste de logrank (BLAND; ALTMAN, 2004), uma análise estatística que é usualmente utilizada em experimentos de sobrevivência (WANNER *et al.*, 2012). Essa análise foi iniciada no minuto 30 de exercício (quando foi observada a primeira interrupção) e, a partir desse ponto, foram contadas as interrupções a cada 10 minutos até que a última interrupção tenha sido observada

(minuto 290). A correlação de Pearson foi utilizada para analisar a associação entre o tempo total de exercício e a taxa de aumento da temperatura cerebral.

No delineamento 2, uma ANOVA de dois fatores (ordem dos exercícios e grupo) com medidas repetidas, seguida de um teste *post hoc* de Duncan, foi utilizada para comparação da $V_{\text{máx}}$ de corrida entre os três exercícios progressivos dentro do mesmo grupo e entre os grupos. Para comparação da massa corporal entre os grupos foi utilizada uma ANOVA de um fator (grupo), seguida de um teste *post hoc* de Duncan. Para a comparação da temperatura ambiente entre os três exercícios progressivos, foi utilizada uma ANOVA de dois fatores (ordem dos exercícios e grupo) com medidas repetidas, seguida de um teste *post hoc* de Tukey.

As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

2.7.2 *Delineamento experimental 3*

Os dados foram expressos como média \pm EPM. Para comparar as curvas de temperatura cerebral, ambiente e da pele foram utilizadas ANOVAs de dois fatores com medidas repetidas, seguidas de testes *post hoc* de Tukey. Os dois fatores utilizados foram o tempo de exercício e o tratamento (grupo dessensibilizado x controle).

Para comparação do tempo total de exercício, da $V_{\text{máx}}$ de corrida, do trabalho, da massa corporal e da taxa de aumento da temperatura cerebral entre os animais dessensibilizados e controles foram utilizados testes *t* de student não pareados. Esses testes *t* de student não pareados também foram utilizados para comparar o percentual de alteração na ingestão alimentar induzido por CCK e o número de movimentos realizados para limpar os olhos entre os animais dessensibilizados e controles.

As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 Delineamento experimental 1

3.1.1 *Análise histológica*

A FIGURA 5 mostra fotomicrografias de secções cerebrais coronais coradas com cresil violeta: no painel 5A está representado um animal, no qual o termorresistor foi inserido no córtex frontal, enquanto no painel 5B está representado um animal, no qual o termorresistor foi inserido no caudado putâmen (CPu).

Na FIGURA 6, os painéis A-F mostram desenhos esquemáticos retirados do atlas de PAXINOS e WATSON (2007), indicando a localização da ponta dos termorresistores (definida como a lesão mais ventral observada no tecido cerebral). Em sete dos nove animais utilizados no delineamento experimental 1, a ponta do termorresistor estava localizada em regiões do córtex frontal direito: área frontal três (FR3), córtex somatosensorial primário (S1), córtex motor primário (M1), córtex lateral orbital (LO) e córtex agranular insular ventral (AIV). Em outros dois animais, a ponta do termorresistor estava localizada sobre o CPu.

É importante ressaltar que as lesões causadas pelo termorresistor foram observadas em coordenadas dorso-ventrais que variaram entre 2,6 e 6,5 mm de profundidade a partir do crânio. Em cinco animais, o termorresistor foi posicionado em regiões mais dorsais (2,6 a 4,0 mm a partir do crânio: FR3, S1J, M1), enquanto que, nos demais, a ponta do termorresistor atingiu regiões mais ventrais (6,4 a 5,0 mm a partir do crânio: CPu, LO e AIV). Diferenças também foram observadas com relação à localização ântero-posterior da ponta do termorresistor: em cinco animais, a lesão causada pelo termorresistor foi observada em regiões mais rostrais (4,20 a 3,24 mm anterior ao bregma), enquanto que, nos demais, a ponta do termorresistor estava posicionada em estruturas mais caudais (2,76 a 2,28 mm anterior ao bregma). Uma menor variação em relação à localização das pontas dos termorresistores foi observada ao se analisar as coordenadas médio-laterais (2,0 a 3,0 mm à direita do bregma).

Apesar das grandes diferenças observadas na localização do termorresistor entre os nove animais, não foi observada nenhuma correlação entre as coordenadas ântero-posterior e dorso-ventral referentes à localização da ponta do termorresistor e os parâmetros

termorregulatórios avaliados (temperatura cerebral inicial e variação da temperatura durante o exercício; GRÁFICO 1). Portanto, todos os animais foram incluídos nas análises referentes à temperatura cerebral, sem a preocupação de subdividi-los em grupos conforme a localização da ponta do termorresistor.

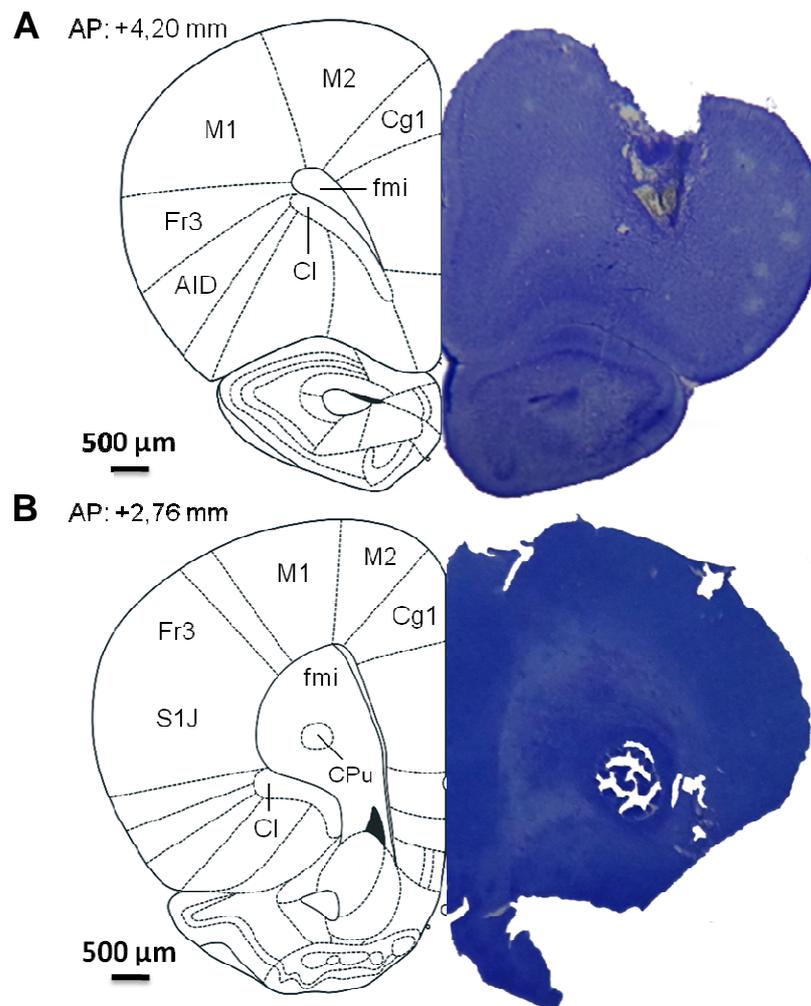


FIGURA 5. Fotomicrografias de seções cerebrais coronais coradas com cresil violeta: um animal em que o termorresistor para medida da temperatura cerebral foi posicionado no córtex frontal direito (Figura 5A) e outro animal em que o termorresistor foi posicionado no caudado putâmen (Figura 5B). Legenda: AID, córtex agranular insular dorsal; Cg1, córtex cingular área 1; Cl, *claustrum*; CPu- núcleo caudado putâmen; fmi, corpo caloso; Fr3, área frontal 3; M1, Cortex motor primário; M2 córtex motor secundário; S1J, córtex somatossensorial primário, região maxilar.

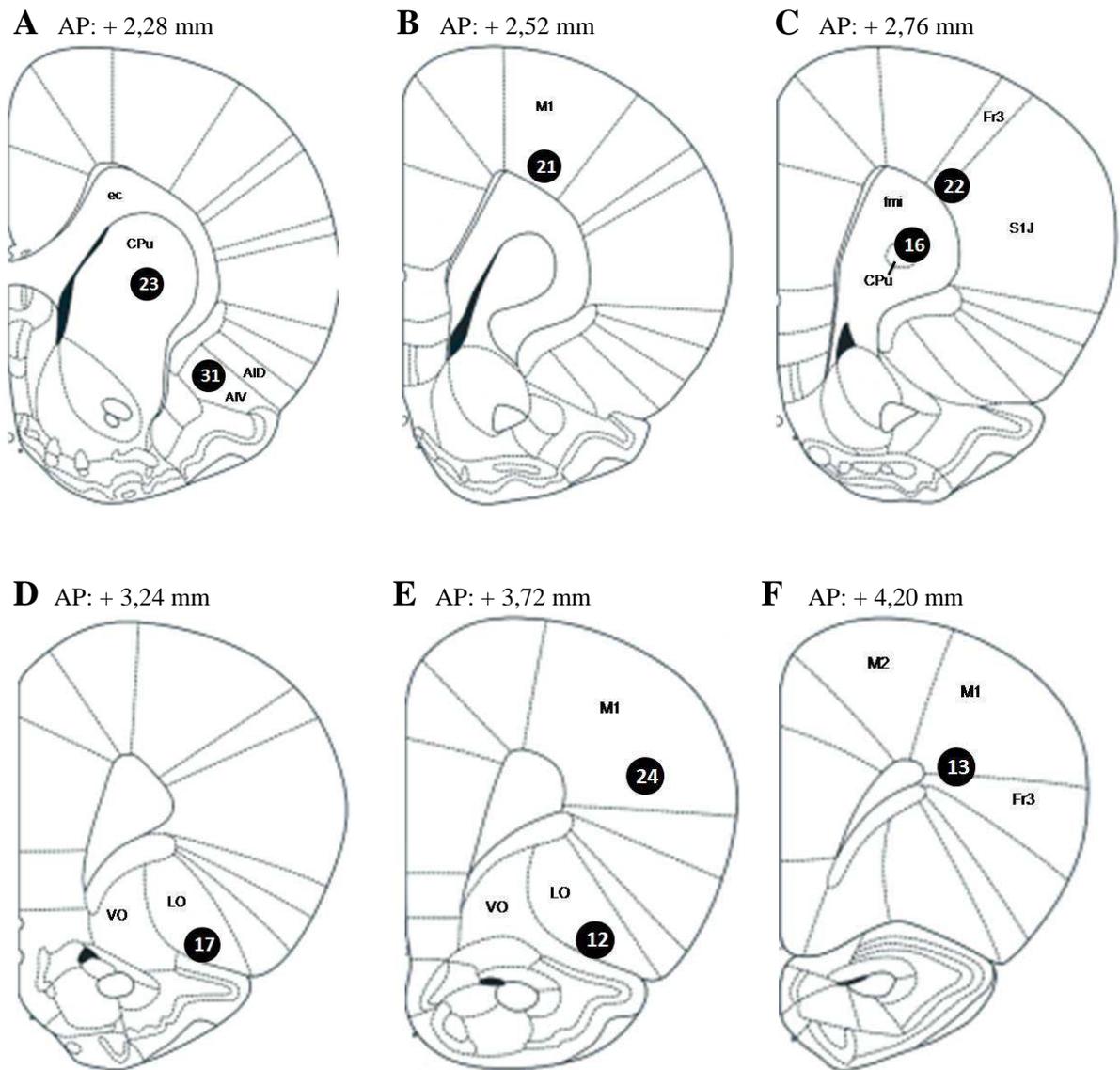


FIGURA 6. Desenhos esquemáticos de secções cerebrais coronais, nos quais a localização da ponta do termorresistor está representada para cada um dos 9 animais utilizados neste protocolo experimental (Figuras 6A-F). Os círculos pretos representam a ponta do termorresistor e os números apresentados no interior dos círculos indicam o número do animal. Legenda: AID, córtex agranular insular dorsal; AIV, córtex agranular insular ventral; Cg1, córtex cingular área 1; CPu- núcleo caudado putamen; fmi, corpo caloso; ec, cápsula externa; Fr3, área frontal 3; LO, córtex lateral orbital; M1, córtex motor primário; M2 córtex motor secundário; S1J, córtex somatossensorial primário, região maxilar; VO, córtex ventral orbital.

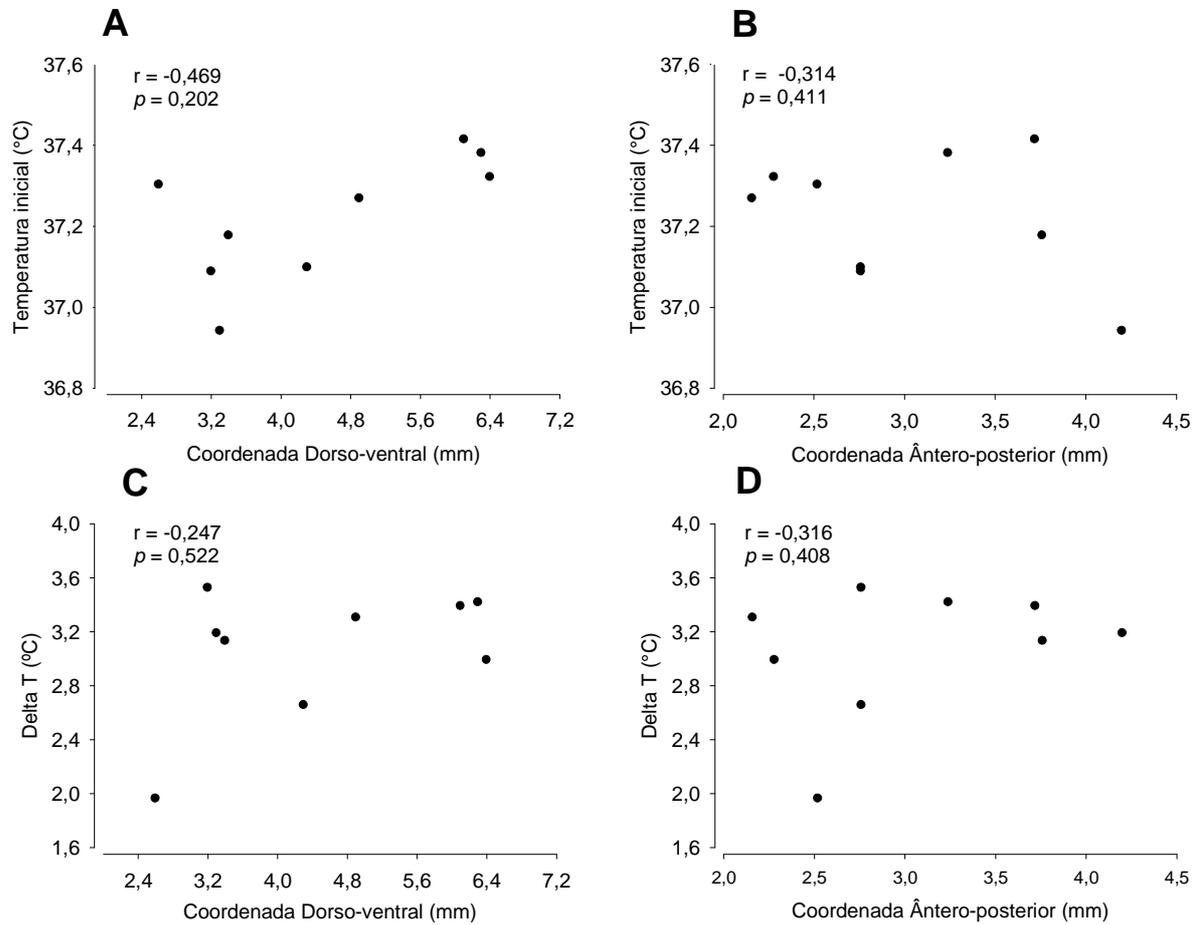


GRÁFICO 1. Correlação entre as coordenadas dorso-ventral e ântero-posterior e os parâmetros termorregulatórios: temperatura inicial (painéis A à B) e variação de temperatura durante o exercício (painéis C à D). Os dados de temperatura de cada animal foram agrupados para as três intensidades de exercício estudadas.

3.1.2 Temperatura ambiente e massa corporal

Como mostrado na Tabela 1, houve aumento da temperatura ambiente durante as três situações experimentais, sendo a temperatura ambiente maior no momento da IVE em relação ao início do exercício. Entretanto, a temperatura ambiente no início do exercício e no momento da IVE não foi diferente entre os exercícios realizados nas três diferentes intensidades (TABELA 1). Não foram observadas diferenças também na massa corporal dos animais entre os três exercícios constantes (TABELA 1).

TABELA 1.

Valores médios da temperatura ambiente no início do exercício e no momento da IVE durante a corrida na esteira realizada em três diferentes velocidades, e valores médios da massa corporal dos animais no dia da realização desses experimentos.

Situação	Temperatura ambiente			Massa Corporal
	Inicial	IVE	<i>p</i>	
18 m/min	24,14 ± 0,20°C	26,63 ± 0,29°C	<i>p</i> < 0,05	303 ± 5 g
21 m/min	24,31 ± 0,29°C	26,23 ± 0,23°C	<i>p</i> < 0,05	296 ± 5 g
24 m/min	24,61 ± 0,20°C	26,34 ± 0,14°C	<i>p</i> < 0,05	296 ± 4 g
<i>p</i> situação	<i>p</i> = 0,517	<i>p</i> = 0,308		<i>p</i> = 0,154

Os dados estão expressos como média ± EPM. (n = 9)

Durante os trinta minutos do período pós-exercício a temperatura ambiente permaneceu aumentada em relação ao início do exercício e não houve diferença entre as três situações experimentais (minuto 0: 24,21 ± 0,22°C *versus* minuto 30 pós- exercício: 25,75 ± 0,25°C; dados agrupados para os três exercícios constantes; *p* < 0,05).

Na situação repouso, a temperatura ambiente foi mantida em 25,01 ± 0,16°C, durante os sessenta minutos de registro da temperatura cerebral.

3.1.3 Desempenho e temperatura cerebral

A velocidade de corrida influenciou o desempenho durante o exercício na esteira rolante (GRÁFICO 2A). O tempo total de exercício foi menor durante o exercício realizado a 24 m/min quando comparado às outras duas intensidades de exercício e menor durante o

exercício realizado a 21 m/min quando comparado a 18 m/min (V24: 62 ± 11 min *versus* V21: 149 ± 14 min *versus* V18: 207 ± 15 min; $p < 0,001$).

Uma segunda análise dos efeitos da intensidade do exercício sobre o desempenho físico está mostrada no GRÁFICO 2B que representa o percentual de animais que permaneciam correndo em cada tempo de exercício. É possível observar que essa curva está deslocada para a esquerda principalmente durante o exercício realizado a 24 m/min em relação às situações 18 e 21 m/min. Quando todos os animais já haviam interrompido o exercício a 24 m/min, 89% e 67% dos animais ainda estavam correndo a 18 e 21 m/min, respectivamente. Um teste de qui-quadrado foi utilizado para verificar se existiam diferenças na probabilidade de os animais interromperem o exercício em tempos diferentes ao se comparar as três intensidades de exercício. O teste mostrou que, para os tempos de exercício analisados (do minuto 30 ao minuto 290), foram observadas diferenças entre as três intensidades na probabilidade de os animais interromperem a corrida ($p < 0,001$).

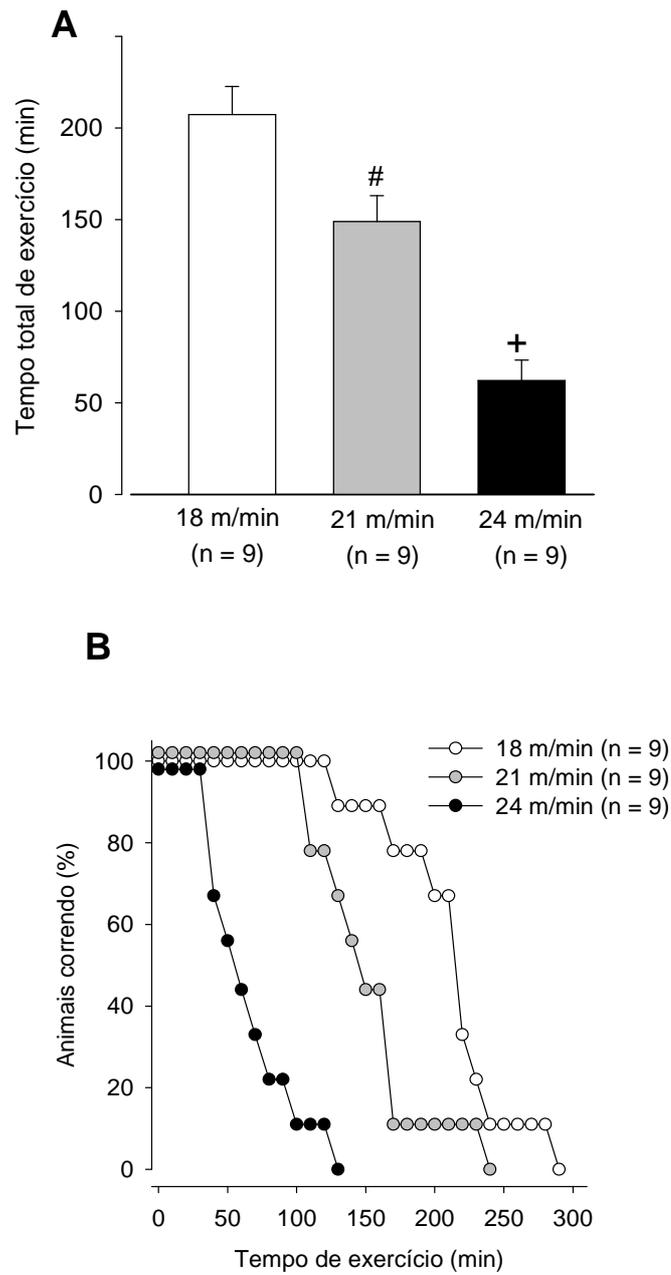


GRÁFICO 2. (A) Tempo total de exercício de ratos submetidos à corrida na esteira rolante com três velocidades constantes (18, 21 e 24 m/min). Os dados estão expressos como média \pm EPM. + $p < 0,05$ em comparação com 18 e 21 m/min; # $p < 0,05$ em comparação com 18 m/min. (B) Percentual de animais que permaneciam correndo em diferentes tempos de exercício para cada velocidade de corrida estudada.

Na situação repouso, durante a qual os animais puderam se mover livremente em suas gaiolas individuais, a temperatura cerebral foi, em média, $37,18 \pm 0,09^{\circ}\text{C}$. Diferentemente da situação repouso, as três intensidades de exercício analisadas induziram aumentos na temperatura cerebral (GRÁFICO 3). A temperatura cerebral foi maior em comparação aos valores pré-exercício a partir do quinto minuto de exercício (minuto 5: V18: $37,87 \pm 0,06^{\circ}\text{C}$; V21: $37,81 \pm 0,14^{\circ}\text{C}$; V24: $37,83 \pm 0,13^{\circ}\text{C}$ *versus* minuto 0: V18: $37,17 \pm 0,10^{\circ}\text{C}$; V21: $37,31 \pm 0,08^{\circ}\text{C}$; V24: $37,18 \pm 0,07^{\circ}\text{C}$; $p < 0,05$) e continuou aumentando durante todo o período de corrida na esteira. Como observado para o tempo total de exercício, o aumento na temperatura cerebral foi dependente da velocidade de corrida na esteira. Maiores valores de temperatura cerebral foram observados para a maior intensidade de exercício (24 m/min), em comparação com as outras duas intensidades do 23° ao 31° minuto de exercício (minuto 31: V24 $39,32 \pm 0,19^{\circ}\text{C}$ *versus* V18: $38,48 \pm 0,20^{\circ}\text{C}$ e V21: $38,73 \pm 0,14^{\circ}\text{C}$; $p < 0,05$). A temperatura cerebral também foi maior durante a corrida na esteira realizada a 21 m/min em relação à corrida realizada a 18 m/min do 50° ao 100° minuto de exercício (minuto 100: V21: $40,35 \pm 0,34^{\circ}\text{C}$ *versus* V18: $39,79 \pm 0,20^{\circ}\text{C}$; $p < 0,05$). Entretanto, no momento da IVE não foram observadas diferenças na temperatura cerebral entre as três intensidades de exercício (V18: $40,45 \pm 0,26^{\circ}\text{C}$; V21: $40,31 \pm 0,28^{\circ}\text{C}$; V24: $40,10 \pm 0,20^{\circ}\text{C}$; $p = 0,463$).

Durante o período de pós-exercício, a temperatura cerebral diminuiu em todas as situações experimentais (GRÁFICO 4). Apesar de apresentar uma taxa de redução de $-0,05^{\circ}\text{C}/\text{min}$, a temperatura cerebral permaneceu aumentada após trinta minutos de pós-exercício quando comparado aos valores pré-exercício (minuto 30 pós-exercício: V18: $38,94 \pm 0,22^{\circ}\text{C}$; V21: $38,53 \pm 0,16^{\circ}\text{C}$; V24: $38,52 \pm 0,15^{\circ}\text{C}$ *versus* minuto 0: V18: $37,17 \pm 0,10^{\circ}\text{C}$; V21: $37,31 \pm 0,08^{\circ}\text{C}$; V24: $37,18 \pm 0,07^{\circ}\text{C}$; $p < 0,05$). Não foram observadas diferenças entre as três intensidades de exercício na temperatura cerebral durante o período de pós-exercício.

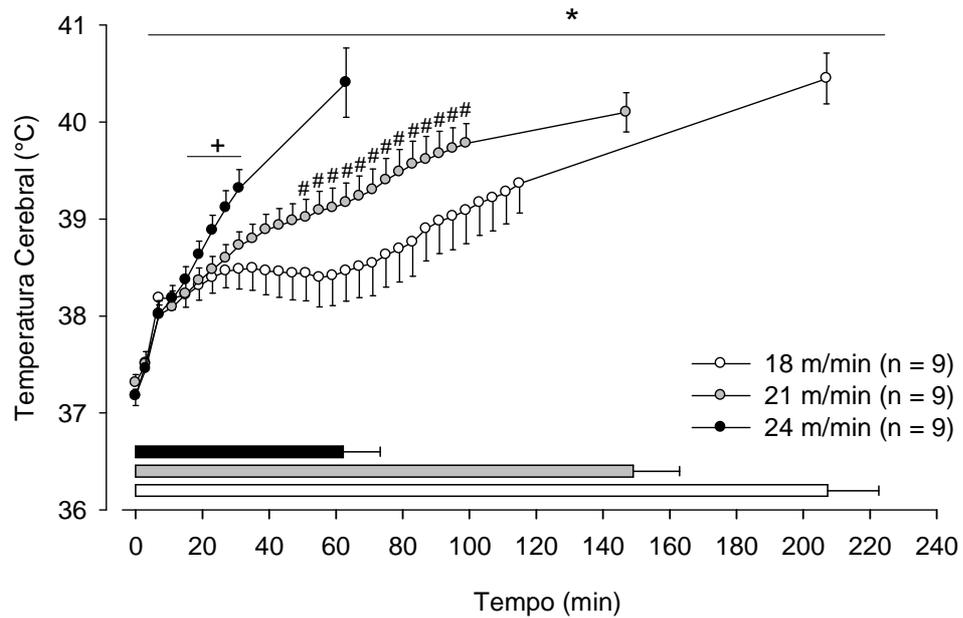


GRÁFICO 3. Temperatura cerebral de ratos durante a realização do exercício na esteira rolante com três velocidades constantes. Os dados estão expressos como média \pm EPM. As barras horizontais apresentadas na parte inferior da figura representam o tempo total de exercício * $P < 0,05$ em comparação ao minuto 0.; + $P < 0,05$ em comparação com 18 m/min e 21 m/min; # $P < 0,05$ em comparação com 18 m/min.

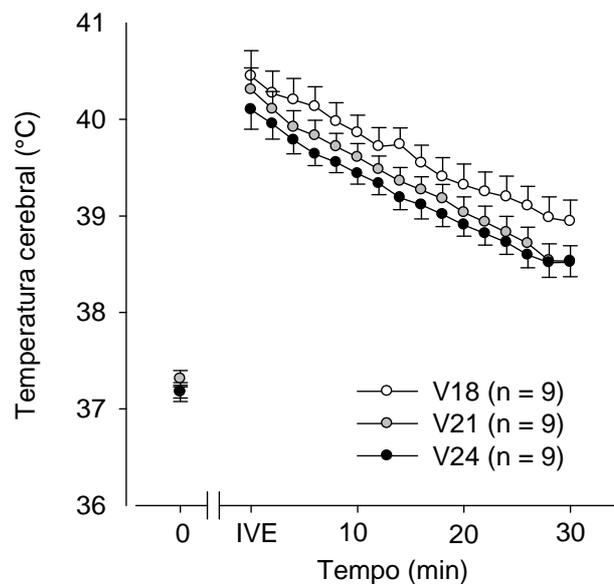


GRÁFICO 4. Temperatura cerebral de ratos, submetidos ao exercício em esteira rolante em três diferentes velocidades, durante o período de 30 minutos pós-exercício. Os dados estão expressos como média \pm EPM.

A velocidade da corrida também modificou a taxa de aumento da temperatura cerebral (GRÁFICO 5A). Quando o exercício foi realizado na intensidade de 24 m/min a taxa de aumento da temperatura cerebral foi maior em comparação às outras duas intensidades (V24: $0,058 \pm 0,009^{\circ}\text{C}/\text{min}$ versus V18: $0,017 \pm 0,002^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e V21: $0,021 \pm 0,002^{\circ}\text{C}/\text{min}$; $p < 0,001$). No entanto, não foram observadas diferenças na taxa de aumento da temperatura cerebral entre as duas menores intensidades de exercício. Ao analisar a associação entre o tempo total de exercício e a taxa de aumento da temperatura cerebral para cada intensidade de exercício, foram observadas correlações significativas para todas as velocidades de corrida estudadas (V18: $r = -0,74$; V21: $r = -0,67$; V24: $-0,81$; $p < 0,05$ para as três velocidades; GRÁFICO 5B).

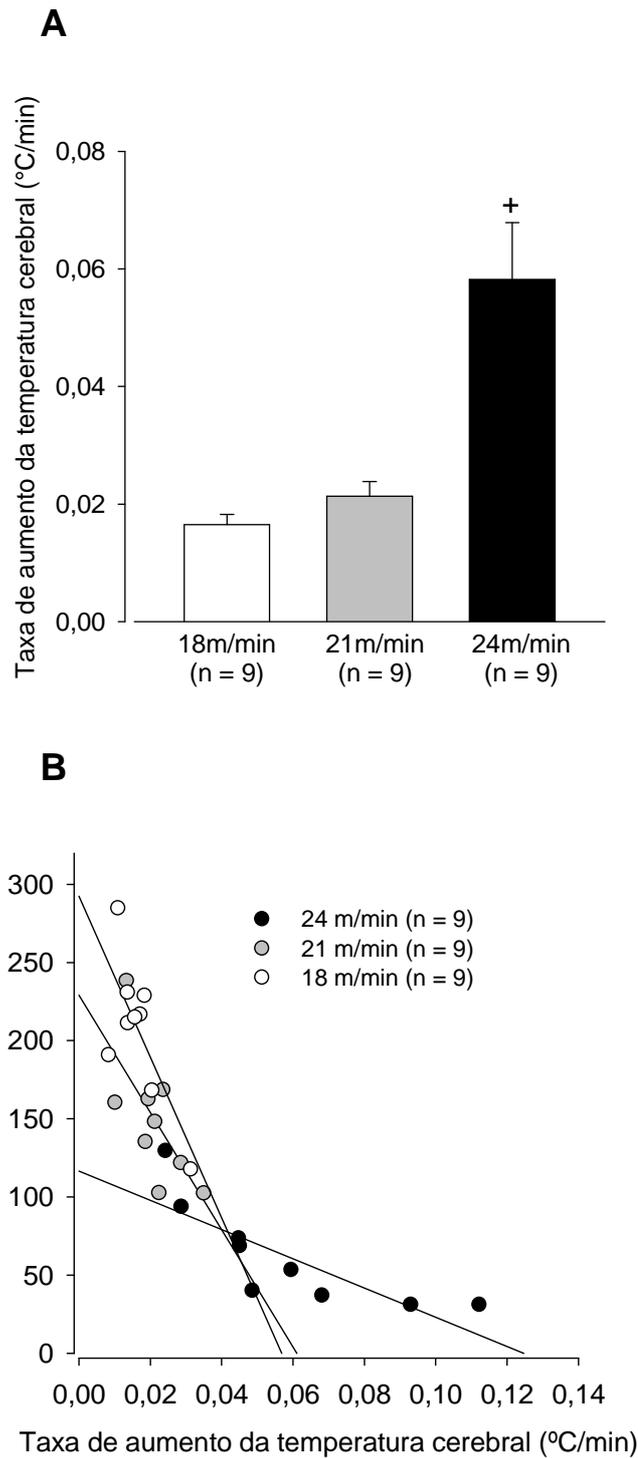


GRÁFICO 5. (A) Taxa de aumento na temperatura cerebral de ratos submetidos a três exercícios de velocidade constante na esteira rolante. Os dados estão expressos como média \pm EPM. + $P < 0,001$ comparado com 18 m/min e 21 m/min. (B) Correlação entre taxa de aumento na temperatura cerebral e tempo total de exercício para cada velocidade de corrida estudada.

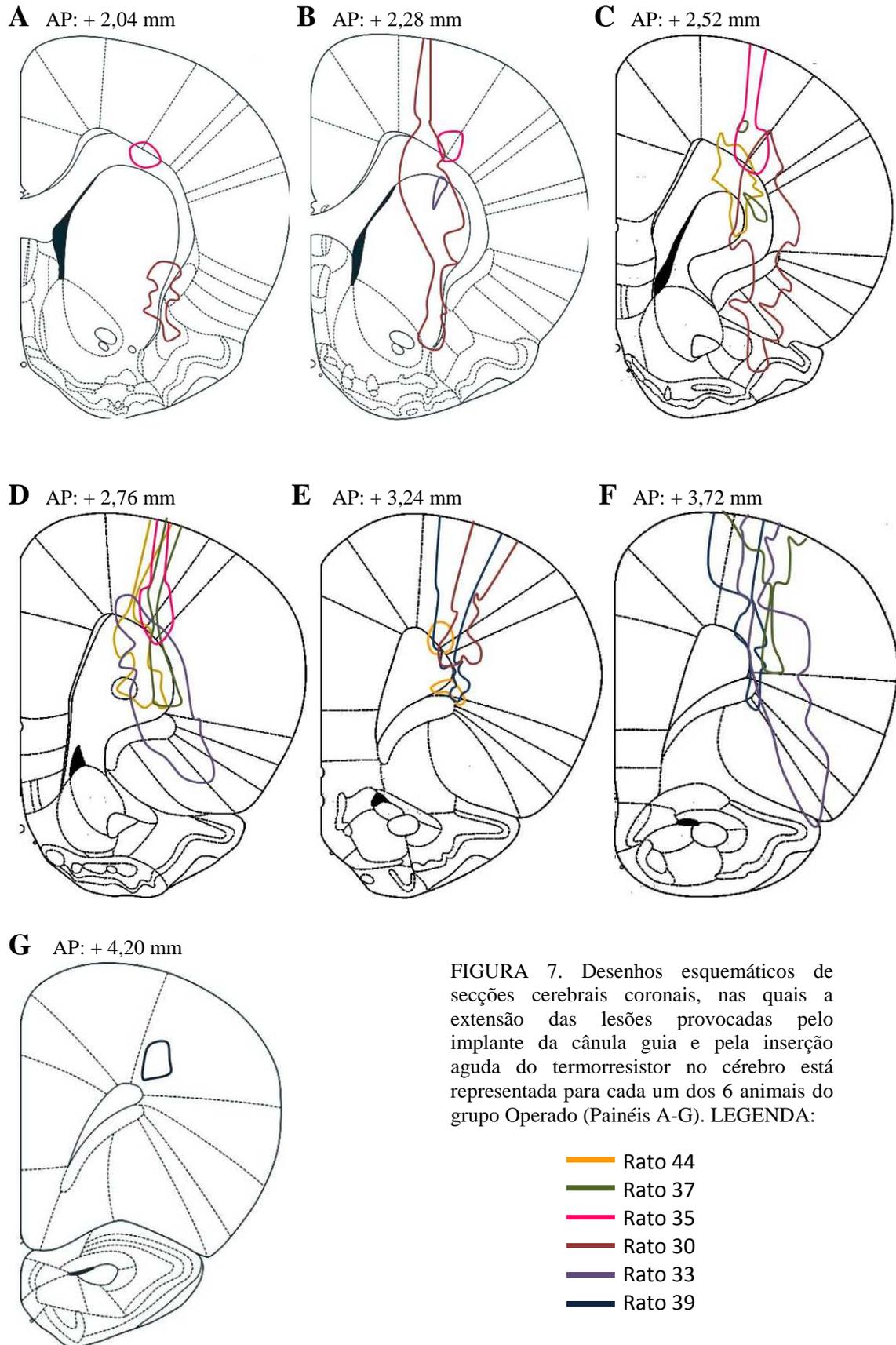
3.2 Delineamento experimental 2

3.2.1 *Análise histológica*

Nesse segundo delineamento experimental, o principal objetivo da análise histológica foi identificar a extensão das lesões provocadas pela cânula guia e pelo termorresistor. Dessa forma, toda a área lesionada pela cânula guia e pelo termorresistor foi representada para cada rato em desenhos esquemáticos retirados do atlas de PAXINOS e WATSON (2007), (FIGURA 7 A – G).

As lesões provocadas pela cânula guia e pelo termorresistor foram observadas em coordenadas ântero-posteriores que variaram de 4,20 a 2,04 mm, sendo que, em três ratos, as lesões se concentraram em regiões mais rostrais (entre 4,2 e 3,24 mm anterior ao bregma) e, nos outros três animais, essas lesões foram observadas principalmente em regiões mais caudais (entre 3,24 e 2,04 mm anterior ao bregma). Em relação à coordenada dorso-ventral, em três ratos, as lesões se estenderam até coordenadas dorso-ventrais que variaram de 5,0 a 7,0 mm de profundidade a partir do crânio, atingindo regiões mais ventrais: LO, claustro, camadas 2 e 3 do córtex, córtex insular disgranular (DI), córtex agranular insular dorsal (AID) e AIV. Entretanto, em outros três animais, as lesões se restringiram a regiões mais dorsais (de 4,0 a 2,4 mm de profundidade): M1, FR3, S1J, corpo caloso (fmi), CPu. Em relação às coordenadas médio-laterais, as lesões apresentaram menor variação entre os animais, sendo as lesões observadas entre 2,2 a 3,5 mm à direita do bregma.

Além de identificar a extensão das lesões, foi também importante verificar a localização da ponta do termorresistor para identificar em qual região do cérebro foi feita a medida de temperatura durante o exercício progressivo. Foi observado que, em quatro dos seis animais, a ponta do termorresistor estava localizada em regiões corticais: SIJ, LO e camadas 2 e 3 do córtex. Em um rato, a ponta do termorresistor estava localizada sobre o fmi e, em outro animal, sobre o CPu e fmi.



3.2.2 Temperatura ambiente e massa corporal

Como mostrado na TABELA 2, durante todos os exercícios progressivos, a temperatura ambiente foi maior no momento da IVE em relação ao início do exercício. No entanto, em nenhum dos três exercícios realizados, foram observadas diferenças entre os grupos tanto na temperatura ambiente no início do exercício quanto na temperatura ambiente no momento da IVE (TABELA 2). Além disso, a massa corporal dos animais do grupo Operado não foi diferente daquela observada para os animais controles em nenhum dos três exercícios progressivos (TABELA 2).

TABELA 2.

Valores médios da temperatura ambiente no início do exercício e no momento da IVE durante os três exercícios com aumentos progressivos da velocidade realizados pelos animais dos grupos Controle e Operado. A tabela mostra ainda os valores médios da massa corporal dos animais de cada grupo no dia da realização dos experimentos.

Situação	Temperatura ambiente			Massa Corporal
	Inicial	IVE	<i>p</i>	
<i>Controle</i>				
1º progressivo	24,92 ± 0,33°C	26,23 ± 0,22°C	<i>p</i> < 0,05	287 ± 5 g
2º progressivo	24,12 ± 0,27°C	25,84 ± 0,30°C	<i>p</i> < 0,05	320 ± 8 g
3º progressivo	24,52 ± 0,27 °C	25,59 ± 0,37 °C	<i>p</i> < 0,05	332 ± 8 g
<i>Operado</i>				
1º progressivo	24,65 ± 0,42°C	25,88 ± 0,34°C	<i>p</i> < 0,05	285 ± 4 g
Progressivo cânula	24,49 ± 0,24°C	25,93 ± 0,24°C	<i>p</i> < 0,05	318 ± 7 g
Progressivo sensor	24,66 ± 0,29 °C	25,86 ± 0,25 °C	<i>p</i> < 0,05	319 ± 8 g
<i>p</i> grupo	<i>p</i> = 0,166	<i>p</i> = 0,926		<i>p</i> = 0,554

Os dados estão expressos como média ± EPM. (n= 6 para cada grupo)

3.2.3 Desempenho

No delineamento experimental 2, os animais foram inicialmente submetidos ao primeiro exercício progressivo para determinação da sua velocidade máxima de corrida, antes de serem alocados em um dos dois grupo (Controle ou Operado). Os animais foram, então, divididos nos dois grupos, de maneira que a velocidade máxima de corrida atingida no

primeiro exercício progressivo não fosse diferente entre os grupos Controle e Operado (Controle: $27,9 \pm 1,3$ m/min *versus* Operado: $28,6 \pm 0,9$ m/min; $p = 0,977$; GRÁFICO 6).

A realização dos experimentos do grupo Controle teve como objetivo verificar se a aprendizagem ou os efeitos associados ao treinamento poderiam aumentar o desempenho durante o segundo e terceiro exercícios progressivos. Não foram observadas diferenças na velocidade máxima de corrida atingida pelos animais do grupo Controle durante os três exercícios (Primeiro exercícios: $27,9 \pm 1,3$ m/min *versus* Segundo exercícios: $29,8 \pm 2,4$ m/min *versus* Terceiro exercícios: $27,8 \pm 2,0$ m/min; $p = 0,917$; GRÁFICO 6).

O principal objetivo desse segundo experimento foi verificar se as lesões causadas pelo implante crônico da cânula guia ou pela inserção aguda do termorresistor no cérebro afetam o desempenho físico. Foi observado que a velocidade máxima de corrida atingida durante os exercícios progressivos não foi afetada pelas lesões crônicas causadas pela cânula guia ou pelas lesões agudas causadas pela inserção do termorresistor no cérebro (Primeiro exercício: $28,6 \pm 0,9$ m/min *versus* Cânula: $28,6 \pm 1,4$ m/min *versus* Termorresistor: $29,1 \pm 1,4$ m/min; $p = 0,977$; GRÁFICO 6)

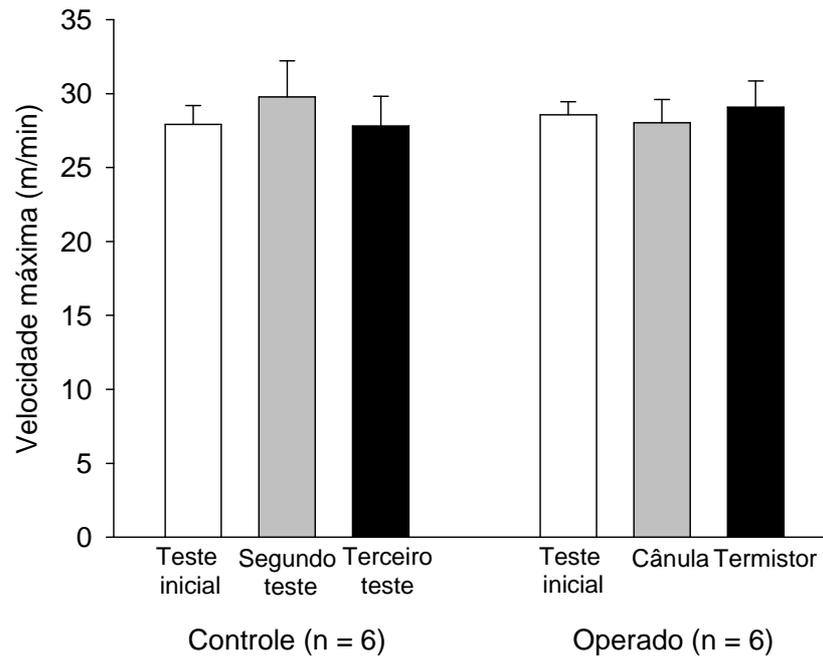


GRÁFICO 6. Velocidade máxima de corrida atingida pelos animais controles durante o exercício inicial, o segundo e o terceiro exercícios. O gráfico também mostra a velocidade máxima atingida pelos animais do grupo Operado durante o exercício inicial, o exercício com a cânula implantada e o exercício com a inserção do termorresistor através da cânula guia. Os dados estão expressos como média \pm EPM.

A temperatura cerebral foi medida durante o exercício progressivo, no qual o termorresistor foi inserido através da cânula guia. Esse protocolo de exercício também induziu aumento na temperatura cerebral, o qual não foi diferente daquele observado durante o exercício com velocidade constante de 18 m/min. Entretanto, a temperatura cerebral medida durante o exercício progressivo foi menor em comparação com aquela medida durante a corrida a 24 m/min do 19º minuto (exercício progressivo: $38,08 \pm 0,19^\circ\text{C}$ versus V24: $38,63 \pm 0,14^\circ\text{C}$; $p < 0,05$; GRÁFICO 7) até o final do exercício. Ainda, diferenças na temperatura cerebral entre o exercício progressivo e o exercício realizado a 21 m/min foram observadas do 30º minuto (exercício progressivo: $38,18 \pm 0,24^\circ\text{C}$ versus V21: $38,74 \pm 0,15^\circ\text{C}$; $p < 0,05$; GRÁFICO 7) até o final do exercício. No momento da interrupção voluntária do esforço, a temperatura cerebral foi menor durante o exercício progressivo em relação aos três exercícios constantes (exercício progressivo: $39,30 \pm 0,25^\circ\text{C}$ versus V18: $40,45 \pm 0,26^\circ\text{C}$ versus V21: $40,31 \pm 0,28^\circ\text{C}$ versus V24: $40,10 \pm 0,20^\circ\text{C}$; $p < 0,05$).

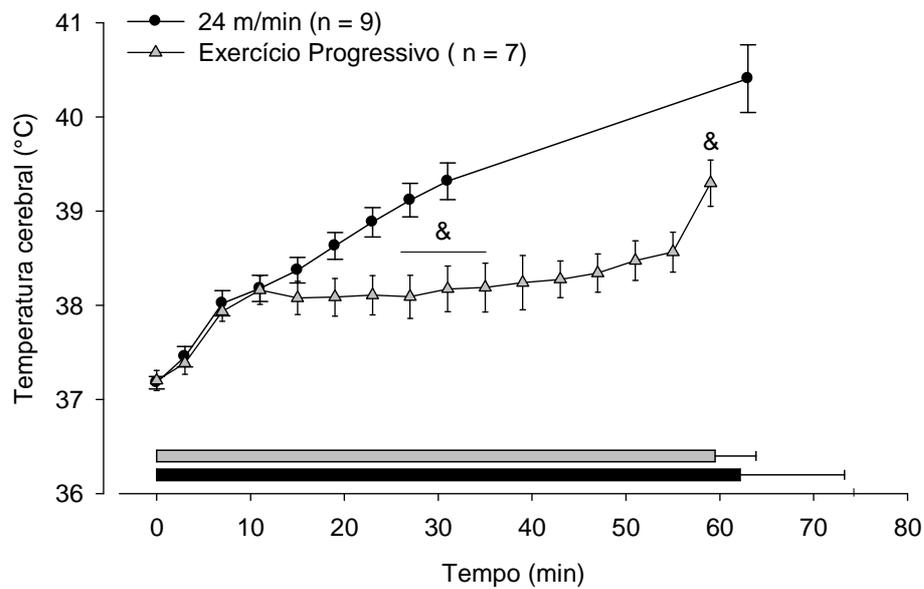


GRÁFICO 7. Temperatura cerebral de ratos durante o exercício com velocidade constante de 24 m/min, e durante o exercício com aumentos progressivos da velocidade. Os dados estão expressos como média \pm EPM. As barras horizontais apresentadas na parte inferior da figura representam o tempo total de exercício. & $p < 0,05$ em comparação com o exercício com velocidade constante de 24 m/min.

3.3 Delineamento experimental 3

3.3.1 Protocolo 1

3.3.1.1 Análise histológica

Os painéis A-F da FIGURA 8 mostram desenhos esquemáticos, retirados do atlas de PAXINOS e WATSON (2007), indicando a localização da ponta dos termorresistores (definida como a lesão mais ventral observada no tecido cerebral). Foram realizados testes t de Student para verificar se existiam diferenças na localização da ponta do termorresistor entre os animais do grupo Controle e RTX. O resultado dessas análises mostrou que não houve diferenças entre os animais dos dois grupos em nenhuma das três coordenadas (TABELA 3). Dessa forma, os valores de temperatura cerebral foram comparados entre os

grupos, sem qualquer preocupação em relação às coordenadas estereotáticas da localização da ponta dos termorresistores.

Em oito dos catorze animais utilizados no protocolo 1, a ponta do termorresistor estava localizada em regiões dorsais do córtex frontal direito (3,0 a 4,0 mm de profundidade a partir do crânio): FR3, SIJ e M1. Já em outros cinco ratos, o termorresistor atingiu regiões ventrais do córtex frontal (4,5 a 5,5 mm de profundidade): LO, AIV e AID. Em apenas um animal, a ponta do termorresistor foi posicionada sobre o corpo caloso próximo à região cortical SIJ (4,2 mm de profundidade).

Com relação à localização ântero-posterior da ponta do termorresistor, também foi observada uma grande variação entre os catorze animais: em nove ratos, a lesão causada pelo termorresistor foi observada em regiões mais rostrais (4,20 a 3,24 mm anterior ao bregma), enquanto, nos outros cinco, ratos a ponta do termorresistor estava posicionada em estruturas mais caudais (2,76 a 2,16 mm anterior ao bregma). Entretanto, a localização das pontas dos termorresistores apresentou menor variação em relação às coordenadas médio-laterais (3,0 a 4,0 mm à direita do bregma).

TABELA 3.

Valores médios das coordenadas médio-laterais, dorso-ventrais e ântero-posteriores referentes à localização da ponta do termorresistor dos animais de cada grupo (Controle e RTX).

Grupo	Coordenada		
	Ântero-posterior	Médio-lateral	Dorso-ventral
Controle	2,90 ± 0,10 mm	3,07 ± 0,19 mm	3,93 ± 0,35 mm
RTX	3,35 ± 0,20 mm	3,18 ± 0,17 mm	4,04 ± 0,39 mm
P _{grupo}	<i>p</i> = 0,091	<i>p</i> = 0,390	<i>p</i> = 0,830

Os dados estão expressos como média ± EPM. (n = 7 para cada grupo).

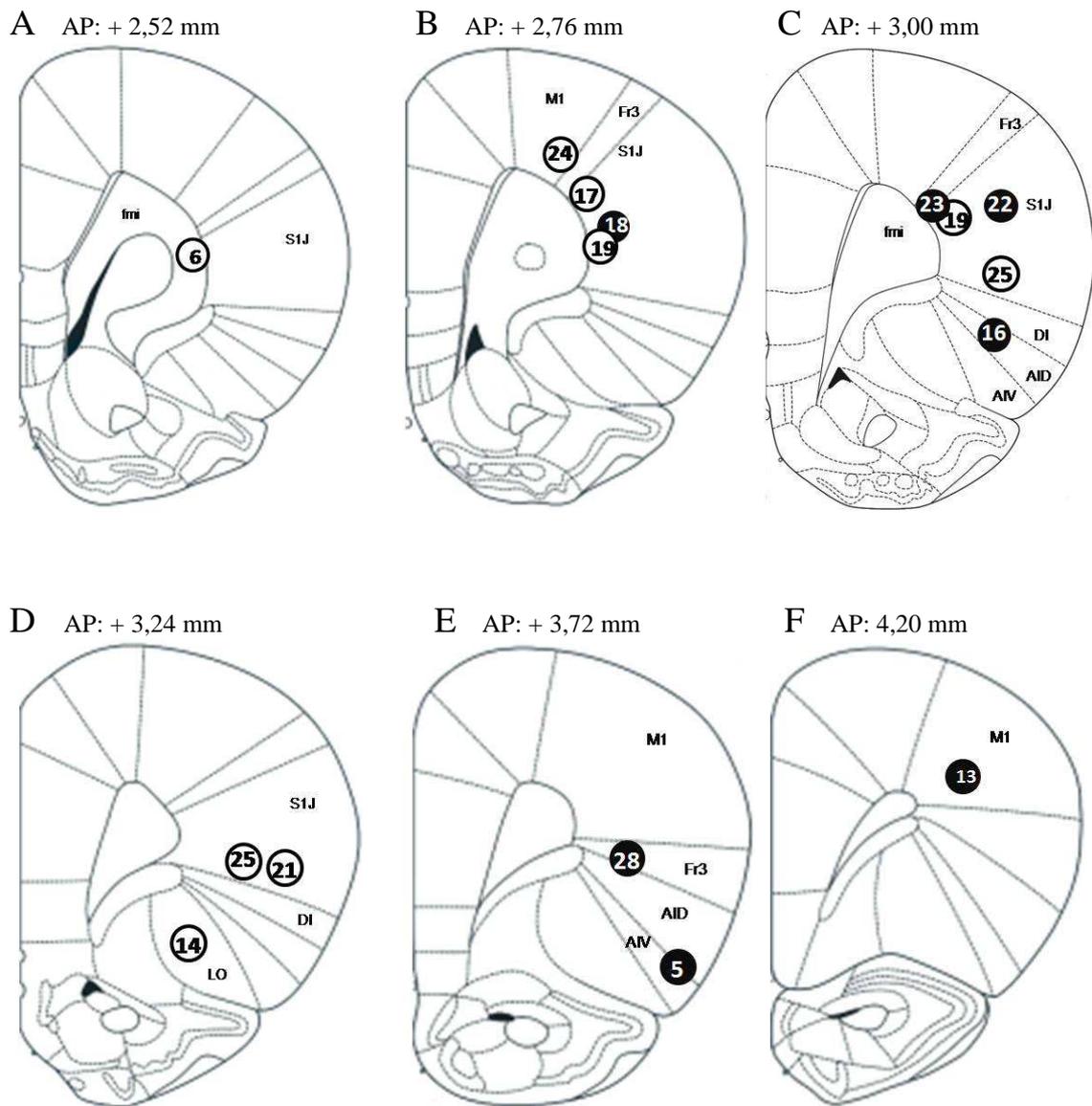


FIGURA 8. Desenhos esquemáticos de secções cerebrais coronais, nos quais a localização da ponta do termorresistor está representada para cada um dos 14 animais utilizados neste protocolo experimental (Painéis A-F). Legenda: ○ controle; ● RTX; AID, córtex agranular insular dorsal; AIV, córtex agranular insular ventral; fmi, corpo caloso; DI, córtex disgranular insular; fmi, corpo caloso; Fr3, área frontal 3; LO, córtex lateral orbital; M1, córtex motor primário; S1J, córtex somatossensorial primário, região maxilar.

3.3.1.2 Temperatura ambiente e massa corporal

No protocolo 1 do delineamento experimental 3, cada rato foi submetido a três exercícios progressivos: o primeiro foi realizado um dia antes de os animais receberem a injeção de RTX ou veículo (pré-injeção em ambiente termoneutro) e os outros dois exercícios foram realizados de sete a nove dias após os animais terem sido injetados com RTX ou veículo (exercícios pós-injeção em ambiente termoneutro e em ambiente quente; ver tópico 2.3.3). Em todos os três exercícios progressivos, a temperatura ambiente no início da corrida e no momento da IVE não foi diferente entre os grupos (TABELA 4).

A massa corporal dos animais, no dia do exercício progressivo pré-injeção, não foi diferente entre os ratos que, na sequência, foram tratados com RTX ou veículo. Entretanto, no dia dos exercícios progressivos realizados após a injeção, independente do ambiente, a massa corporal dos animais tratados com RTX foi aproximadamente 20 g menor quando comparada à massa corporal dos animais controles (TABELA 4).

TABELA 4.

Valores médios da temperatura ambiente no início e no momento da IVE durante os três exercícios com aumentos progressivos da velocidade (pré-injeção em ambiente termoneutro, pós-injeção em ambiente termoneutro ou ambiente quente) realizados pelos animais dos grupos RTX e Controle. A tabela mostra ainda os valores médios da massa corporal dos animais de cada grupo no dia da realização dos experimentos.

	Temperatura ambiente		Massa Corporal
	Inicial	IVE	
<i>Pré- injeção em ambiente termoneutro</i>			
Controle	23,67 ± 0,27°C	25,15 ± 0,15°C	291 ± 2 g
RTX	23,82 ± 0,25°C	25,07 ± 0,26°C	292 ± 3 g
P _{grupo}	<i>p</i> = 0,909	<i>p</i> = 0,909	<i>p</i> = 0,745
<i>Pós-injeção em ambiente termoneutro</i>			
Controle	23,42 ± 0,08°C	25,40 ± 0,19°C	326 ± 5 g
RTX	23,82 ± 0,34°C	24,88 ± 0,19°C	306 ± 5 g
P _{grupo}	<i>p</i> = 0,939	<i>p</i> = 0,939	<i>p</i> < 0,01
<i>Pós-injeção em ambiente quente</i>			
Controle	30,06 ± 0,38°C	30,93 ± 0,15°C	334 ± 5 g
RTX	30,37 ± 0,22°C	30,86 ± 0,23°C	315 ± 5 g
P _{grupo}	<i>p</i> = 0,939	<i>p</i> = 0,939	<i>p</i> = 0,01

Os dados estão expressos como média ± EPM. (n = 7 para cada grupo).

3.3.1.3 Desempenho

A velocidade máxima de corrida atingida pelos animais dos dois grupos não foi diferente durante o exercício progressivo realizado previamente à injeção de RTX ou veículo (RTX: 29,2 ± 0,7 m/min *versus* Controle: 28,7 ± 0,7 m/min; *p* = 0,609; GRÁFICO 8). O tratamento com RTX não modificou a velocidade máxima atingida durante o exercício em ambiente termoneutro (RTX: 28,4 ± 0,8 m/min *versus* Controle: 28,8 ± 1,3 m/min; *p* = 0,796) e em ambiente quente (RTX: 23,4 ± 0,7 m/min *versus* Controle: 23,1 ± 1,6 m/min; *p* = 0,841). Respostas semelhantes foram observadas quando a análise do desempenho foi feita utilizando-se o tempo total de exercício: exercício pré-injeção em ambiente termoneutro (RTX: 60 ± 2 min *versus* Controle: 59 ± 2 min; *p* = 0,670), exercício pós-injeção em ambiente termoneutro (RTX: 58 ± 2 min *versus* Controle: 59 ± 4 min; *p* = 0,796), exercício pós-injeção em ambiente quente (RTX: 43 ± 2 min *versus* Controle: 42 ± 5 min; *p* = 0,841).

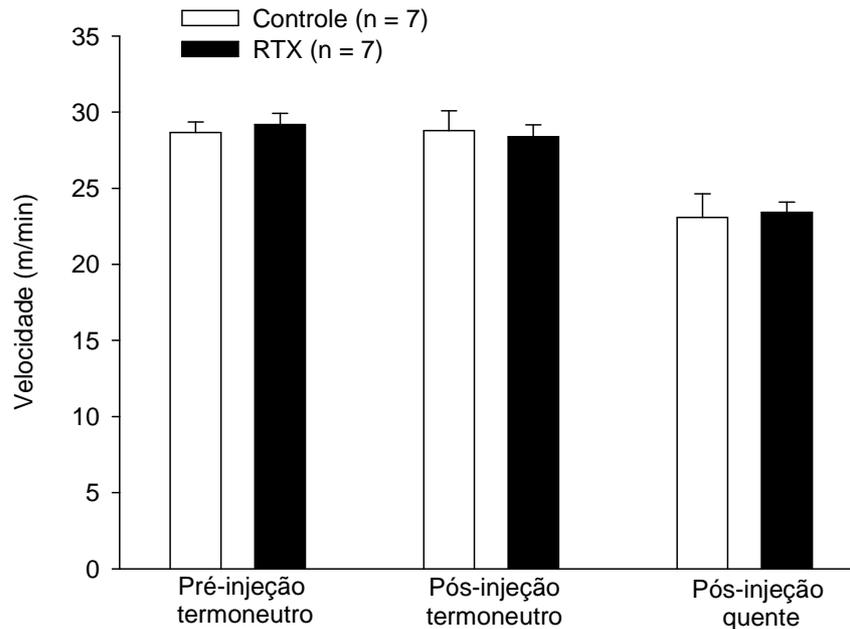


GRÁFICO 8. Velocidade máxima atingida pelos animais dos grupos Controle e RTX durante os exercícios com aumentos progressivos da velocidade realizados antes da injeção da droga ou do veículo (pré-injeção em ambiente termoneutro) e após terem sido feitos os tratamentos (pós-injeção em ambiente termoneutro e em ambiente quente). Os dados estão expressos como média \pm EPM.

Uma vez que a massa corporal dos animais do grupo RTX foi menor que a massa dos animais controles, nós decidimos comparar o trabalho realizado pelos ratos dos dois grupos durante os exercícios progressivos (GRÁFICO 9). Assim como observado para a velocidade máxima de corrida e para o tempo total de exercício, o trabalho realizado pelos ratos do grupo RTX não foi diferente daquele realizado pelos animais controles em nenhum dos três exercícios progressivos: exercício pré-injeção em ambiente termoneutro (RTX: $31,9 \pm 1,9$ kgm *versus* Controle: $32,6 \pm 1,8$ kgm; $p = 0,773$), exercício pós-injeção em ambiente termoneutro (RTX: $29,9 \pm 1,7$ kgm *versus* Controle: $31,3 \pm 5,1$ kgm; $p = 0,808$), exercício pós-injeção em ambiente quente (RTX: $17,9 \pm 1,3$ kgm *versus* Controle: $21,0 \pm 3,4$ kgm; $p = 0,782$).

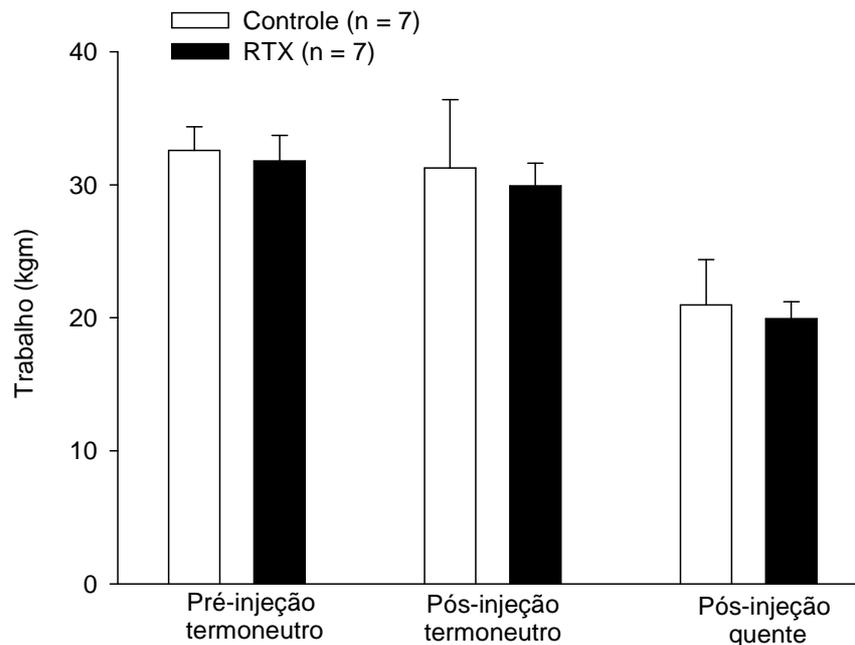


GRÁFICO 9. Trabalho realizado pelos animais dos grupos Controle e RTX durante os exercícios com aumentos progressivos da velocidade realizados antes da injeção da droga ou do veículo (pré-injeção em ambiente termoneutro) e após terem sido feitos os tratamentos (pós-injeção em ambiente termoneutro e em ambiente quente). Os dados estão expressos como média \pm EPM. exercício

3.3.1.4 Termorregulação

Ao contrário do que foi observado para o desempenho, o tratamento com RTX afetou a regulação da temperatura cerebral e da pele durante o exercício progressivo.

Como esperado, durante o exercício progressivo realizado em ambiente termoneutro, a temperatura cerebral aumentou nos animais de ambos os grupos (GRÁFICO 10). Tanto para os animais do grupo Controle quanto para os do grupo RTX, o aumento na temperatura cerebral foi observado a partir do sétimo minuto de exercício em relação ao minuto 0 (minuto 7: Controle: $37,62 \pm 0,08^{\circ}\text{C}$; RTX: $37,76 \pm 0,13^{\circ}\text{C}$ versus minuto 0: Controle: $36,93 \pm 0,06$; RTX: $37,02 \pm 0,07^{\circ}\text{C}$; $p < 0,05$). Esse aumento da temperatura cerebral persistiu até o momento da IVE. No entanto, os ratos que foram tratados com RTX apresentaram um maior aumento da temperatura cerebral durante o exercício em comparação com os animais controles. As diferenças na temperatura cerebral entre os animais dos dois grupos foram observadas a partir do 13º minuto de corrida (RTX: $38,50 \pm 0,14^{\circ}\text{C}$ versus Controle: $37,75 \pm$

0,18°C; $p < 0,05$) e se mantiveram até o momento da IVE (RTX: $39,85 \pm 0,23^\circ\text{C}$ *versus* Controle: $38,99 \pm 0,20^\circ\text{C}$; $p < 0,05$).

Acompanhando o aumento da temperatura cerebral, a temperatura da pele da cauda aumentou durante o exercício progressivo em ambiente termoneutro nos animais de ambos os grupos. No entanto, foi observado um atraso no início do aumento da temperatura da cauda nos animais que foram tratados com RTX (GRÁFICO 10). No grupo Controle, a temperatura da cauda aumentou 12 minutos após o início da corrida (minuto 12: $28,99 \pm 0,75^\circ\text{C}$ *versus* minuto 0: $26,49 \pm 0,32^\circ\text{C}$; $p < 0,05$). Entretanto, no grupo RTX, o aumento na temperatura da cauda foi observado somente 18 minutos após o exercício ter sido iniciado (minuto 18: $29,00 \pm 1,29^\circ\text{C}$ *versus* minuto 0: $26,44 \pm 0,27^\circ\text{C}$; $p < 0,05$). Menores valores de temperatura da cauda foram observados nos animais do grupo RTX em relação aos animais controles do 11° ao 23° minuto de exercício (minuto 14: RTX: $26,85 \pm 0,93^\circ\text{C}$ *versus* Controle: $30,28 \pm 0,89^\circ\text{C}$; $p < 0,05$).

Para evitar a interferência da temperatura cerebral e da temperatura ambiente na interpretação da dissipação de calor para o ambiente, o índice de dissipação de calor (IDC) foi calculado. Os resultados obtidos para essa variável foram semelhantes àqueles observado para a temperatura da pele da cauda (GRÁFICO 11). Nos animais do grupo Controle, o IDC aumentou após 14 minutos do início da corrida na esteira (minuto 14: $0,46 \pm 0,06$ *versus* minuto 0: $0,22 \pm 0,02$; $p < 0,05$). Enquanto, para os animais do grupo RTX, o aumento do IDC foi observado somente 20 minutos após o início do exercício (minuto 20: $0,38 \pm 0,09$ *versus* minuto 0: $0,20 \pm 0,01$; $p < 0,05$). O IDC foi menor nos animais do grupo RTX em comparação aos animais controles do 11° ao 23° minuto de exercício (minuto 14: RTX: $0,20 \pm 0,07$ *versus* Controle: $0,46 \pm 0,06$; $p < 0,05$).

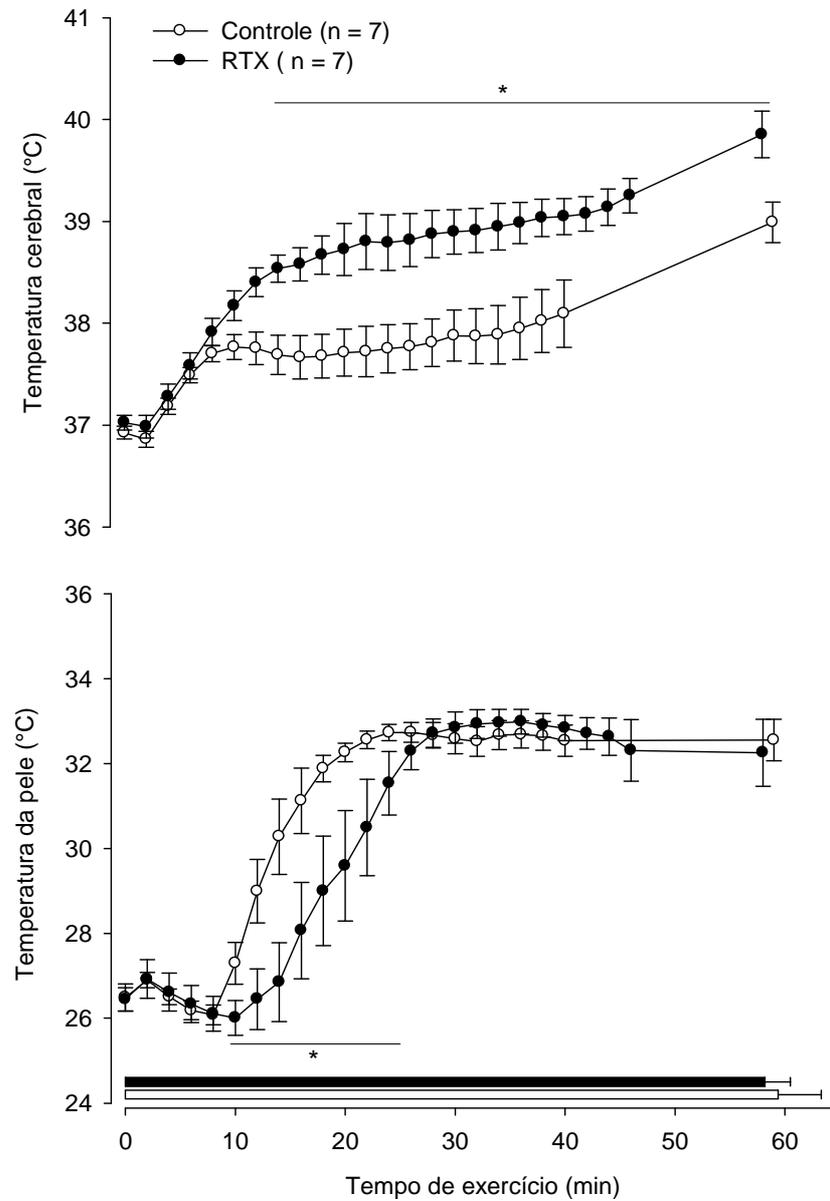


GRÁFICO 10. Temperatura cerebral (painel superior) e temperatura da pele da cauda (painel inferior) de ratos dos grupos Controle e RTX durante o exercício com aumentos progressivos da velocidade realizado em ambiente termoneuro. Os dados estão expressos como média ± EPM. As barras horizontais apresentadas na parte inferior da figura representam o tempo total de exercício. * $p < 0,05$ em comparação com os animais controles.

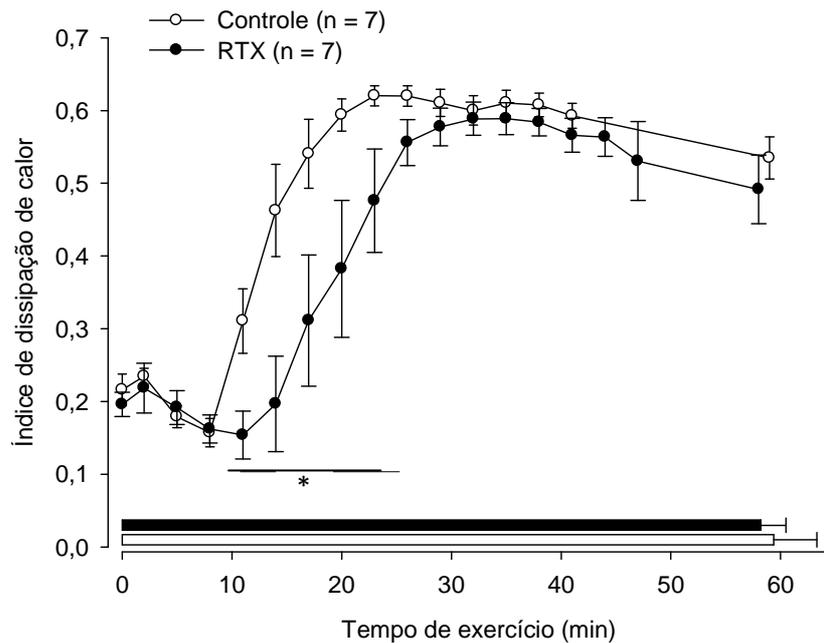


GRÁFICO 11. IDC de ratos dos grupos Controle e RTX durante o exercício com aumentos progressivos da velocidade realizado em ambiente termoneutro. Os dados estão expressos como média \pm EPM. As barras horizontais apresentadas na parte inferior da figura representam o tempo total de exercício. * $p < 0,05$ em comparação com os animais controles.

Semelhante ao que foi observado em ambiente termoneutro, o exercício progressivo realizado em ambiente quente também induziu ao aumento da temperatura cerebral dos animais. Durante esse exercício, também foi observado um maior aumento da temperatura cerebral nos animais do grupo RTX em relação aos animais controles (GRÁFICO 12). Nos animais tratados com veículo, a temperatura cerebral aumentou a partir do quinto minuto de exercício (minuto 5: $37,42 \pm 0,13^{\circ}\text{C}$ versus minuto 0: $36,80 \pm 0,13^{\circ}\text{C}$; $p < 0,05$) e manteve-se aumentada até o momento da interrupção da corrida. Já nos animais do grupo RTX, a temperatura cerebral aumentou a partir do quarto minuto de exercício (minuto 4: $37,75 \pm 0,16^{\circ}\text{C}$ versus minuto 0: $37,00 \pm 0,14^{\circ}\text{C}$; $p < 0,05$). Apenas seis minutos após o início da corrida na esteira, a temperatura cerebral dos animais tratados com RTX já estava maior quando comparada àquela observada nos animais controles (RTX: $38,14 \pm 0,18^{\circ}\text{C}$ versus Controle: $37,51 \pm 0,16^{\circ}\text{C}$; $p < 0,05$). Essa hipertermia exagerada observada nos animais do grupo RTX persistiu até o momento da IVE (RTX: $41,06 \pm 0,16^{\circ}\text{C}$ versus Controle: $39,90 \pm 0,23^{\circ}\text{C}$; $p < 0,001$).

A temperatura da pele da cauda também aumentou durante o exercício progressivo realizado em ambiente quente nos animais de ambos os grupos. Assim como observado durante o exercício realizado em ambiente termoneutro, houve um atraso no início do aumento da temperatura da cauda nos animais do grupo RTX em relação aos animais controles (GRÁFICO 12). Nos animais controles, o aumento na temperatura da cauda foi observado seis minutos após o início do exercício (Controle: minuto 6: $29,92 \pm 0,50^{\circ}\text{C}$ versus minuto 0: $27,70 \pm 0,61^{\circ}\text{C}$; $p < 0,05$), enquanto, nos animais tratados com RTX, a temperatura da cauda aumentou após oito minutos de exercício (RTX: minuto 8: $29,89 \pm 0,72^{\circ}\text{C}$ versus minuto 0: $27,81 \pm 0,33^{\circ}\text{C}$; $p < 0,05$). Entre o nono e o 14º minutos de exercício, a temperatura da cauda foi menor nos animais tratados com RTX em comparação aos animais controles (minuto 12: RTX: $31,74 \pm 1,10^{\circ}\text{C}$ versus Controle: $33,85 \pm 0,19^{\circ}\text{C}$; $p < 0,05$).

O tratamento com RTX também afetou significativamente a taxa de aumento da temperatura cerebral durante os exercícios progressivos. Nos ratos tratados com RTX, a taxa de aumento da temperatura cerebral foi maior em relação aos animais controles tanto em ambiente termoneutro (RTX: $0,049 \pm 0,005^{\circ}\text{C}/\text{min}$ versus Controle: $0,036 \pm 0,004^{\circ}\text{C}/\text{min}$; $p < 0,05$) quanto em ambiente quente (RTX: $0,095 \pm 0,007^{\circ}\text{C}/\text{min}$ versus Controle: $0,075 \pm 0,005^{\circ}\text{C}/\text{min}$; $p < 0,05$).

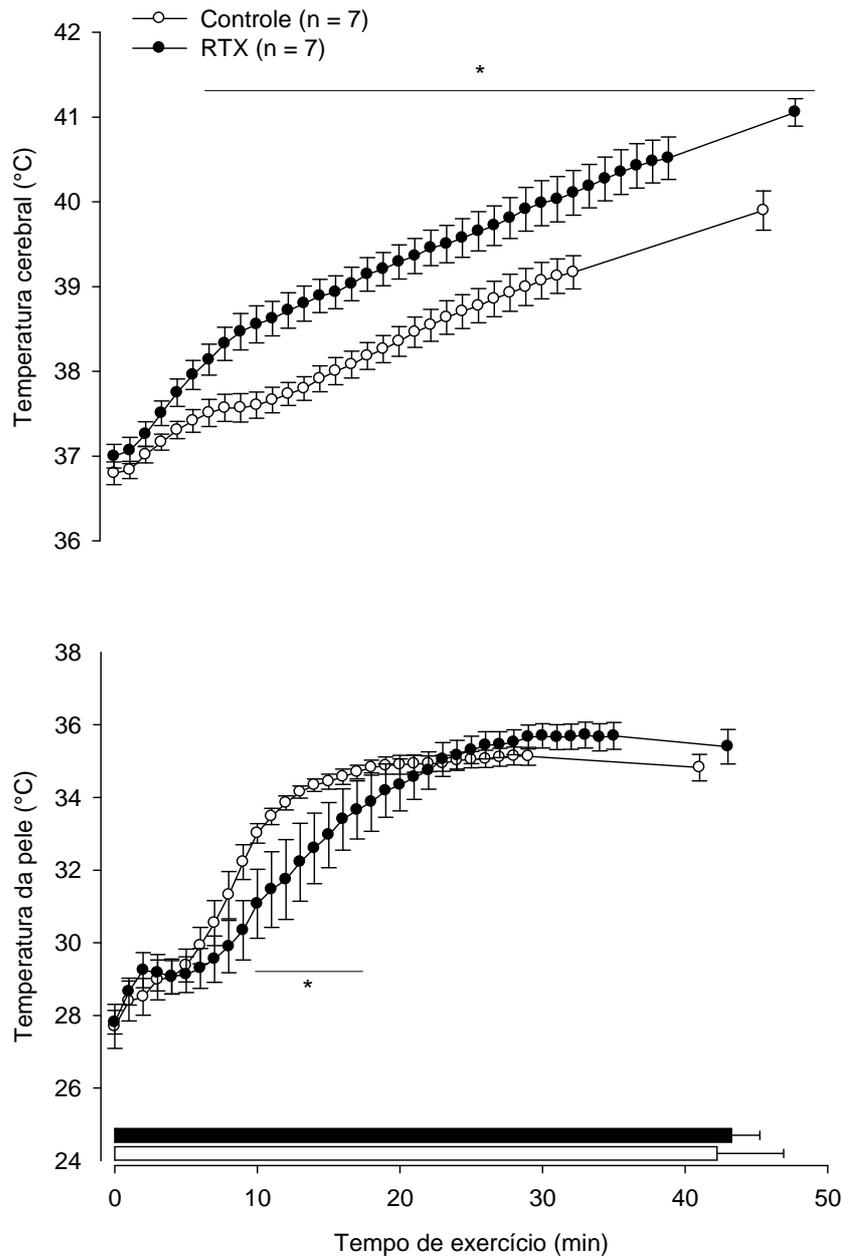


GRÁFICO 12. Temperatura cerebral (painel superior) e temperatura da pele da cauda (painel inferior) de ratos dos grupos Controle e RTX durante o exercício com aumentos progressivos da velocidade realizado em ambiente quente. Os dados estão expressos como média \pm EPM. As barras horizontais apresentadas na parte inferior da figura representam o tempo total de exercício. * $p < 0,05$ em comparação com os animais controles.

Como o principal estímulo que induz o aumento da dissipação de calor para o ambiente é o aumento da temperatura interna, nós decidimos apresentar os valores da temperatura da pele da cauda em função da temperatura cerebral com o objetivo de melhor avaliar se a dessensibilização dos canais TRPV1 periféricos afetou os mecanismos de dissipação de calor durante os exercícios progressivos (GRÁFICO 13). Foi observado que essa curva está deslocada para a direita nos ratos do grupo RTX para os dois exercícios progressivos, indicando que nos animais dessensibilizados houve um maior aumento da temperatura cerebral até que fosse observado o início do aumento da temperatura da cauda. Enquanto, nos animais controles, o aumento da temperatura da cauda foi observado quando a temperatura cerebral estava entre 37,4 e 37,6°C, nos animais tratados com RTX, a temperatura cauda começou a aumentar somente quando da temperatura cerebral já estava em aproximadamente 38,4 e 38,5°C.

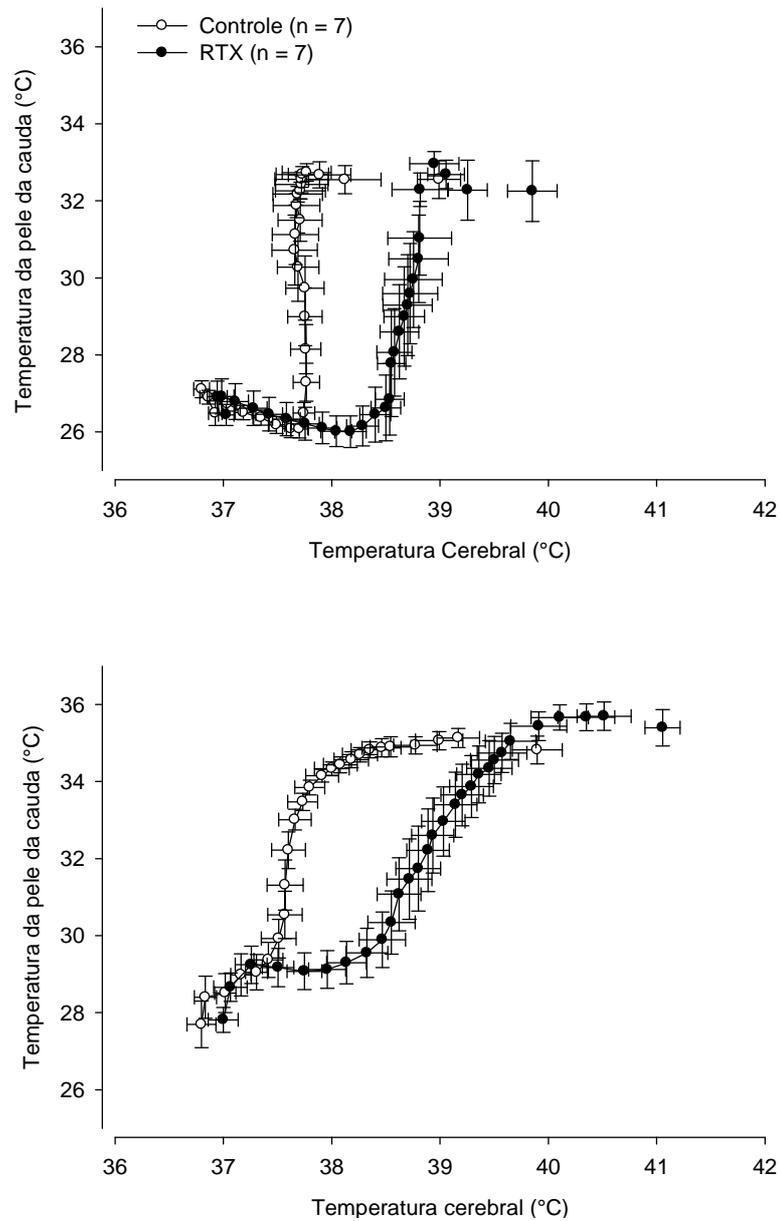


GRÁFICO 13. Curvas representando a temperatura da pele da cauda em função da temperatura cerebral medidas durante os exercícios com aumentos progressivos da velocidade realizados em ambiente termoneuro (painel superior) e quente (painel inferior). Os dados estão expressos como média \pm EPM.

3.3.2 *Protocolo 2*

3.3.2.1 Análise histológica

Os painéis A-F da FIGURA 9 mostram desenhos esquemáticos retirados do atlas de PAXINOS e WATSON (2007), indicando a localização da ponta dos termorresistores. Neste segundo protocolo, a localização da ponta dos termorresistores, considerando-se os valores médios das coordenadas ântero-posterior, médio-lateral e dorso-ventral, também não foi diferente entre os animais dos grupos Controle e RTX (TABELA 5). Dessa forma, os valores de temperatura cerebral foram comparados entre os grupos, sem qualquer preocupação em relação às coordenadas estereotáxicas da localização da ponta dos termorresistores.

A ponta do termorresistor foi posicionada sobre o córtex frontal direito em treze dos catorze animais, sendo que, em oito deles, o termorresistor estava localizado em regiões dorsais do córtex frontal direito (3,0 a 4,0 mm de profundidade a partir do crânio): FR3, SIJ e M1. Por outro lado, em outros cinco ratos, o termorresistor atingiu regiões ventrais do córtex frontal (4,5 a 5,5 mm de profundidade): LO, AIV e AID. Somente em um animal a ponta do termorresistor foi observada sobre o fmi, próximo à região M1 do córtex (3,0 mm de profundidade).

Neste segundo protocolo, também foi observada uma variação com relação à localização ântero-posterior da ponta do termorresistor: em 10 animais, a lesão causada pelo termorresistor foi observada em regiões mais rostrais (4,20 a 3,24 mm anterior ao bregma), enquanto, nos outros quatro ratos, a ponta do termorresistor estava posicionada em estruturas mais caudais (3,00 a 2,52 mm a anterior ao bregma). Novamente não foi observada uma grande variação nas coordenadas médio-laterais nas quais as pontas dos termorresistores estavam posicionadas (3,0 a 4,0 mm à direita do bregma).

TABELA 5.

Valores médios das coordenadas médio-laterais, dorso-ventrais e ântero-posteriores referentes à localização da ponta do termorresistor dos grupos Controle e RTX.

Grupo	Coordenada		
	Ântero-posterior	Médio-lateral	Dorso-ventral
Controle	3,34 ± 0,27 mm	3,16 ± 0,13 mm	4,02 ± 0,33 mm
RTX	3,63 ± 0,18 mm	3,43 ± 0,09 mm	4,2 ± 0,27 mm
P _{grupo}	<i>p</i> = 0,384	<i>p</i> = 0,109	<i>p</i> = 0,695

Os dados estão expressos como média ± EPM. (n= 7 para cada grupo).

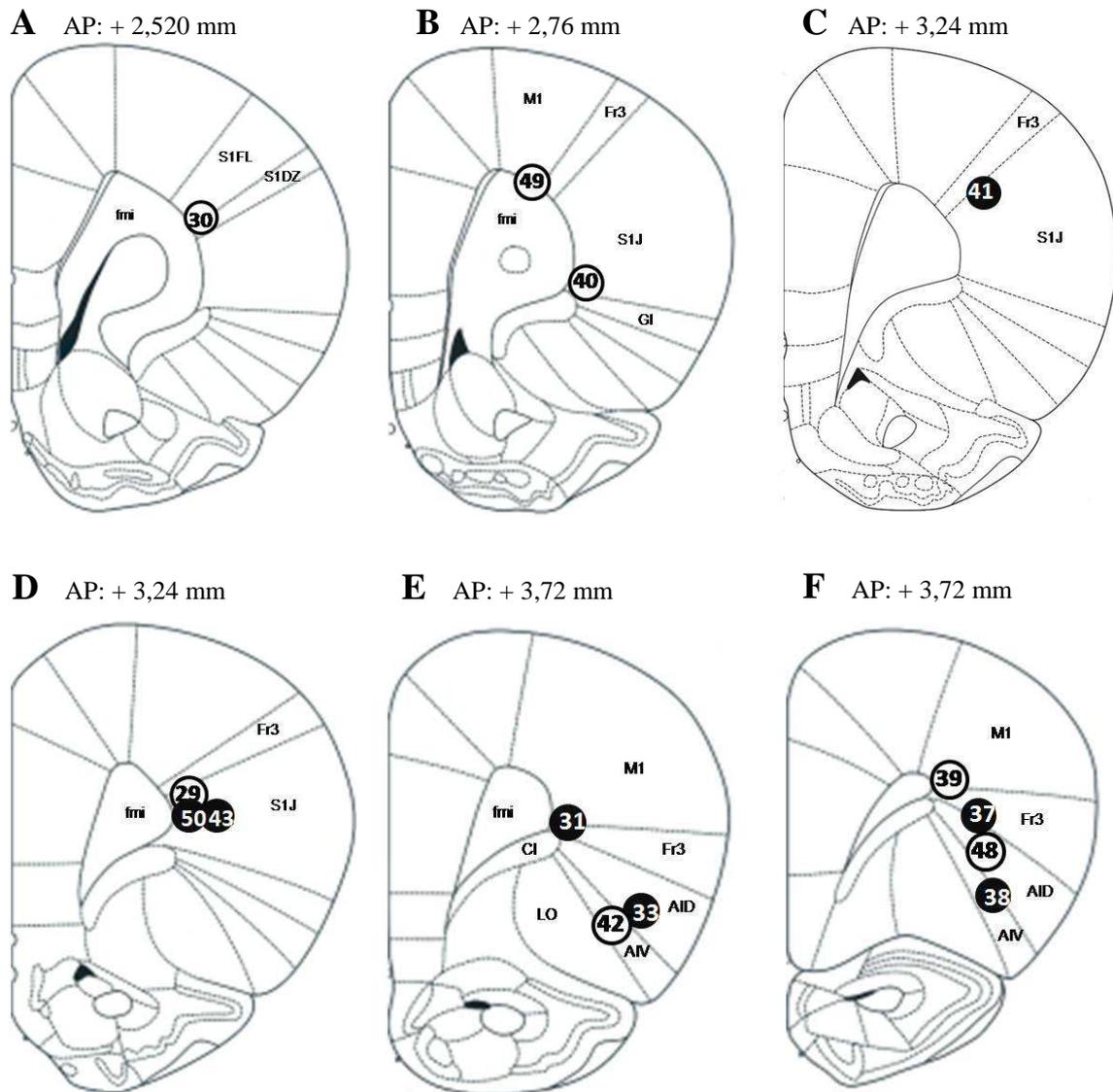


FIGURA 9. Desenhos esquemáticos de secções cerebrais coronais, nos quais a localização da ponta do termorresistor está representada para cada um dos 14 animais utilizados neste protocolo experimental (Painéis A-F). Legenda: ○ controle; ● RTX. AID, córtex agranular insular dorsal; AIV, córtex agranular insular ventral; Cl, *claustrum*; fmi, corpo caloso; Fr3, área frontal 3; GI, córtex granular insular; LO, córtex lateral orbital; M1, córtex motor primário; S1J, córtex somatossensorial primário, região maxilar; S1FL, córtex somatossensorial primário, membros posteriores; SIDZ, córtex somatossensorial primário disgranular.

3.3.2.2 Temperatura ambiente e massa corporal

No segundo protocolo do delineamento experimental 3, os animais foram submetidos à três exercícios constantes: o primeiro foi realizado em ambiente termoneutro a 21 m/min antes de terem sido feitas as injeções (pré-injeção em ambiente termoneutro), e os outros dois foram realizados após as injeções de RTX ou veículo (pós-injeção): um em ambiente termoneutro a 21 m/min e o outro em ambiente quente a 17 m/min. Como mostrado na TABELA 6, para os três exercícios constantes, a temperatura ambiente no início do exercício e no momento da IVE não foi diferente entre os grupos Controle e RTX.

Como observado no protocolo 1, a massa corporal dos animais tratados com RTX também foi menor quando comparada à massa corporal dos animais controles nos dias em que foram realizados os exercícios pós-injeção (TABELA 6). Entretanto, a massa corporal dos animais, no dia do exercício pré-injeção, não foi diferente entre os ratos que, na sequência, foram tratados com RTX e ou veículo.

TABELA 6.

Valores médios da temperatura ambiente no início e no momento da IVE durante os três exercícios com velocidade constante (pré-injeção em ambiente termoneutro, pós-injeção em ambiente termoneutro ou quente) realizados pelos animais dos grupos RTX e Controle. A tabela ainda mostra os valores médios da massa corporal dos animais de cada grupo no dia da realização dos experimentos

	Temperatura ambiente		Massa Corporal
	Inicial	IVE	
<i>Pré- injeção em ambiente termoneutro</i>			
Controle	23,65 ± 0,24°C	25,22 ± 0,24°C	305 ± 7 g
RTX	23,56 ± 0,27°C	24,92 ± 0,22°C	287 ± 8 g
P _{grupo}	<i>p</i> = 0,719	<i>p</i> = 0,719	<i>p</i> = 0,100
<i>Pós-injeção em ambiente termoneutro</i>			
Controle	24,06 ± 0,20°C	25,17 ± 0,17°C	347 ± 6 g
RTX	24,48 ± 0,18°C	25,29 ± 0,10°C	298 ± 9 g
P _{grupo}	<i>p</i> = 0,311	<i>p</i> = 0,311	<i>p</i> < 0,01
<i>Pós-injeção em ambiente quente</i>			
Controle	30,94 ± 0,24°C	31,60 ± 0,24°C	349 ± 8 g
RTX	30,70 ± 0,34°C	31,46 ± 0,14°C	312 ± 9 g
P _{grupo}	<i>p</i> = 0,763	<i>p</i> = 0,763	<i>p</i> < 0,01

Os dados estão expressos como média ± EPM. (n= 7 para cada grupo).

3.3.2.3 Desempenho

O tratamento com RTX não alterou o desempenho físico durante os exercícios constantes (GRÁFICO 14). O tempo total de exercício não foi diferente entre os grupos RTX e Controle em nenhum dos três exercícios constantes: exercício pré-injeção em ambiente termoneutro (RTX: 137 ± 11 min *versus* Controle: 120 ± 18 min; *p* = 0,502); exercício pós-injeção em ambiente termoneutro (RTX: 161 ± 27 min *versus* Controle: 137 ± 22 min; *p* = 0,513); exercício pós-injeção em ambiente quente (RTX: 119 ± 23 min *versus* Controle: 106 ± 18 min; *p* = 0,665).

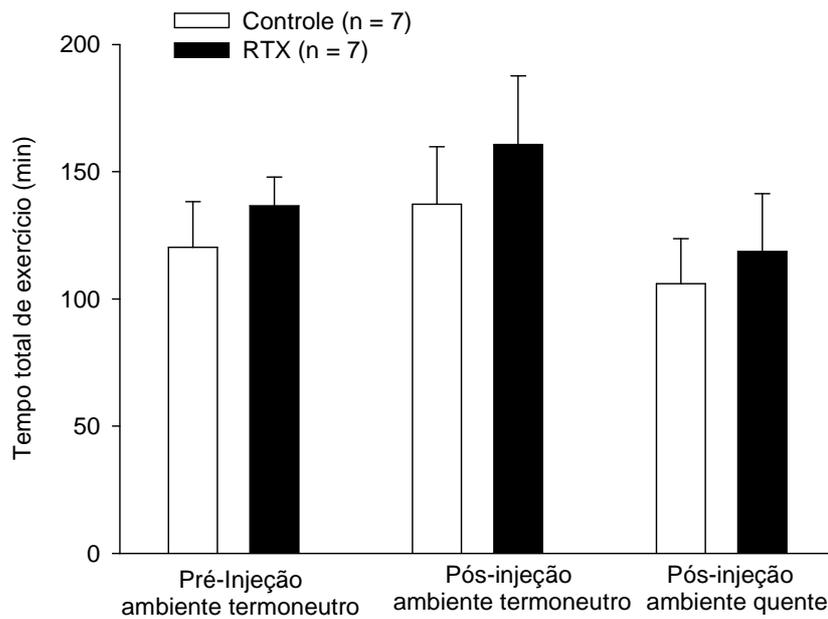


GRÁFICO 14. Tempo total de exercício dos animais dos grupos Controle e RTX durante os exercícios com velocidade constante realizados antes da injeção da droga ou do veículo (pré-injeção em ambiente termoneutro) e após terem sido feitos os tratamentos (pós-injeção em ambiente termoneutro e em ambiente quente). Os dados estão expressos como média \pm EPM.

Considerando que houve diferenças na massa corporal entre os animais controles e os tratados com RTX no dia dos experimentos, foi calculado o trabalho realizado pelos ratos durante os exercícios constantes (GRÁFICO 15). Semelhante ao que foi observado para o tempo total de exercício, o trabalho realizado pelos animais tratados com RTX não foi diferente daquele realizado pelos ratos controles: exercício pré-injeção em ambiente termoneutro (RTX: $75,1 \pm 7,3$ kgm *versus* Controle: $75,4 \pm 10,3$ kgm; $p = 0,642$); exercício pós-injeção em ambiente termoneutro (RTX: $86,2 \pm 13,0$ kgm *versus* Controle: $86,3 \pm 13,5$ kgm; $p = 0,846$); exercício pós-injeção em ambiente quente (RTX: $53,9 \pm 9,3$ kgm *versus* Controle: $53,9 \pm 8,3$ kgm; $p = 1,000$).

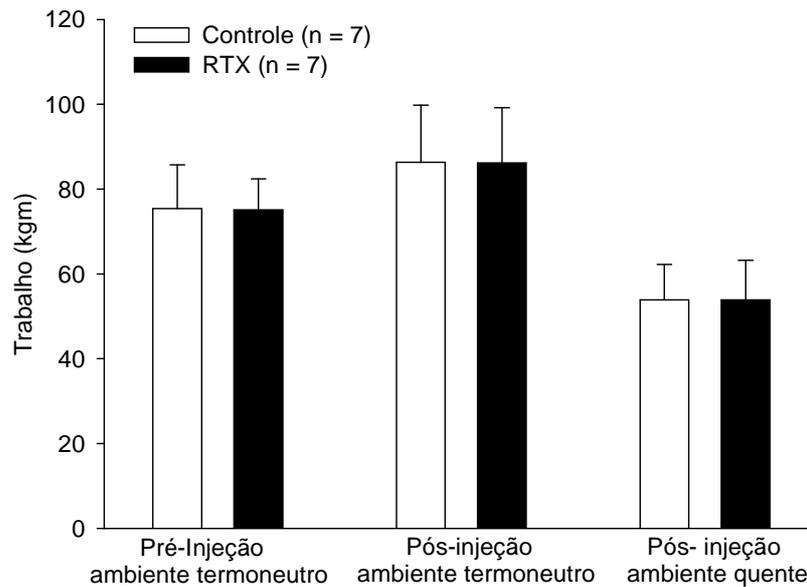


GRÁFICO 15. Trabalho realizado pelos animais dos grupos Controle e RTX durante os exercícios com velocidade constante realizados antes da injeção da droga ou do veículo (pré-injeção em ambiente termoneutro) e após terem sido feitos os tratamentos (pós injeção em ambiente termoneutro e em ambiente quente). Os dados estão expressos como média \pm EPM.

3.3.2.4 Termorregulação

A realização do exercício constante em ambiente termoneutro também levou a um aumento na temperatura cerebral nos animais dos dois grupos (GRÁFICO 16), sendo esse aumento observado a partir do sétimo minuto de exercício (minuto 7: Controle: $37,77 \pm 0,08^{\circ}\text{C}$; RTX: $37,69 \pm 0,08^{\circ}\text{C}$ *versus* minuto 0: Controle: $37,04 \pm 0,07^{\circ}\text{C}$; RTX: $36,83 \pm 0,07^{\circ}\text{C}$; $p < 0,05$) e se estendendo até o momento da IVE. Foi observado também um maior aumento da temperatura cerebral nos animais tratados com RTX em comparação com os animais controles (GRÁFICO 16). Entretanto, diferentemente do que foi observado durante o exercício progressivo, as diferenças na temperatura cerebral entre os grupos foram observadas somente no início do exercício constante: do 13° ao 28° minuto (minuto 25: RTX: $39,08 \pm 0,17^{\circ}\text{C}$ *versus* Controle: $38,27 \pm 0,15^{\circ}\text{C}$; $p < 0,05$). Não houve diferença entre os grupos na temperatura cerebral no momento da IVE (RTX: $39,84 \pm 0,16^{\circ}\text{C}$ *versus* Controle: $39,86 \pm 0,11^{\circ}\text{C}$; $p = 0,995$).

A temperatura da pele da cauda também aumentou durante o exercício constante realizado em ambiente termoneutro nos animais de ambos os grupos, acompanhando o aumento na temperatura cerebral. Semelhante ao que foi observado anteriormente para o exercício progressivo, durante o exercício constante, também foi verificado um atraso no início do aumento da temperatura da cauda nos animais que foram tratados com RTX (GRÁFICO 16). Enquanto, nos animais controles, a temperatura cauda aumentou a partir do 12º minuto de exercício (minuto 12: $30,11 \pm 0,28^{\circ}\text{C}$ *versus* minuto 0: $28,36 \pm 0,29^{\circ}\text{C}$; $p < 0,05$), nos animais do grupo RTX, o aumento da temperatura da cauda foi observado somente 16 minutos após o início da corrida (minuto 16: $29,54 \pm 0,94^{\circ}\text{C}$ *versus* minuto 0: $27,58 \pm 0,24^{\circ}\text{C}$; $p < 0,05$). A temperatura da cauda foi menor nos ratos tratados com RTX em comparação com os animais controle entre o nono e o 16º minuto de exercício (minuto 12: RTX: $26,13 \pm 0,26^{\circ}\text{C}$ *versus* Controle: $30,11 \pm 0,28^{\circ}\text{C}$; $p < 0,05$). No entanto, durante o exercício constante, os animais do grupo RTX apresentaram maior aumento da temperatura da cauda em relação aos animais controles em dois momentos diferentes da corrida na esteira: entre os minutos 21 e 24 (minuto 23: RTX: $32,34 \pm 0,79^{\circ}\text{C}$ *versus* Controle: $31,89 \pm 0,36^{\circ}\text{C}$; $p < 0,05$), e entre os minutos 38 e 41 (minuto 41: RTX: $32,90 \pm 0,22^{\circ}\text{C}$ *versus* Controle: $32,00 \pm 0,45^{\circ}\text{C}$; $p < 0,05$).

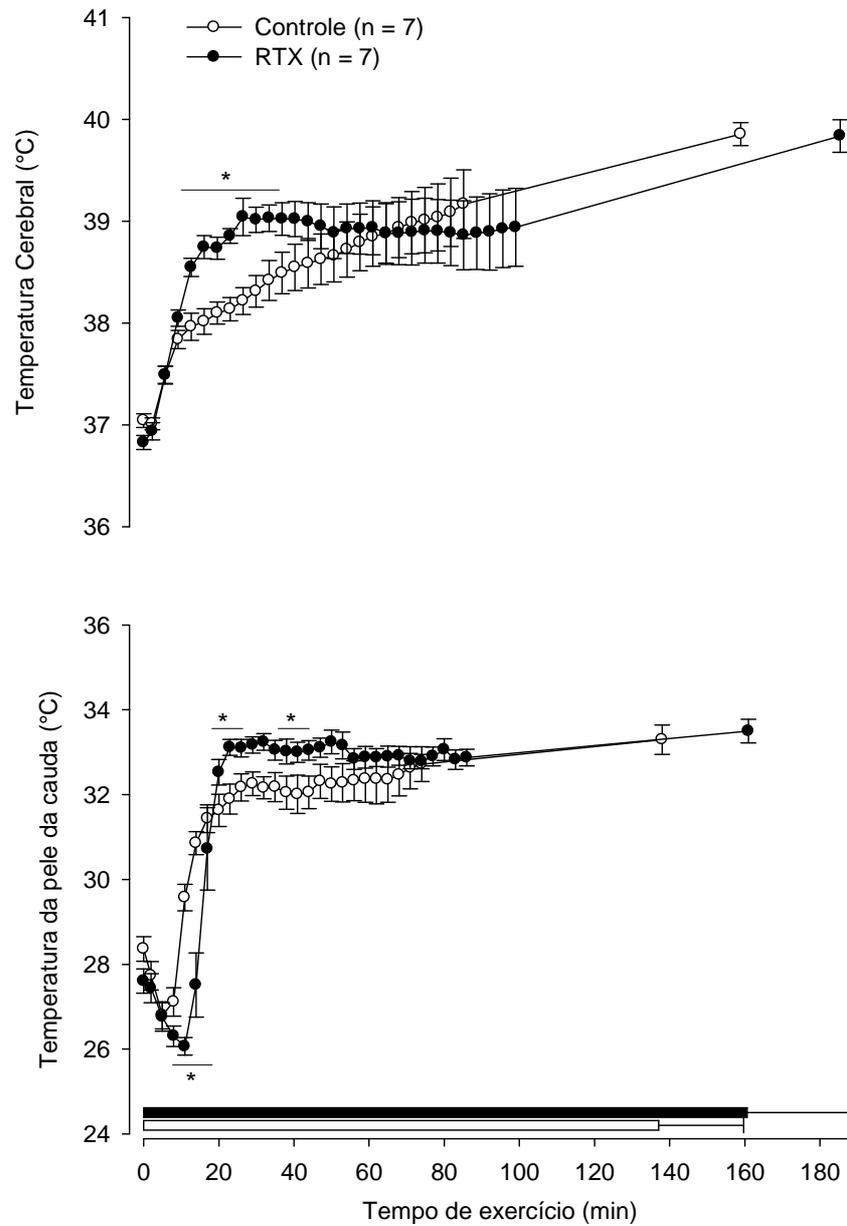


GRÁFICO 16. Temperatura cerebral (Painel superior) e temperatura da pele da cauda (painel inferior) de ratos dos grupos Controle e RTX durante o exercício com velocidade constante realizado em ambiente termoneuro. Os dados estão expressos como média \pm EPM. As barras horizontais apresentadas na parte inferior da figura representam o tempo total de exercício. * $p < 0,05$ em comparação com os animais controles.

Ao realizar o cálculo do IDC, foi observado também que, nos animais tratados com RTX, houve um atraso no início do aumento do IDC (GRÁFICO 17). Nos ratos controles, o IDC aumentou 14 minutos após o início do exercício (minuto 14: $0,47 \pm 0,02$ versus minuto 0: $0,31 \pm 0,03$; $p < 0,05$). Já nos ratos do grupo RTX, o aumento no IDC foi observado somente 17 após o início da corrida (minuto 17: $0,42 \pm 0,06$ versus minuto 0: $0,27 \pm 0,02$; $p < 0,05$). O IDC foi menor no grupo RTX em comparação ao Controle entre os minutos 11 e 17 de exercício (minuto 17: RTX: $0,42 \pm 0,06$ versus Controle: $0,51 \pm 0,02$; $p < 0,05$). Entretanto, ao contrário do que foi observado para a temperatura da cauda, não houve diferenças no IDC entre os grupos a partir do 18º minuto de corrida até o momento da IVE.

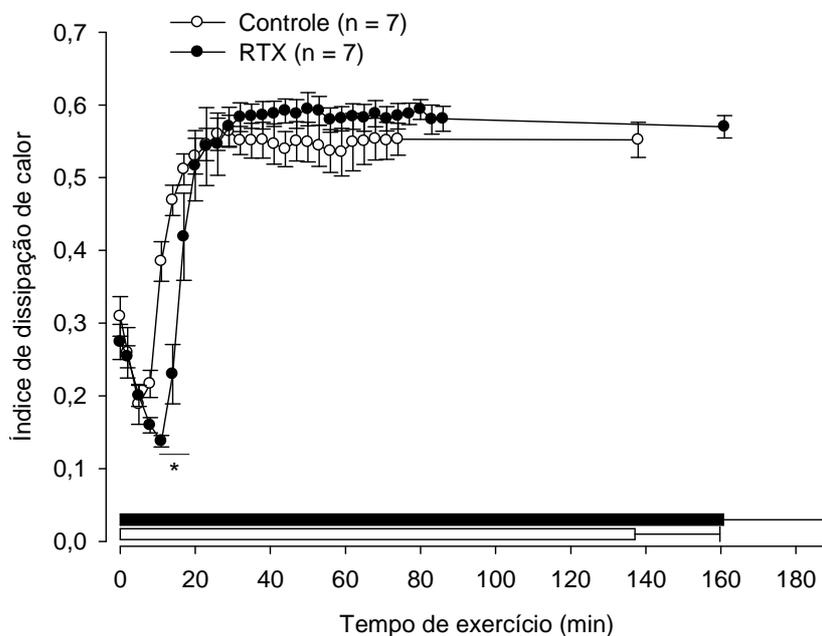


GRÁFICO 17. IDC de ratos durante o exercício com velocidade constante realizado em ambiente termoneuro pelos animais dos grupos Controle e RTX. Os dados estão expressos como média \pm EPM. As barras horizontais apresentadas na parte inferior da figura representam o tempo total de exercício. * $p < 0,05$ em comparação com os animais controles.

O exercício constante em ambiente quente também induziu aumentos da temperatura cerebral nos animais de ambos os grupos (GRÁFICO 18). Tanto nos ratos do grupo RTX quanto nos do grupo Controle, a temperatura cerebral aumentou após cinco minutos do início do exercício (minuto 5: Controle: $37,82 \pm 0,08^\circ\text{C}$; RTX: $37,74 \pm 0,08^\circ\text{C}$ versus minuto 0: Controle: $37,03 \pm 0,08^\circ\text{C}$; RTX: $36,86 \pm 0,10^\circ\text{C}$; $p < 0,05$) e permaneceu aumentada até o momento da IVE. Durante o exercício constante em ambiente quente, os animais do grupo

RTX também tiveram um maior aumento da temperatura cerebral em comparação com os animais controles, sendo que as diferenças entre os grupos foram observadas somente no início do exercício: do 10° ao 36° minuto (minuto 16: RTX: $39,47 \pm 0,16^{\circ}\text{C}$ versus Controle: $38,66 \pm 0,14^{\circ}\text{C}$; $p < 0,05$). A temperatura cerebral no momento da IVE também não foi diferente entre os grupos (RTX: $40,94 \pm 0,10^{\circ}\text{C}$ versus Controle: $40,43 \pm 0,21^{\circ}\text{C}$; $p = 0,077$).

Os efeitos do tratamento com RTX sobre o atraso no início do aumento da temperatura da pele da cauda também foram observados durante o exercício constante realizado em ambiente quente (GRÁFICO 18). Nos ratos controles, aumento na temperatura da cauda foi observado sete minutos após o exercício ter sido iniciado (minuto 7: $30,52 \pm 0,41^{\circ}\text{C}$ versus minuto 0: $28,05 \pm 0,44^{\circ}\text{C}$; $p < 0,05$). Entretanto, nos ratos tratados com RTX, a temperatura da cauda aumentou apenas 13 minutos após o início da corrida (minuto 13: $30,24 \pm 0,66^{\circ}\text{C}$ versus minuto 0: $27,73 \pm 0,53^{\circ}\text{C}$; $p < 0,05$). Menores valores de temperatura da cauda foram observados para os ratos do grupo RTX em relação aos animais controles entre o sétimo e o 17° minutos de exercício (minuto 12: RTX: $29,16 \pm 0,39^{\circ}\text{C}$ versus Controle: $33,47 \pm 0,36^{\circ}\text{C}$; $p < 0,05$).

Ao contrário do que foi observado para os exercícios progressivos, o tratamento com RTX não afetou a taxa de aumento da temperatura cerebral durante os exercícios constantes: exercício pós-injeção em ambiente termoneutro (RTX: $0,023 \pm 0,005^{\circ}\text{C}/\text{min}$ versus Controle: $0,024 \pm 0,004^{\circ}\text{C}/\text{min}$; $p = 0,805$), exercício pós-injeção em ambiente quente (RTX: $0,040 \pm 0,005^{\circ}\text{C}/\text{min}$ versus Controle: $0,038 \pm 0,007^{\circ}\text{C}/\text{min}$; $p = 0,849$).

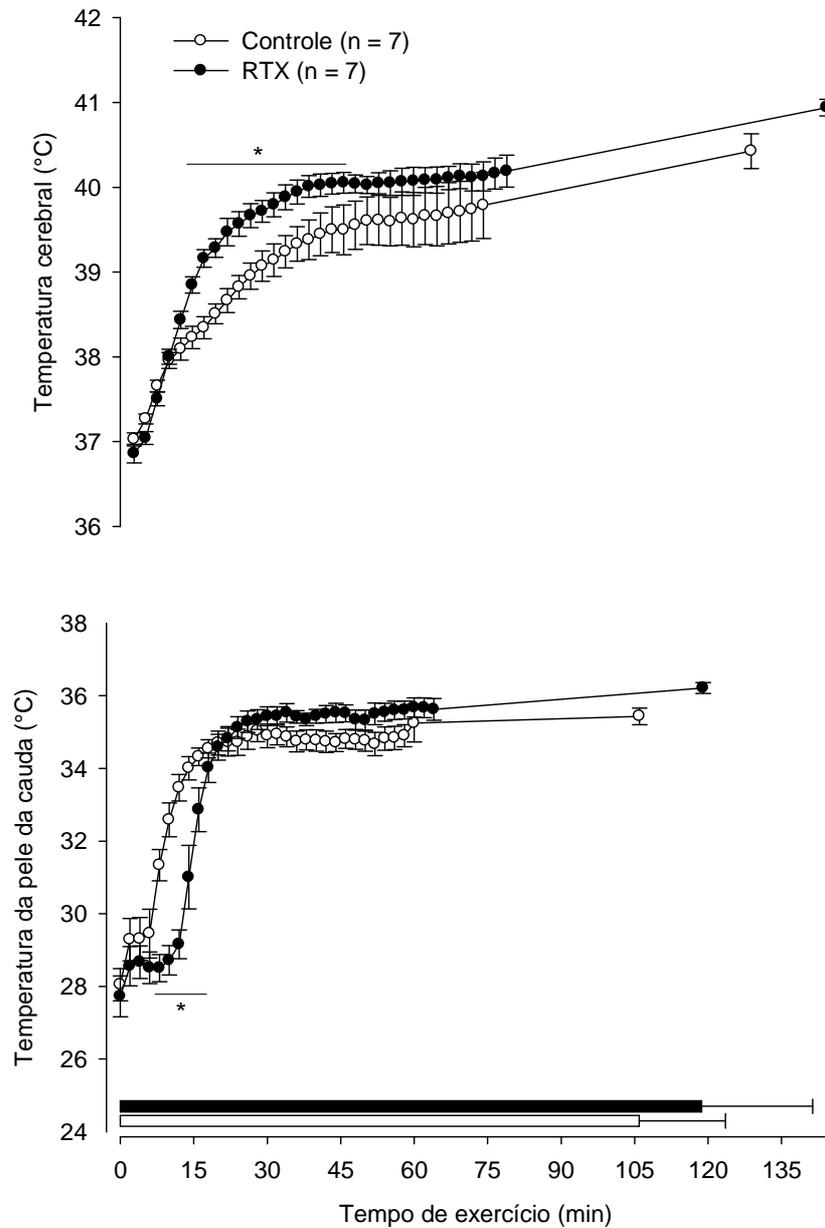


GRÁFICO 18. Temperatura cerebral (painel superior) e temperatura da pele da cauda (painel inferior) de ratos dos grupos Controle e RTX durante o exercício com velocidade constante realizado em ambiente quente. Os dados estão expressos como média \pm EPM. As barras horizontais apresentadas na parte inferior da figura representam o tempo total de exercício. * $p < 0,05$ em comparação com os animais controles.

O GRÁFICO 19 apresenta a temperatura da pele da cauda em função da temperatura cerebral. Durante os dois exercícios constantes, os animais tratados com RTX apresentaram um maior aumento da temperatura cerebral até que fosse observado o início do aumento da temperatura da cauda. Nos ratos controles, o início do aumento da temperatura da cauda foi observado quando a temperatura cerebral estava entre 37,7 e 37,9°C, porém nos animais do

grupo RTX, o aumento da temperatura da cauda teve início somente quando a temperatura cerebral estava entre 38,6 e 38,9°C.

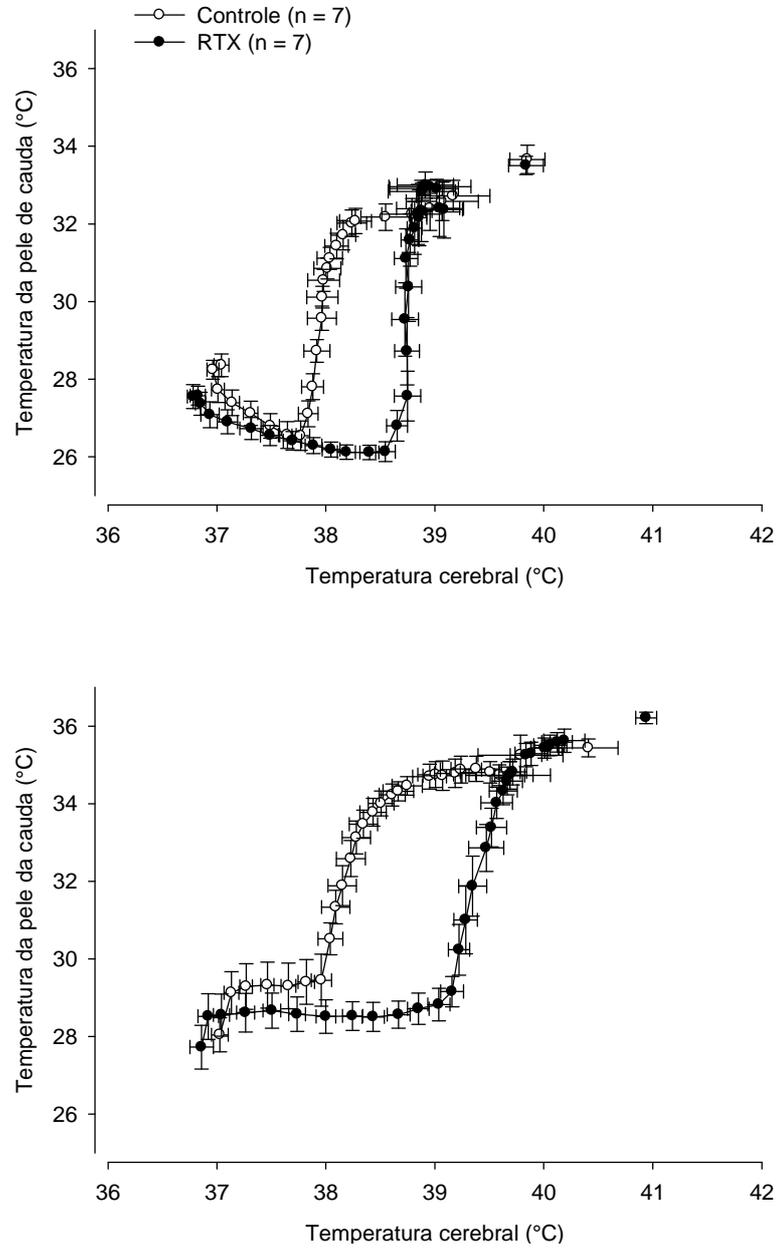


GRÁFICO 19. Curvas representando a temperatura da pele da cauda em função da temperatura cerebral medidas durante os exercícios com velocidade constante realizados em ambiente termoneutro (painel superior) e quente (painel inferior). Os dados estão expressos como média \pm EPM.

3.3.3 Testes de dessensibilização

O teste de saciedade induzido por CCK foi realizado para confirmar se houve a dessensibilização dos canais TRPV1 localizados na cavidade abdominal. O tratamento com 20 µg/kg de RTX atenuou a sensação de saciedade induzida por CCK nos animais dos dois protocolos. Enquanto no grupo controle, a injeção de CCK reduziu a ingestão alimentar em 32,3% e em 43,5% nos animais dos protocolos 1 e 2, respectivamente, no grupo RTX, a CCK reduziu a ingestão alimentar em apenas 8,2% no ratos do protocolo 1 e não alterou a ingestão alimentar nos ratos do protocolo 2 ($p = 0,01$ e $p < 0,01$ para os protocolos 1 e 2, respectivamente; GRÁFICO 21). Assim, conforme observado neste trabalho, outros estudos também já mostraram que o tratamento com altas doses de capsaicina ou de RTX atenua a sensação de saciedade induzida por CCK (RITTER; LADENEHEIM, 1985; DOGAN *et al.*, 2004). Essa redução dos efeitos da CCK na sensação de saciedade provocada pelo tratamento com RTX pode ser explicada pelo fato de essa droga, quando administrada em doses elevadas, levar a morte de fibras sensoriais que expressam os canais TRPV1 (CZAJA *et al.*, 2008; YAMASHITA *et al.*, 2008). Dentre essas fibras sensoriais, estão as aferências vagais presentes no abdômen (PELES *et al.*, 2009), as quais são as principais fibras sensoriais envolvidas nos efeitos da CCK na sensação de saciedade (SMITH *et al.*, 1985). Dessa forma, podemos concluir, a partir dos resultados obtidos no teste de saciedade, que os canais TRPV1 presentes na cavidade abdominal foram dessensibilizados nos ratos utilizados no presente estudo.

O teste de limpeza dos olhos foi utilizado para demonstrar se a extensão da dessensibilização dos canais TRPV1 atingiu os canais presentes na retina. Foi observado que, nos animais dos dois protocolos, o tratamento com 20 µg/kg de RTX não alterou o número de movimentos realizados com as patas para limpar os olhos após a aplicação de 20 µl de NH₄OH 1% nos olhos (GRÁFICO 22). Esse dado indica que a dessensibilização dos canais TRPV1 não atingiu níveis sistêmicos (compartimentos corporais extra-abdominais), uma vez que estudos anteriores demonstraram que a administração i.p. de doses de RTX 5 a 10 vezes maiores que aquela utilizada no presente estudo (100 e 200 µg/kg) leva a uma redução significativa no número de movimentos realizados para limpar os olhos após a aplicação de NH₄OH (SZALLASI; BLUMBER, 1989; STEINER *et al.*, 2007).

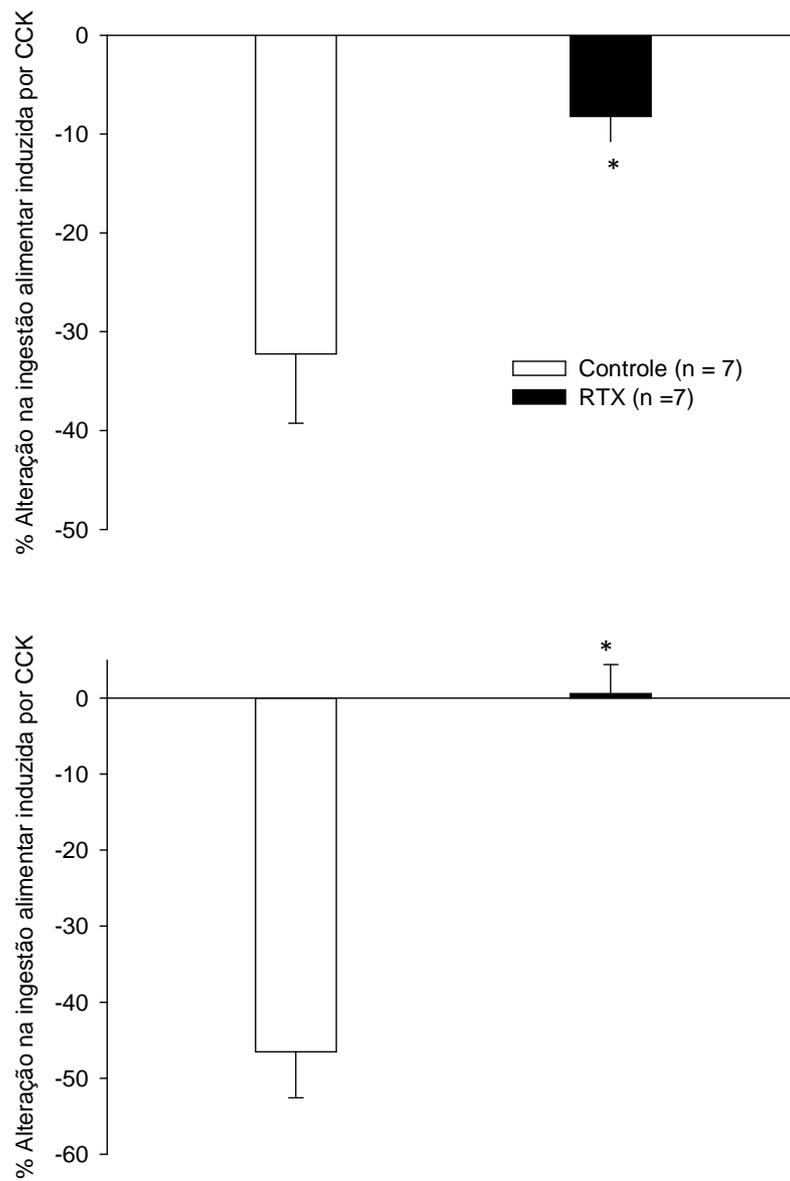


GRÁFICO 20. Percentual de alteração na ingestão alimentar induzida por CCK nos ratos dos grupos controle e RTX utilizados no protocolo 1 (painel superior) e no protocolo 2 (painel inferior). Os dados estão expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ em comparação com os animais controles.

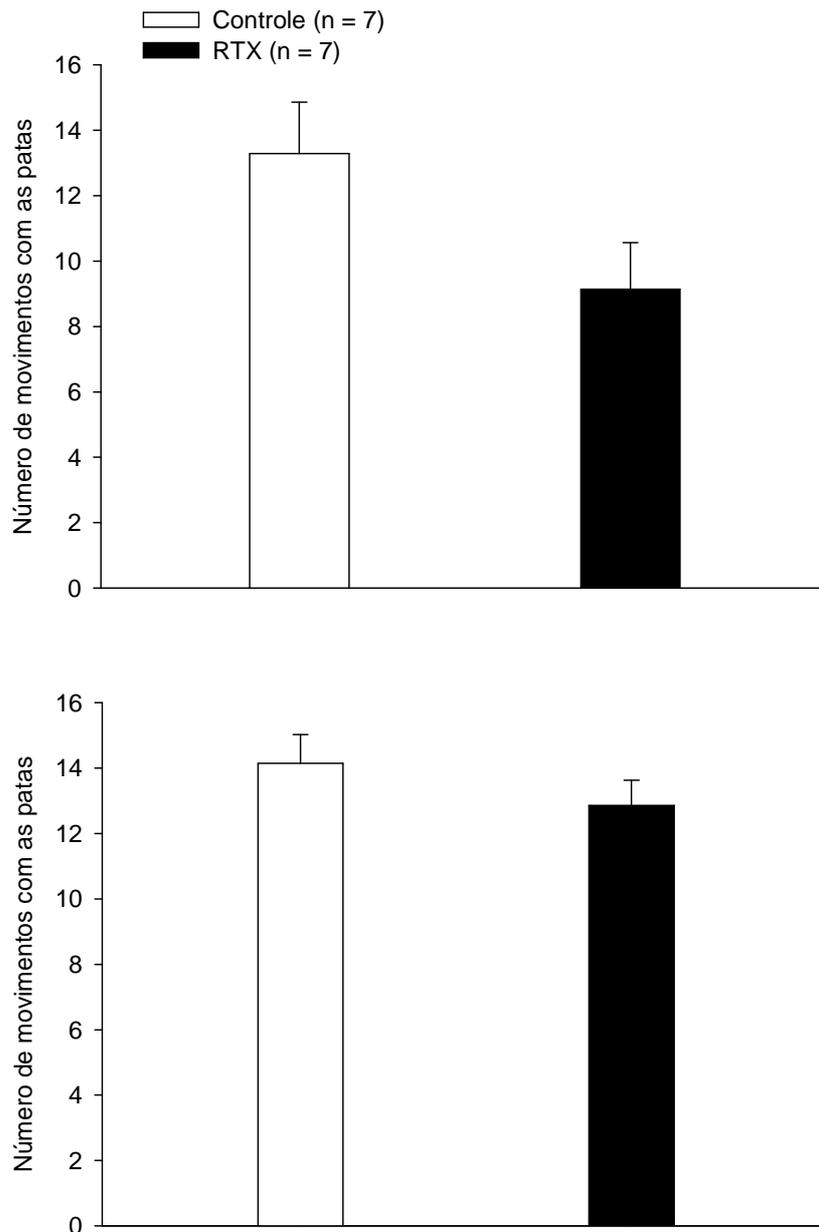


GRÁFICO 21. Número de movimentos com as patas para limpar os olhos, após a aplicação de 20 μ l de NH₄OH 1% nos olhos, realizados pelos animais dos grupos controle e RTX que foram utilizados no protocolo 1 (painel superior) e no protocolo 2 (painel inferior). Os dados estão expressos como média \pm EPM.

Os dados obtidos com os dois testes realizados no presente estudo indicam que a dessensibilização dos canais TRPV1 foi localizada na cavidade abdominal, sem atingir os canais presentes em locais fora do abdômen, como na retina.

4 DISCUSSÃO

O principal achado do delineamento experimental 1 foi que a intensidade do exercício afetou a velocidade do aumento da temperatura cerebral observada durante a corrida em esteira rolante, porém não alterou a temperatura cerebral medida no momento da interrupção do esforço. Outro achado importante foi que a temperatura cerebral atingiu valores acima de 40°C, mesmo sendo o exercício realizado em ambiente termoneutro. Como esperado, o desempenho físico foi afetado pela intensidade do exercício: quanto maior a velocidade de corrida, menor foi o tempo total de exercício.

Até o momento, nenhum estudo havia investigado o efeito da intensidade do exercício sobre o aumento da temperatura cerebral induzido pela corrida na esteira, em uma mesma temperatura ambiente. Nossos resultados mostraram que a intensidade do exercício foi diretamente associada com a taxa de aumento da temperatura cerebral: a maior velocidade de corrida (24 m/min) induziu maior taxa de aumento em relação às duas menores velocidades. Além disso, a temperatura cerebral foi maior durante a corrida realizada a 21 m/min do que a 18 m/min, apesar de a taxa de aumento da temperatura cerebral não ter sido diferente entre as duas menores intensidades de exercício. Embora a velocidade de corrida tenha afetado a velocidade do aumento da temperatura cerebral, os animais interromperam os três exercícios constantes com valores de temperatura cerebral similares. Resultados semelhantes foram observados quando a temperatura abdominal de ratos foi medida durante a corrida na esteira realizada nas velocidades de 21 e 24 m/min em ambiente termoneutro (RODRIGUES *et al.*, 2003). Além disso, os valores de temperatura cerebral medidos no momento em que os animais interromperam os exercícios constantes ($\approx 40^\circ\text{C}$) foram semelhantes aos valores de temperatura abdominal observados no momento da interrupção dos exercícios constantes em ambiente termoneutro no estudo de Rodrigues *et al.* (2003). Conjuntamente, esses dados sugerem que a intensidade do exercício afeta as temperaturas medidas no abdômen e no cérebro de forma similar.

No presente estudo, a temperatura cerebral estava próxima de 40°C (variando entre 38,73 e 41,66°C) no momento em que os animais interromperam o esforço nas três intensidades de exercício estudadas (GRÁFICO 3). Valores semelhantes de temperatura cerebral (40 - 42°C) foram observados no momento da interrupção do exercício realizado em ambiente quente em outros estudos realizados com animais (FULLER *et al.*, 1998; WALTERS *et al.*, 2000; HASEGAWA *et al.*, 2008), sendo que os valores elevados de

temperatura cerebral foram inversamente correlacionados com o tempo total de exercício (WALTERS *et al.*, 1998). Esses achados sugerem que o alcance de um valor elevado de temperatura cerebral contribui para a interrupção do esforço. De fato, tem sido sugerida a existência de uma temperatura interna crítica, entre 40 - 41°C, que limitaria o desempenho durante o exercício físico prolongado (FULLER *et al.*, 1998; GONÇALEZ ALONSO *et al.*, 1998; WALTERS *et al.*, 2000).

Existem evidências de que o aumento da temperatura cerebral limita o desempenho físico em ambiente quente por meio de alterações na função cerebral, evidenciadas pela redução na atividade eletroencefalográfica da área frontal do córtex cerebral (NYBO; NIELSEN, 2001b; FTAITI *et al.*, 2010) e pela inibição de áreas corticais envolvidas no controle da atividade motora (NYBO; NIELSEN, 2001a). Considerando que, no presente estudo, os ratos também atingiram valores de temperatura cerebral acima de 40°C, pode-se sugerir que as alterações na função cerebral promovidas pela hipertermia tiveram um papel importante na determinação da interrupção voluntária do esforço nos ratos do delineamento 1. De fato, o exercício prolongado realizado em ambiente termoneutro também leva à redução no recrutamento de unidades motoras (RACINAIS *et al.*, 2008) e inibe a atividade neural no córtex motor (ROSS *et al.*, 2007), corroborando a hipótese de que alterações no sistema nervoso central também estão envolvidas na modulação do desempenho físico, mesmo quando o exercício é realizado na ausência de estresse térmico ambiental (RACINAIS *et al.*, 2008). Contudo, a alteração na atividade neuronal do córtex motor mostrada por Ross *et al.* (2007) foi associada com o aumento das informações aferentes provenientes dos músculos em contração, que sinalizam, ao sistema nervoso central, o estado bioquímico e metabólico dos mesmos. No estudo de Ross *et al.* (2007), o aumento da temperatura do cérebro ou de outros locais do corpo não foi associado às alterações na atividade neural do córtex frontal.

O modelo teórico que postula a existência de um valor de temperatura interna crítica entre 40 - 41°C que limitaria o desempenho durante exercícios físicos prolongados não é universalmente aceito; alguns autores propõem que a dinâmica do aumento na temperatura interna seria mais importante na modulação do desempenho físico (RODRIGUES *et al.*, 2003; SOARES *et al.*, 2004; TUCKER *et al.*, 2006). Essa hipótese também é corroborada pelos dados do delineamento experimental 1, visto que foram observadas correlações negativas entre o tempo total de exercício e a taxa de aumento da temperatura cerebral para cada uma das três intensidades de exercício estudadas (GRÁFICO 5B). Portanto, a partir dos dados do presente estudo, não foi possível solucionar essa dicotomia: tanto uma maior taxa de aumento da temperatura cerebral quanto o alcance de um valor elevado de temperatura cerebral podem

ter contribuído para que os ratos interrompessem o esforço durante os exercícios constantes realizados no delineamento 1. Dessa forma, outros estudos devem ser elaborados com o objetivo de isolar os efeitos do valor absoluto e da dinâmica do aumento na temperatura cerebral para esclarecer o mecanismo pelo qual a hipertermia regula o desempenho físico.

Os animais interromperam o esforço com menor temperatura cerebral durante o exercício progressivo em relação aos três exercícios constantes, sugerindo que fatores não térmicos, são mais determinantes para o desempenho físico durante o exercício progressivo. É importante ressaltar que a fadiga durante o exercício é um mecanismo complexo, regulado pelo sistema nervoso central e que envolve a integração de informações aferentes provenientes de diversos sistemas fisiológicos (cardiovascular, metabólico, térmico, ventilatório, entre outros) (RODRIGUES; SILAMI-GARCIA, 1998; LAMBERT *et al.*, 2005). Dependendo das características do exercício (duração, intensidade e protocolo), determinadas respostas fisiológicas são mais importantes do que outras na determinação do desempenho. Durante o exercício progressivo, os animais se exercitaram em intensidades próximas da velocidade máxima de corrida, a qual foi atingida no momento da interrupção do esforço. Dessa forma, é possível que, durante esse protocolo de exercício, a continuidade do esforço seja mais dependente da capacidade do sistema cardiovascular de manter uma perfusão adequada para os diversos órgãos e tecidos, especialmente o coração e a musculatura esquelética, do que das repostas termorregulatórias (NOAKES, 2000). Portanto, essas diferenças na resposta fisiológica aos exercícios constante e progressivo devem ser levadas em conta no momento da escolha do protocolo experimental que é mais apropriado para avaliar os efeitos da temperatura cerebral sobre o desempenho físico. Os resultados do presente estudo sugerem que o exercício progressivo realizado em ambiente termoneutro não é o protocolo mais adequado para investigar os mecanismos pelos quais o aumento da temperatura cerebral pode interferir no desempenho.

As lesões causadas pelo implante crônico da cânula guia ou pela inserção aguda do termorresistor no cérebro se concentraram na área cortical frontal, a qual inclui o córtex motor primário, o córtex lateral orbital, a área frontal 3, e o núcleo caudado putâmen. Como essas áreas do córtex estão envolvidas no planejamento, organização e início do movimento, nós decidimos investigar se os métodos utilizados para a medida da temperatura cerebral modificariam o desempenho físico dos animais. Além disso, existem evidências de que lesões no córtex frontal provocam deficiência no controle do movimento (UYLINGS *et al.*, 2003) e aumento na atividade voluntária na roda (NONNEMAN; CORWIN, 1981). Essas evidências são corroboradas pelos achados de Rhodes *et al.* (2003) que mostraram que a atividade do

córtex frontal está associada com a motivação para o exercício voluntário na roda. Os dados do experimento 2 indicam que as lesões provocadas pela cânula guia (diâmetro externo de 0,81 mm) ou pelo termorresistor (diâmetro de 0,53 mm) nessas regiões do cérebro não alteram o comportamento motor ou a motivação para a corrida na esteira e, conseqüentemente, a velocidade máxima atingida pelos ratos durante o exercício progressivo (GRÁFICO 6). Uma possível explicação para esses resultados controversos é que o tipo de exercício utilizado por Nonneman e Corwin (1981) e Rhodes *et al.* (2003); exercício voluntário na roda) foi diferente daquele usado no presente estudo (exercício forçado na esteira rolante).

Assim, os resultados dos delineamentos experimentais 1 e 2 mostraram que o método utilizado, no presente estudo, para medida da temperatura cerebral foi sensível aos feitos da intensidade do exercício e não interferiu no desempenho físico dos animais. Os resultados do delineamento 1 ainda sugerem que a temperatura cerebral é importante para a determinação do desempenho durante a corrida realizada com velocidade constante em ambiente termoneutro. Portanto, o nosso terceiro delineamento foi elaborado para investigar se as aferências provenientes do abdômen envolvidas no controle dos efetores termorregulatórios são importantes para a regulação da temperatura cerebral durante o exercício. Além disso, foi investigado se a ausência dessa informação aferente abdominal modificaria o desempenho físico dos ratos, tendo em vista que um estudo anterior do nosso laboratório mostrou que a ausência da informação aferente cardiovascular reduziu o tempo de corrida até a interrupção voluntária do esforço (PIRES, 2012).

Os resultados do delineamento 3 mostraram que a dessensibilização dos canais TRPV1 periféricos modificou a regulação da temperatura cerebral durante os exercícios progressivos e constantes, tanto em ambiente termoneutro quanto em ambiente quente. No entanto, a dessensibilização dos canais TRPV1 periféricos não afetou o desempenho físico em nenhuma das situações experimentais avaliadas.

No presente estudo, observou-se maior aumento da temperatura cerebral nos animais tratados com RTX em relação aos animais controles, independente do protocolo de exercício avaliado. Até o momento, nenhum trabalho havia investigado o efeito da dessensibilização dos canais TRPV1 sobre a regulação da temperatura interna (cerebral) durante o exercício. Os estudos anteriores avaliaram os efeitos desse tratamento sobre a termorregulação de ratos expostos ao ambiente quente (JANCSO-GABOR *et al.*, 1970a; JANCSO-GABOR *et al.*, 1970b; SZIKSZAY *et al.*, 1982). Jancso-Gabor *et al.* (1970) e Szikszay *et al.* (1982) observaram que os ratos dessensibilizados apresentaram maior aumento da temperatura

interna, em comparação aos animais controles, durante a exposição a 38°C e 34°C, respectivamente, e que a magnitude desse efeito foi dependente da dose de capsaicina utilizada para a dessensibilização. Estudos que utilizaram animais dessensibilizados com RTX (400 µg/kg i.p.) encontraram resultados semelhantes (SZALLASI; BLUMBER, 1989). Em conjunto, esses trabalhos indicam que animais submetidos à dessensibilização dos canais TRPV1 apresentam redução na capacidade de regular a temperatura interna durante a exposição ao ambiente quente, situação em que a temperatura interna aumenta em função do ganho de calor a partir do ambiente. Entretanto, o presente estudo é o primeiro a demonstrar que animais dessensibilizados também apresentam alteração na termorregulação durante o exercício, situação em que o aumento da temperatura ocorre devido ao aumento da produção metabólica de calor maior que a capacidade de dissipação. É interessante notar que a alteração na regulação da temperatura cerebral foi observada, nos animais tratados com RTX, mesmo durante o exercício realizado em ambiente temoneuro, quando o gradiente de temperatura entre a pele e o ambiente possibilita que os animais dissipem calor.

As diferenças na temperatura cerebral entre os animais tratados e controles foram observadas após 13 minutos de exercício, enquanto as diferenças na temperatura da pele da cauda foram verificadas a partir do nono minuto (GRÁFICOS 10 e 17). Esses dados sugerem que o atraso no aumento da dissipação de calor para o ambiente explica, pelo menos em parte, o maior aumento na temperatura cerebral exercício observado nos animais dessensibilizados. Concordando com esse achado, a menor capacidade dos animais dessensibilizados regularem a temperatura interna durante a exposição ao ambiente quente tem sido associada principalmente a alterações na ativação dos efetores termorregulatórios autonômicos (JANCSON-GABOR *et al.*, 1970a; OBÁL *et al.*, 1983; OBÁL *et al.*, 1987), incluindo menor dissipação de calor pela cauda e patas (JANCSON-GABOR *et al.*, 1970a). No entanto, o aumento da dissipação cutânea de calor não foi totalmente comprometido nos animais tratados com RTX do presente estudo, uma vez que a temperatura da cauda não foi diferente entre os animais dos dois grupos após 23 minutos de exercício. Esse resultado indica que os animais dessensibilizados são capazes de aumentar a temperatura da cauda de forma semelhante aos animais controles, porém após um maior tempo de exercício. Esse atraso temporal para o início do aumento da temperatura da cauda é explicado pelo fato de que, nos animais dessensibilizados, foi necessário maior aumento da temperatura cerebral até que a dissipação de calor para o ambiente fosse desencadeada (GRÁFICOS 13 e 19). Resultados semelhantes foram observados por OBÁL *et al.* (1981) em animais tratados com capsaicina e submetidos ao aquecimento passivo: somente quando a temperatura retal atingiu valores

próximos a 39°C é que foi observado o aumento da temperatura da cauda nos animais dessensibilizados, enquanto nos ratos controles, isso ocorreu quando a temperatura interna atingiu valores próximos a 38°C. Portanto, os dados do presente estudo sugerem que a dessensibilização dos canais TRPV1 reduziu a sensibilidade do controle neural da termorregulação, aumentando a variação da temperatura interna necessária para aumentar a dissipação de calor para o ambiente, o que comprometeu a termorregulação durante o exercício.

O tônus vasomotor cutâneo é controlado por fatores neurais, locais e humorais, sendo que a existência desse controle multifatorial pode ser outra explicação para a capacidade de os animais dessensibilizados aumentarem a temperatura da cauda para valores semelhantes aos dos animais controles, após o atraso observado no início do exercício. É possível que a dessensibilização das aferências tenha impacto maior sobre a atividade eferente simpática (vasoconstrictora) e menor impacto sobre os fatores humorais e locais que modulam o tônus vasomotor cutâneo. Essa hipótese é corroborada por estudo recente do nosso laboratório que observou atraso semelhante no aumento da temperatura da cauda de animais submetidos à simpatectomia da artéria caudal e expostos ao ambiente quente (LIMA *et al.*, 2013) ao atraso que foi observado nos ratos dessensibilizados submetidos ao exercício físico (GRÁFICOS 10, 12, 16 e 18). Portanto, uma hipótese plausível é que fatores humorais e/ou locais passaram a contribuir mais para regulação do tônus vasomotor, superando inclusive a ausência de uma regulação neural precisa, à medida que o exercício físico foi sendo prolongado, possibilitando assim que os animais dessensibilizados aumentassem a dissipação cutânea de calor.

De acordo com o modelo proposto por Romanovsky *et al.* (2009), tanto o aumento quanto a diminuição da temperatura interna e/ou da pele são percebidos por receptores sensíveis à variação de temperatura presentes, principalmente, nas terminações nervosas que inervam a pele, os órgãos internos e o sistema nervoso central. Dentre esses receptores estão os canais TRPV1 que podem ser ativados não apenas por estímulos térmicos como também por estímulos não térmicos, tais como prótons e outros ligantes endógenos. Quando esses canais são ativados, seja por estímulos térmicos ou não térmicos, são gerados impulsos nervosos no neurônio aferente, os quais são conduzidas até os neurônios da área pré-óptica envolvidos na regulação dos efeitores termorregulatórios autonômicos. Esse modelo propõe que esses receptores têm papel fundamental na determinação de qual resposta termoefetora será estimulada e, dessa forma, na regulação da temperatura interna. Os resultados do presente estudo concordam com essa hipótese, pois mostram que uma redução no número de canais TRPV1 ativos ou de neurônios que expressam o TRPV1 na cavidade abdominal pode levar à

redução na capacidade de termorregular durante o exercício. É possível que a ausência de parte dos estímulos provenientes das aferências abdominais envolvidas no controle dos efetores termorregulatórios tenha alterado a capacidade de o animal ajustar, de maneira precisa, os mecanismos de dissipação de calor diante de variações da temperatura interna, dificultando o estabelecimento do equilíbrio térmico durante o exercício.

No presente estudo, a dessensibilização dos canais TRPV1 periféricos modificou a regulação da temperatura cerebral, quando essa estava próxima de 38°C. Esse resultado sugere que os canais TRPV1 estejam envolvidos na regulação da temperatura interna, mesmo quando essa varia apenas 1°C acima dos valores basais, como observado durante o início da corrida realizada em ambiente termoneutro (GRÁFICOS 10 e 17). Embora o limiar de ativação do canal TRPV1 pelo calor observado em estudos *in vitro* seja de $\approx 43^\circ\text{C}$ (CATERINA *et al.*, 1997), os trabalhos utilizando antagonistas dos canais TRPV1 já demonstraram a participação desses receptores no controle da temperatura corporal basal (GAVVA *et al.*, 2007; STEINER *et al.*, 2007). Steiner *et al.* (2007) observaram que a injeção de um antagonista dos canais TRPV1 em ratos, mantidos em ambiente termoneutro, leva a um aumento da temperatura interna. Esses autores sugeriram que os canais TRPV1 estão tonicamente ativados *in vivo*, contribuindo para a manutenção da temperatura interna dentro da faixa estreita de variação observada em animais sob condições termoneutras. Além disso, animais submetidos à dessensibilização dos canais TRPV1, apesar de não apresentarem uma alteração na temperatura interna basal em ambiente termoneutro, parecem apresentar alterações na regulação da temperatura interna em resposta a pequenas variações na temperatura ambiente ou no nível de atividade locomotora (SZELÉNYI *et al.*, 2004; YAMASHITA *et al.*, 2008). Szelényi *et al.* (2004) mostraram que camundongos tratados com capsaicina apresentam maior temperatura interna máxima durante a fase escura do ritmo circadiano e maior amplitude de variação da temperatura interna ao longo do dia em comparação com os animais controles. Confirmando o papel dos canais TRPV1 na termorregulação em ambiente termoneutro, camundongos *knockouts* para esse canal também apresentaram maior amplitude de variação diária da temperatura interna (SZELÉNYI *et al.*, 2004). Ainda, Garami *et al.* (2011) mostraram que, embora a média da temperatura diária fosse semelhante nos animais *knockouts* e selvagens, os animais com deleção gênica apresentaram alterações no padrão dos efetores termorregulatórios, uma vez que possuíam menor taxa metabólica, compensada por uma maior vasoconstrição cutânea durante as duas fases do ciclo claro-escuro. Conjuntamente, esses resultados concordam com os dados do presente estudo, pois indicam que os canais TRPV1 parecem estar ativos e ser importantes

para a regulação da temperatura interna *in vivo*, mesmo quando esta se encontra aproximadamente 5 a 6°C abaixo do limiar de ativação dos canais TRPV1 pelo calor observado *in vitro*.

O presente estudo é o primeiro a demonstrar a importância dos canais TRPV1 e das fibras que expressam o TRPV1 presentes na cavidade abdominal sobre a termorregulação durante o exercício. Esses resultados sugerem que os canais TRPV1 estejam envolvidos na percepção de variações da temperatura intra-abdominal que ocorrem durante a corrida na esteira realizada em ambiente termoneutro e em ambiente quente, contribuindo para a regulação da dissipação de calor. Contudo, Garami *et al.* (2010) sugerem que, em situações basais, nas quais a temperatura interna é regulada em 37°C, os canais TRPV1 são tonicamente ativados por estímulos não térmicos, como prótons e/ou outros ligantes endógenos. Esses autores mostraram que o bloqueio da ativação desse canal pelo calor contribui pouco para os efeitos hipertérmicos provocados por antagonistas e que o bloqueio da ativação do TRPV1 por prótons parece ser o mecanismo responsável por induzir hipertermia. De fato, tem sido observado que antagonistas que não bloqueiam o modo de ativação dos canais TRPV1 por prótons, mas que bloqueiam a ativação desse canal pelo calor, não produzem hipertermia em animais sob condições de repouso (GAVVA *et al.*, 2007; WATABIKI *et al.*, 2012). Dessa forma, é possível que, durante o exercício, os canais TRPV1 sejam ativados por outros fatores que não o aumento da temperatura (por exemplo, prótons) e que essa ativação por fatores não térmicos contribua para o papel do canal TRPV1 na modulação da dissipação de calor e da temperatura interna. É possível também que ocorra uma atuação sinérgica dos diversos fatores que ativam esse canal. Diversos estudos demonstraram que os canais TRPV1 são sensíveis ao calor, a prótons (CATERINA *et al.*, 1997; TOMINAGA *et al.*, 2008) e a ligantes de natureza lipídica produzidos endogenamente, tais como a anandamida, os produtos da lipoxigenase e as N-acyl-dopaminas (HUANG *et al.*, 2002; Van Der STELT; Di MARZO, 2004). Esses diversos ligantes também podem agir como moduladores da atividade do canal. Por exemplo, a ligação de prótons a sítios específicos do canal TRPV1 potencializa a ativação do mesmo pelo calor: uma redução do pH de 7,6 para 7,0 leva à ativação do canal TRPV1 em uma temperatura de 37°C (TOMINAGA *et al.*, 1998; JORDT *et al.*, 2000). Além disso, os ligantes lipídicos produzidos endogenamente também podem agir aumentando a sensibilidade térmica do canal ao calor (CATERINA *et al.*, 2000; HUANG *et al.*, 2002). Entretanto, o papel tanto dos lipídeos endógenos quanto dos prótons na sensibilização dos canais TRPV1 parece ser importante em situações patológicas, como durante a inflamação sistêmica, situação em que há redução do pH e aumento da produção de anandamida e de produtos da lipoxigenase

(NUMAZAKI; TOMINAGA, 2004; De PETROCELLIS; Di MARZO, 2005). Porém, até o momento, nenhum estudo investigou o papel desses fatores na ativação do canal TRPV1 em situações fisiológicas. Estudos que utilizem antagonistas específicos para cada ligante do canal TRPV1 são necessários para identificar quais fatores são importantes para regular a atividade dos canais localizados na cavidade abdominal durante o exercício.

É importante ressaltar que o processo de dessensibilização dos canais TRPV1 pode induzir não apenas a perda de canais TRPV1 ativos por meio da desfosforilação dependente de cálcio (MOHAPATRA; NAU, 2005), como também a perda de neurônios que expressam o TRPV1 (SZALLAZI *et al.*, 1989; WINTER *et al.*, 1995; YAMASHITA *et al.*, 2008). Já foi demonstrado que o tratamento com doses elevadas de capsaicina ou RTX reduz o número de neurônios de pequeno diâmetro não mielinizados e o número de neurônios que expressam o TRPV1 no gânglio da raiz dorsal (SZALLAZI *et al.*, 1989; YAMASHITA *et al.*, 2008) e no gânglio nodoso (CZAJA *et al.*, 2008). Além disso, Szallazi *et al.* (1989) observaram, nos animais tratados com RTX, alterações morfológicas nos axônios dos neurônios de pequeno diâmetro, dentre as quais pode-se citar o aumento do volume das mitocôndrias. Dessa forma, é possível que os resultados observados no presente estudo sejam consequência da perda da função dos canais TRPV1, mas também da perda da função ou da morte dos neurônios de pequeno diâmetro que expressam o TRPV1. Como resultado da perda desses neurônios pode ocorrer uma redução no número de outros canais sensíveis ao calor, tais como o TRPM3 (VRIENS *et al.*, 2011), o que também pode ter contribuído para reduzir a capacidade de os animais dessensibilizados com RTX regularem a temperatura interna durante o exercício. De fato, Vriens *et al.* (2011) demonstraram a expressão do canal TRPM3 nos neurônios de pequeno diâmetro que expressam o TRPV1 e que o canal TRPM3 contribui para a ativação dos neurônios do gânglio da raiz dorsal e trigeminal em resposta ao aumento de temperatura. Além do TRPM3, é possível que outros canais sensíveis ao calor também estejam presentes nos neurônios de pequeno diâmetro presentes nos gânglios da raiz dorsal e trigeminal que tem sua função comprometida durante o processo de dessensibilização (CATERINA *et al.*, 2000; VRIENS *et al.*, 2011).

No presente estudo, foi observado que os ratos dessensibilizados apresentaram maior aumento da temperatura cerebral no início do exercício independente do protocolo de exercício utilizado (GRÁFICOS 10, 12, 16 e 18). Porém, ao longo da corrida com aumentos progressivos da velocidade, a temperatura cerebral permaneceu aumentada nos animais dessensibilizados em relação aos controles, enquanto, ao longo do exercício constante, os valores de temperatura cerebral dos animais de ambos os grupos tornaram-se semelhantes.

Esses dados sugerem que, apesar de os animais tratados com RTX apresentarem menor capacidade de regular a temperatura cerebral no início do exercício, ao longo da corrida com maior duração e com velocidade constante, esses ratos conseguiram estabelecer um equilíbrio térmico semelhante àquele estabelecido pelos ratos controles. Esses resultados corroboram trabalhos anteriores os quais mostraram que, embora a termorregulação durante a exposição ao ambiente quente estivesse comprometida nos animais tratados com doses menores de capsaicina (25 a 30 mg/kg s.c.), os ratos dessensibilizados apresentaram temperatura retal semelhante àquela observada nos animais controles quando o período de aquecimento passivo se estendeu por duas horas (JANCOSO-GABOR *et al.*, 1970a). Além disso, Obál *et al.* (1987; 1981) mostraram que, durante o aquecimento passivo, os animais dessensibilizados e controles apresentam a mesma temperatura da cauda quando temperatura interna foi mantida elevada, mas com valores constantes, por pelo menos 30 minutos. Dessa forma, pode ser sugerido que, durante o exercício constante, a manutenção de uma produção fixa de calor por um tempo mais prolongado permitiu que os animais do grupo RTX ajustassem a dissipação de calor para o ambiente e, assim, regulassem a temperatura cerebral em valores semelhantes aos observados nos animais do grupo Controle. De fato, 20 minutos após o início do exercício constante em ambiente termoneutro, foi observado um maior aumento da temperatura da cauda nos animais dessensibilizados como resultado, provavelmente, do maior aumento da temperatura cerebral. A não existência de diferença ao se comparar o IDC entre os grupos (GRÁFICO 17) dá suporte à hipótese que a maior temperatura interna (cerebral) contribuiu para um maior aquecimento passivo da pele da cauda nos animais dessensibilizados. Portanto, é possível que, no início do exercício constante, a ausência de informações aferentes provenientes da cavidade abdominal alterou a capacidade de os animais dessensibilizados regular a dissipação de calor para o ambiente, mas, à medida que a corrida na esteira se prolongou, esses ratos conseguiram estabelecer um equilíbrio térmico semelhante ao estabelecido pelos animais controles possivelmente por meio de outras aferências térmicas ou não térmicas ou em função do aquecimento cerebral.

Contudo, durante o exercício progressivo, os animais dessensibilizados não conseguiram regular a temperatura cerebral de forma que os valores atingidos ao final do exercício fossem similares aos observados nos animais controles. O fato de a produção de calor aumentar ao longo do exercício progressivo, acompanhando o aumento da intensidade que ocorre a cada três minutos, pode explicar a manutenção das diferenças entre os grupos: é possível que esse curto tempo tenha sido insuficiente para que os animais tratados com RTX ajustassem a dissipação de calor a fim de equilibrá-la com o aumento da produção metabólica

de calor. De fato, diferentemente do que foi observado no exercício constante, os animais tratados com RTX, embora apresentem maior temperatura cerebral, tiveram o mesmo aumento na temperatura da cauda durante o exercício progressivo. Além disso, quando intensidades elevadas como aquelas que precedem a interrupção voluntária do esforço são alcançadas, a produção elevada de calor pode superar a capacidade de os animais dissiparem o calor para o ambiente, acentuando o aumento da temperatura cerebral (GRÁFICO 7). Portanto, considerando que a duração do exercício progressivo foi aproximadamente 60 minutos, é sugerido que o período curto de tempo até que as intensidades elevadas fossem alcançadas não tenha permitido que os animais dessensibilizados ajustassem a temperatura cerebral de forma a mantê-la em valores semelhantes àqueles mantidos pelos ratos controles.

Embora o tratamento com RTX tenha afetado a regulação da temperatura interna e os mecanismos de dissipação de calor, os animais submetidos à dessensibilização dos canais TRPV1 periféricos não apresentaram alteração no desempenho físico durante a corrida tanto em ambiente quente quanto em ambiente termoneutro, independente do protocolo de exercício avaliado. Esse resultado não está de acordo com os achados do estudo de Dousset *et al.* (2004) que mostraram uma redução no desempenho de ratas adultas dessensibilizadas com capsaicina durante a corrida na esteira realizada em ambiente termoneutro. Entretanto, no estudo de Dousset *et al.* (2004), a dessensibilização foi feita quando as ratas eram recém-nascidas e foi utilizada uma dose elevada de capsaicina (50 mg/kg s.c.); essas diferenças metodológicas podem explicar os resultados contraditórios observados nos dois estudos. Embora ainda não tenha sido determinado se os efeitos do tratamento com capsaicina ou RTX sobre o desempenho físico dependem da dose utilizada para a dessensibilização, essa dependência já foi demonstrada em relação às alterações na capacidade termorregulatória de ratos tratados com capsaicina (JANCSO-GABOR *et al.*, 1970a). Esse dado sugere que os efeitos da dessensibilização dos canais TRPV1 sobre o desempenho físico também podem variar conforme a dose de RTX ou capsaicina utilizada. É possível que esses efeitos dose-dependentes ocorram em função da extensão da dessensibilização promovida por meio da injeção das diferentes doses do agonista: enquanto a injeção de doses menores, como a utilizada no presente estudo, promove uma dessensibilização dos canais TRPV1 localizados apenas em um determinado compartimento corporal, o tratamento com doses maiores como a utilizada no estudo de Dousset *et al.* (2004), promove uma dessensibilização sistêmica desses canais (DOGAN *et al.*, 2004; STEINER *et al.*, 2007). Portanto, enquanto o presente estudo mostrou que a dessensibilização dos canais TRPV1 intra-abdominais não altera o desempenho físico, o estudo de Dousset *et al.* (2004) sugere que a dessensibilização sistêmica dos canais

TRPV1 reduz a tolerância ao esforço físico. Contudo, Trudeau e Milot (1996) não encontraram alteração no desempenho durante a natação em ratos tratados com capsaicina (50 mg/kg s.c.) em relação aos animais controles, sugerindo que os efeitos da dessensibilização dos canais TRPV1 sobre o desempenho físico também podem ser dependentes do tipo de exercício avaliado.

Até o momento, nenhum estudo havia avaliado a relação entre as respostas termorregulatórias e o desempenho físico em animais submetidos à dessensibilização dos canais TRPV1 periféricos. Dessa forma, uma das novidades apresentadas pelo presente estudo foi demonstrar que as alterações termorregulatórias promovidas pela dessensibilização não afetam o desempenho físico na esteira. Durante os exercícios progressivos realizados em ambiente termoneutro e quente, os animais tratados com RTX apresentaram uma maior temperatura cerebral no momento da IVE e uma maior taxa de aumento da temperatura cerebral em relação aos animais controles, embora a velocidade máxima atingida pelos ratos dos dois grupos não tenha sido diferente. Esse resultado concorda com os resultados dos delineamentos experimentais 1 e 2, os quais sugerem que, durante o exercício progressivo (principalmente em ambiente termoneutro), fatores não térmicos parecem ser mais importantes na determinação do desempenho. No entanto, ao se analisar os valores absolutos de temperatura cerebral atingidos durante o exercício progressivo em ambiente quente, é sugestivo que fatores térmicos tenham sido importantes para determinação do desempenho nos animais de ambos os grupos, uma vez que os ratos controles e dessensibilizados interromperam o esforço com uma temperatura cerebral próxima a 40°C e 41°C, respectivamente. Uma diferença entre os dois protocolos de exercício que deve ser ressaltada é que, durante o exercício progressivo, a temperatura cerebral foi mantida próxima a 40°C, principalmente nos animais controles, por um período curto de tempo (aproximadamente 3 minutos), enquanto que esses valores elevados de temperatura cerebral foram mantidos por aproximadamente 30 minutos durante o exercício constante. Portanto, é provável que, pelo menos nos animais controles, a temperatura cerebral tenha sido um fator mais determinante para a interrupção do exercício constante do que para a interrupção do exercício progressivo. Corroborando essa hipótese e os resultados do delineamento experimental 1, foi observado que, durante o exercício constante, os animais dessensibilizados e controles apresentaram temperatura cerebral no momento da IVE e taxa de aumento da temperatura cerebral similares.

Outra possível explicação para o fato de maiores temperaturas cerebrais não terem sido associadas a reduções do desempenho dos ratos dessensibilizados durante os exercícios

progressivos, é a participação dos canais TRPV1 periféricos na regulação da atividade locomotora espontânea. É importante ressaltar que estudos anteriores mostraram que animais *knockouts* para o canal TRPV1 são hiperativos quando jovens (GARAMI *et al.*, 2011), mas hipoativos quando atingem a meia idade (WANNER *et al.*, 2011). Além disso, a administração de antagonistas dos canais TRPV1 na cavidade abdominal aumenta a atividade locomotora de camundongos sem deleção gênica (GARAMI *et al.*, 2011). Portanto, é possível que a dessensibilização dos canais TRPV1 tenha promovido hiperatividade o que contribuiria para um maior desempenho físico. Entretanto, esse efeito pode ter sido anulado pelo maior aumento da temperatura cerebral durante o exercício provocado concomitantemente pela dessensibilização. Experimentos futuros são necessários para investigar o efeito do tratamento com RTX sobre o desempenho físico, em condições experimentais nas quais a corrida não promova o aumento da temperatura interna (GUIMARÃES *et al.*, 2013).

5 CONCLUSÕES

- 1) A dessensibilização dos canais TRPV1 periféricos altera a regulação da temperatura cerebral durante o exercício, sem modificar o desempenho físico. As alterações na regulação da temperatura cerebral provocadas pela dessensibilização dos canais TRPV1 se devem, pelo menos em parte, ao atraso na ativação da dissipação de calor através da pele. Esses resultados indicam a importância dos canais TRPV1 localizados na cavidade abdominal para regulação da temperatura corporal interna durante o exercício físico.
- 2) A intensidade do exercício alterou a velocidade do aumento na temperatura cerebral observado durante o exercício, sem modificar o valor de temperatura cerebral atingido no momento da interrupção voluntária do esforço. Apesar de as situações experimentais do delineamento 1 terem sido realizadas somente em ambiente termoneutro, é muito provável que fatores térmicos tenham sido moduladores importantes do desempenho físico, como evidenciado pelo aumento da temperatura cerebral para valores superiores a 40°C e pela correlação negativa entre a taxa de aumento da temperatura cerebral e o tempo total de exercício.
- 3) Os procedimentos utilizados para medida da temperatura cerebral não alteram o desempenho físico durante a corrida na esteira.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, M. C. *et al.* Cold-seeking behavior as a thermoregulatory strategy in systemic inflammation. **European Journal of Neuroscience**, v. 23, p. 3359-3367, 2006.

ARMSTRONG, L. E. *et al.* American College of Sports Medicine position stand. Exertional heat illness during training and competition. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v.39, p.556-572, 2007.

BLAND, J. M.; ALTMAN, D. G. The Logrank test. **British Medical Journal**, v.328, p.1073, 2004.

CAPUTA, M.; FEISTKORN, G.; JESSEN, C. Effects of brain and trunk temperatures on exercise performance in goats. **European journal of Physiology**, v.406, n.2, p.184-189, 1986.

CAPUTA, M.; KAMARI, A.; WACHULEC, M. Selective brain cooling in rats resting in heat and during exercise. **Journal of thermal biology**, v.16, p.19-24, 1991.

CATERINA, M. J. *et al.* The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, v.389, p. 816-824, 1997.

CATERINA, M. J. *et al.* Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. **Science**, v.288, p.306-313, 2000.

CATERINA, M. J. JULIUS, D.. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. **Annual Review of Neuroscience**, v.24, p.487-517, 2001.

CZAJA, K.; BURNS, G. A.; RITTER, R. C. capsaicin-induced neuronal death and proliferation of the primary sensory neurons located in the nodose ganglia of adult rats. **Neuroscience**, v.154, p.621-630, 2008.

DE PETROCELLIS, L.; DI MARZO, V. Lipids as regulators of the activity of transient receptor potential type V1 (TRPV1) channels. **Life Sciences**, v.77, p.1651-1666, 2005.

CORMARECHE-LEYDIER, M.; SHIMADA, S. G.; STITT, J. T. Hypothalamic thermosensitivity in capsaicin-desensitized rats. **Journal of Physiology**, v.363, p.227-236, 1985.

DHAKA, A. *et al.* TRPV1 senses both acidic and basic Ph. **Journal of Neuroscience**, v.29, n.1, p.153-158, 2009.

DIB, B. Dissociation between peripheral and central heat loss mechanism induced by neonatal capsaicina. **Behavioral Neuroscience**, v.97, n.5, p.822-829, 1983.

DOGAN, M. D. *et al.* Lipopolysaccharide fever is initiated via a capsaicin-sensitive mechanism independent of the subtype-1 vanilloid receptor. **British Journal of pharmacology**, v.143, p.1023–1032, 2004.

DONNERER, J.; LEMBECK, F. Heat loss reaction to capsaicin through a peripheral site of action. **British Journal of pharmacology**, v.79, p.719-723, 1983.

DOUSSET, E. *et al.* Effects of neonatal capsaicin deafferentation on neuromuscular adjustments, performance, and afferent activities from adult tibialis anterior muscle during exercise. **Journal of Neuroscience Research**, v.76, p.734–741, 2004.

FONSECA, C. G. **Efeito do exercício físico agudo realizado até a interrupção voluntária do esforço na temperatura ambiente de 12°C e 25°C sobre a temperatura hipotalâmica.** 2012. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciências do Esporte) - Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

FTAITI, F. *et al.* Changes in EEG activity before and after exhaustive exercise in sedentary women in neutral and hot environments. **Applied Ergonomics**, v. 41, p. 806–811, 2010.

FULLER, A.; CARTER, R. N.; MITCHELL, D. Brain and abdominal temperatures at fatigue in rats exercising in the heat. **Journal of Applied physiology**, n.84, p.877-883, 1998.

GALLOWAY, S. D. R.; MAUGHAN, R J. Effects of ambient temperature on the capacity to perform prolonged cycle exercise in man. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v.29, n.9, p. 1240-9, 1997.

GARAMI, A.; PAKAI, E.; OLIVEIRA, D. L.; STEINER, A. A.; WANNER, S. P.; ALMEIDA, M. C.; LESNIKOV, V. A.; GAVVA, N. R.; ROMANOVSKY, A. A. Thermoregulatory Phenotype of the *Trpv1* Knockout Mouse: Thermoeffector Dysbalance with Hyperkinesis. **The Journal of Neuroscience**, v. 31, n 5, p. 1721–1733, 2011.

GARAMI, A. *et al.* Contributions of different modes of trpv1 activation to TRPV1 antagonist-induced hyperthermia. **The Journal of Neuroscience**, v.30, n.4, p.1435–1440, 2010.

GAVVA, N. R. *et al.* Pharmacological blockade of the vanilloid receptor TRPV1 elicits marked hyperthermia in humans. **Pain**, v.136, n.1-2, p.202-210, 2008.

GAVVA, N. R. *et al.* The vanilloid receptor TRPV1 is tonically activated in vivo and involved in body temperature regulation. **Journal of Neuroscience**, v.27, p.3366-3374, 2007.

GISOLFI, C. V.; MORA, F. What's do important about a body temperature of 37°C. In: GISOLFI, C. V.; MORA, F. **The hot brain: survival, temperature and the human body.** Massachusetts: Massachusetts Institute of Technology, 2000. cap.5, p.95-119.

GONZÁLEZ-ALONSO, J. *et al.* Influence of body temperature on the development of fatigue during prolonged exercise in the heat. **Journal of Applied physiology**, v.86, n.3, p.1032–1039, 1999.

GUIMARÃES, J. B. *et al.* Fatigue is mediated by cholinceptors within the ventromedial hypothalamus independent of changes in core temperature. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, v.23, n.1, p.46–56, 2013.

HASEGAWA, H. *et al.* Influence of brain catecholamines on the development of fatigue in exercising rats in the heat. **Journal of physiology**, v.586, n.1. p.141-149, 2008.

HORI, T.; SHINOHARA, K. Hypothalamic thermo-responsive neurones in the new-born rat. **Journal of Physiology**, v.294, p.541-560, 1979.

HUANG, S. M. *et al.* An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.99, n.12, p.8400-8405, 2002.

JANCSO, G. *et al.* Selective degeneration by capsaicin of a subpopulation of primary sensory neurons in the adult rat. **Neuroscience Letters**, v.59, p.209-214, 1985.

JANCSO-GABOR, A.; SZOLCSANYI, J.; JANCSO, N. Irreversible impairment of thermoregulation induced by capsaicin and similar pungent substances in rats and guinea-pigs. **Journal of physiology**, v.206, p.495-507, 1970a.

JANCSO-GABOR, A.; SZOLCSANYI, J.; JANCSO, N. stimulation and desensitization of the hypothalamic heat-sensitive structures by capsaicin in rats. **Journal of physiology**, v.208, p.449-459, 1970b.

JORDT, S. E.; TOMINAGA, M.; JULIUS, D. Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.97, n.14, p.8134-8139, 2000.

KIYATKIN, E. A. Brain temperature fluctuations during physiological and pathological conditions. **European Journal of Applied physiology**, v.101, p.3–17, 2007.

KIYATKIN, E. A.; SHARMA, H. S. Permeability of the blood–brain barrier depends on brain temperature. **Neuroscience**, v.161, p.926–939, 2009.

KOBAYASHI, A. *et al.* Capsaicin activates heat loss and heat production simultaneously and independently in rats. **American Journal of physiology: Regulatory, Integrative and Comparative physiology**, v.275, p.R92-R98, 1998.

KUIPERS, H.; *et al.* Variability of aerobic performance in the laboratory and its physiologic correlates. **International Journal of Sports Medicine**, v.6, p.197-201, 1985.

LAMBERT, E. V. *et al.* Complex systems model of fatigue: integrative homeostatic control of peripheral physiological systems during exercise in humans. **British Journal of Sports Medicine**, v.39, p.52–62, 2005.

LEON, L. R.; HELWIG, B. G. Heat stroke: Role of the systemic inflammatory response. **Journal of Applied physiology**, v.109, p.1980–1988, 2010.

LIMA, M. R. *et al.* Chronic sympathectomy of the caudal artery delays cutaneous heat loss during passive heating. **Neuroscience Letters**, v.14, n.537, p.11-6, 2013.

LUO1, Z. *et al.* TRPV1 activation improves exercise endurance and energy metabolism through PGC-1 α up regulation in mice. **Cell Research**, v.22, n.3, p.551-564, 2011.

MCGARAUGHTY, S. *et al.* Antagonism of TRPV1 receptors indirectly modulates activity of thermoregulatory neurons in the medial preoptic area of rats. **Brain Research**, v.1268, p.58–67, 2009.

MOHAPATRA, D. P.; NAU, C. Regulation of Ca^{2+} -dependent desensitization in the vanilloid receptor TRPV1 by calcineurin and camp-dependent protein kinase. *The journal of biological chemistry*, v.280, n.14, p.13424–13432, 2005.

NAKAYAMA, T. *et al.* Effects of capsaicin on hypothalamic thermo-sensitive neurons in the rat. **Neuroscience letters**, v.7, p.151-155, 1978.

NOAKES, T. D. Physiological models to understand exercise fatigue and the adaptations that predict or enhance athletic performance. **Scandinavian journal of medicine and science in sports**, v.10, p.123–145, 2000.

NONNEMAN, A. J.; CORWIN, J. V. Differential Effects of Prefrontal Cortex Ablation in Neonatal, Juvenile, and Young Adult Rats. **Journal of Comparative and physiological psychology**, v.93, n.4, p.588-602, 1981.

NUMAZAKI, M.; TOMINAGA, M. Nociception and TRP Channels. **Current Drug Targets - CNS & Neurological Disorders**, v.3, p.479-485, 2004.

NYBO, L.; NIELSEN, B. Hyperthermia and central fatigue during prolonged exercise in humans. **Journal of Applied physiology**, v.91, p.1055–1060, 2001a.

NYBO, L.; NIELSEN, B. Perceived exertion is associated with an altered brain activity during exercise with progressive hyperthermia. **Journal of Applied physiology**, v.91, p.2017–2023, 2001b.

NYBO, L. Brain temperature and exercise performance. **Experimental Physiology**, v.97, n.3, p.333-339, 2011.

OBÁL F. Jr. *et al.* Differences in the mechanism of the thermoregulatory impairment induced by capsaicin in newborn and adult rats. **Acta physiologica Hungarica**, v.69, n.3-4, p.437-445, 1987.

OBÁL, F. Jr.; OBÁL, F.; BENEDEK, G.; JANCSÓN-GÁBOR, A. Central and peripheral impairment of thermoregulation after capsaicin treatment. **Journal of thermal Biology**, v. 8, p. 203-206, 1983.

OBÁL, F. Jr. *et al.* Thermolytic mechanisms in capsaicin desensitized rats. **Advances in physiological Sciences**, v.32, p.57-59, 1981.

OH, T.; OHTA, F. Dose-dependent effect of capsaicin on endurance capacity in rats. **British Journal of Nutrition**, v.90, p.515–520, 2003.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. San Diego: Elsevier, 2007.

PELES, S. *et al.* Differential Effects of TRPV1 Antagonists in acid-induced excitation of esophageal vagal afferent fibers of rats. **Neuroscience**, v.161, n.2, p.515–525, 2009.

PIRES, W. **Regulação colinérgica central do tônus vasomotor**. 2012. Tese (Doutorado em Ciências do Esporte) - Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

PIRES W. *et al.* Sinoaortic denervation prevents enhanced heat loss induced by central cholinergic stimulation during physical exercise. **Brain Research**, v.1366, p.120-8, 2010.

PIRES, W. *et al.* Intracerebroventricular physostigmine enhances blood pressure and heat loss in running rats. **Journal of physiology and pharmacology**, v.58, n.1, p.3-7, 2007.

PRÍMOLA-GOMES, T. N. *et al.* Exercise capacity is related to calcium transients in ventricular Cardiomyocytes. **Journal of Applied physiology**, v.107, p.593–598, 2009.

RACINAIS, S. *et al.* Failed excitability of spinal motoneurons induced by prolonged running exercise. **Journal of Neurophysiology**, v.97, p.596-603, 2007.

RHODES, J. S. *et al.* Patterns of brain activity associated with variation in voluntary wheel-running behavior. **Behavioral Neuroscience**, v.117, p.1243–1256, 2003.

RITTER, R. C.; LADENHEIM, E. E. Capsaicin pretreatment attenuates suppression of food intake by cholecystokinin. **American Journal of physiology: Regulatory, Integrative and Comparative physiology**, v.248, p.R501-R504, 1985.

RODRIGUES, L. O. C. *et al.* Heat storage rate and acute fatigue in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.36, p.131-135, 2003.

RODRIGUES, L. O. C; SILAME-GARCIA, E. Fadiga: Falha ou mecanismo de proteção? In **Temas atuais em Educação Física e esportes II**. Belo Horizonte: Gráfica e Editora Cultura Ltda, 1998. cap. 2, p.31-46.

ROMANOVSKY, A. A. *et al.* The transient receptor potential vanilloid-1 channel in thermoregulation: a thermosensor it is not. **Pharmacological Reviews**, v.61, p.228-261, 2009.

ROMANOVSKY, A. A. Thermoregulation: some concepts have changed. Functional architecture of the thermoregulatory system. **American Journal of physiology: Regulatory, Integrative and Comparative physiology**, v.292, p.R37–R46, 2007.

ROMANOVSKY, A. A.; IVANOV, A. I.; SHIMANSKY, Y. P. Selected Contribution: Ambient temperature for experiments in rats: a new method for determining the zone of thermal neutrality. **Journal of Applied physiology**, v.92, p.2667–2679, 2002.

ROSS, E. Z. *et al.* Corticomotor excitability contributes to neuromuscular fatigue following marathon running in man. **Experimental physiology**, v.92, p.417-426, 2007.

SMITH, G. P *et al.* Afferent axons in abdominal vagus mediate satiety effect of cholecystokinin in rats. **American Journal of physiology: Regulatory, Integrative and Comparative physiology**, v.249, p.R638-R641, 1985.

SOARES, D. D. *et al.* Intracerebroventricular tryptophan increases heating and heat storage rate in exercising rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.78, p.255–261, 2004.

STEINER, A. A. *et al.* Nonthermal activation of transient receptor potential vanilloid-1 channels in abdominal viscera tonically inhibits autonomic cold-defense effectors. **Journal of Neuroscience**, v.27, p.7459–7468, 2007.

SZALLASI, A. *et al.* Vanilloid (capsaicin) receptors in the rat: distribution in the brain, regional differences in the spinal cord, axonal transport to the periphery, and depletion by systemic vanilloid treatment. **Brain Research**, v.703, p.175–183, 1995.

SZALLASI, A. *et al.* Duration of desensitization and ultrastructural changes in dorsal root ganglia in rats treated with resiniferatoxin, an ultrapotent capsaicin analog. **Brain Research**, v.503, p.68–72, 1989.

SZALLASI, A.; BLUMBERG, P. M. Resiniferatoxin, a phorbol-related diterpene, acts as an ultrapotent analog of capsaicin, the irritant constituent in red pepper. **Neuroscience**, v.30, n.2, p.515–520, 1989.

SZELÉNYI, Z. *et al.* Daily body temperature rhythm and heat tolerance in TRPV1 knockout and capsaicin pretreated mice. **European Journal of Neuroscience**, v.19, p.1421–1424, 2004.

SZIKSZAY, M. *et al.* Dose-response relationships in the thermoregulatory effects of capsaicin. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch pharmacology**, v.320, p.97–100, 1982.

TOMINAGA, M. *et al.* The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. **Neuron**, v.21, p.531–543, 1998.

TRUDEAU, F.; MILOT, M. Capsaicin-sensitive nerves and endurance exercise in the rat. **Physiology & Behavior**, v.59, n.2, p.355–359, 1996.

UYLINGS, H. B. M. *et al.* Do rats have a prefrontal cortex? **Behavioural Brain Research**, v.146, p.3–17, 2003.

VAN DER STELT, M.; DI MARZO, V. Endovanilloids: Putative endogenous ligands of transient receptor potential vanilloid 1 channels. **European Journal of Biochemistry**, v.271, p.1827–1834, 2004.

VRIENS, J. *et al.* TRPM3 is a nociceptor channel involved in the detection of noxious heat. **Neuron**, v.70, p.482–494, 2011.

WALTERS, T. J. *et al.* Exercise in the heat is limited by a critical internal temperature. **Journal of Applied physiology**, v.89, p.799–806, 2000.

WALTERS, T. J. *et al.* Regional brain heating during microwave exposure (2.06 GHz), warm water immersion, environmental heating and exercise. **Bioelectromagnetics**, v.19, n.6, p.341-53, 1998a.

WALTERS, T. J. *et al.* HSP70 expression in the CNS in response to exercise and heat stress in rats. **Journal of Applied physiology**, v.84, n.4, p.1269–1277, 1998b.

WANNER, S. P. *et al.* Muscarinic cholinergic receptors in the ventromedial hypothalamic nucleus facilitate tail heat loss during physical exercise. **Brain Research Bulletin**, v.73, p.28-33, 2007.

WANNER, S. P. *et al.* Hyperactive when young, hypoactive and overweight when aged: Connecting the dots in the story about locomotor activity, body mass, and aging in *Trpv1* knockout mice. **Aging**, v.3, n.4, p.450-454, 2011.

WANNER, S. P. *et al.* Aging reverses the role of the transient receptor potential vanilloid-1 channel in systemic inflammation from anti-inflammatory to proinflammatory. **Cell Cycle**. v.11, n.2, p.343-349, 2012.

WATABIKI, T. *et al.* Amelioration of neuropathic pain by novel transient receptor potential vanilloid 1 antagonist as1928370 in rats without hyperthermic effect. **The journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v.336, p.743–750, 2011.

WATSON, P. *et al.* Blood-brain barrier integrity may be threatened by exercise in a warm environment. **American Journal of physiology: Regulatory, Integrative and Comparative physiology**, v.288, p.R1689–R1694, 2005.

WINTER, J.; BEVAN, S.; CAMPBELL, E. A. Capsaicin and pain mechanisms. **British Journal of Anaesthesia**, v.75, p.157-168, 1995.

WOODS, A. J. *et al.* Thermoregulatory effects of resiniferatoxin in the rat. **European Journal of pharmacology**, v.264, p.125-133, 1994.

YAMASHITA, H. *et al.* Impaired Basal Thermal Homeostasis in Rats Lacking Capsaicin-sensitive Peripheral Small Sensory Neurons. **Journal of Biochemistry**, v.143, p.385–393, 2008.

YOUNG, A. A. DAWSON, N. J. Evidence for on-off control of heat dissipation from the tail of the rat. **Canadian Journal of physiology and Pharmacology**, v.60, p.392–393, 1982.