

Ana Cristina Rodrigues Lacerda

**PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO CENTRAL NA
TERMORREGULAÇÃO DURANTE O EXERCÍCIO FÍSICO
EM RATOS**

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Fisiologia e Biofísica
Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo
Belo Horizonte
2006

Ana Cristina Rodrigues Lacerda

**PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO CENTRAL NA
TERMORREGULAÇÃO DURANTE O EXERCÍCIO FÍSICO
EM RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof Dr Cândido Celso Coimbra

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Umeko Marubayashi

Belo Horizonte

Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

2006

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

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

*Toda a nossa ciência, comparada com a realidade,
é primitiva e infantil – e, no entanto, é a coisa mais
preciosa que temos.*

Albert Einstein (1879 – 1955)

Dedicatória

Ao Victor meu filho.

Ao Fernando meu companheiro dedicado e de presença constante.

Aos meus pais, a minha avó Ivete e a minha tia Gracinda, pelo apoio recebido ao longo da minha vida.

Agradecimentos

Ao orientador Dr. Cândido Celso Coimbra, por ter apostado em mim. Além disso, gostaria de agradecer-lo pela orientação, confiança e presença constante em todas as fases deste meu projeto;

À professora Dra. Umeko Marubayashi, pelo conhecimento e atenção recebidos, os quais foram decisivos na conclusão desta tese e na minha formação profissional;

À professora Dra. Adelina M. Reis, pelo apoio sempre disponível;

Ao professor Dr. Ivan Sampaio, pela inestimável ajuda na análise estatística dos dados;

À amiga Patrícia Tanuri, pela revisão, correções e sugestões na elaboração deste texto;

Ao Professor Dr. Nilo Lima, por ter me incentivado a ingressar no doutorado, "o meu eterno muito obrigada";

À Professora Danusa Dias Soares, pela valiosa contribuição teórica recebida;

Ao amigo André Luis Pimenta de Faria, responsável pela assistência técnica, pelo profissionalismo;

Ao amigo Simonton, pela paciência nos primeiros passos;

Ao amigo Cláudio, pelo amadurecimento em conjunto;

Aos colegas e amigos, Laura, Alex, Ana Luisa, Virgínia, Marcivane;

Aos colegas do curso de pós-graduação;

Aos animais utilizados neste estudo;

Às agências de fomento – CAPES, FAPEMIG e CNPq.

Índice

Resumo.....	8
Abstract.....	10
Introdução	12
Temperatura corporal.....	12
Controle da atividade termofetora pelo sistema nervoso central	17
Termorregulação durante o exercício	18
Consumo de oxigênio e eficiência mecânica durante o exercício.....	24
Óxido nítrico.....	25
Óxido nítrico no sistema nervoso central	27
Óxido nítrico durante o exercício	31
O papel do óxido nítrico periférico durante o exercício	31
O papel do óxido nítrico central durante o exercício.....	32
Objetivos	33
Objetivo geral	33
Objetivos específicos	33
Modelos Experimentais e Parâmetros Analisados.....	34
Exercício físico submáximo até a fadiga	36
Experimento 1	37
Experimento 2.....	38
Experimento 3.....	38
Exercício físico progressivo até a fadiga	39
Resultados Alcançados	41
Demonstramos que a via do óxido nítrico é um importante modulador da perda de calor durante o exercício em ratos [Brain Research Bulletin 67 (2005) 110-116].....	41
Evidências de que a inibição do óxido nítrico central reduz a eficiência mecânica, antecipando a fadiga [Neuroscience Letters 393 (2006) 260-263].....	50
Evidências de que a inibição do óxido nítrico central modifica os ajustes metabólicos induzidos pelo exercício físico em ratos [Neuroscience Letters, em processo de análise pela revista].....	55
Conclusões	72
Referências Bibliográficas.....	73

Resumo

Para avaliar o papel do sistema oxinitrergico nos mecanismos termorregulatórios centrais durante o esforço físico, 1.43 μmol (2 μl) de inibidor da enzima sintase de óxido nítrico (L-NAME; éster metil *N*^o-nitro-L-arginina) ou 2 μL de NaCl (0.15 M, Sal) foram injetados no ventrículo lateral cerebral de ratos normais não treinados imediatamente antes do início do exercício em esteira (velocidade de 18 m/min, com 5 % de inclinação). A temperatura retal e da cauda, bem como o consumo de oxigênio foram mensurados em repouso, durante o exercício até a fadiga e na fase de recuperação (até 30 min após o esforço). Com base nessas medidas, foram calculados: a taxa de aquecimento corporal, o armazenamento de calor, a temperatura retal limiar para a vasodilatação da cauda e a eficiência mecânica. O grupo tratado com L-NAME exibiu uma maior taxa de aquecimento corporal ($0.17 \pm 0.02 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, L-NAME vs $0.09 \pm 0.01 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, Sal, $p < 0.05$) e armazenou mais calor ($454.6 \pm 62.8 \text{ cal}$, L-NAME vs $250.0 \pm 37.3 \text{ cal}$, Sal, $p < 0.05$) durante os 11 minutos iniciais de exercício (fase dinâmica). Além disso, este grupo apresentou um maior consumo de oxigênio ($66.8 \pm 0.7 \text{ mL O}_2\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, L-NAME vs $57.1 \pm 0.3 \text{ mL O}_2\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, Sal; $p < 0.05$) e uma menor eficiência mecânica ($17.8 \pm 0.7 \%$, L-NAME vs $21.7 \pm 0.7 \%$, Sal, $p < 0.05$) durante a fase estável do exercício (11º minuto de exercício até a fadiga). Os animais tratados com L-NAME apresentaram também um menor desempenho de corrida comparado com o grupo tratado com salina (Trabalho: $11.82 \pm 1.45 \text{ kgm}$, L-NAME vs $24.05 \pm 2.12 \text{ kgm}$, Sal, $p < 0.01$). A maior taxa de aquecimento corporal observada nestes animais durante os 11 minutos iniciais de exercício, em consequência de elevação da temperatura retal

limiar para vasodilatação da cauda (39.12 ± 0.24 °C, L-NAME vs 38.27 ± 0.10 °C, Sal, $p < 0.05$), estava inversamente relacionada com o trabalho realizado ($r = 0.74$, $p < 0.01$). Finalmente, os nossos dados indicam que a via do óxido nítrico central atua como um efeito protetor do sistema nervoso central, modulando os mecanismos de dissipação e de produção de calor durante o exercício, melhorando o desempenho físico.

Abstract

To assess the role of nitric oxide (NO) in central thermoregulatory mechanisms during exercise, 1.43 μmol (2 μl) of *N*^o-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, n=6), a NO synthase inhibitor, or 2 μl of 0.15 M NaCl (SAL, n=6) was injected into the lateral cerebral ventricle of male Wistar rats immediately before the animals started running (18m/min, 5% inclination). Core and skin tail temperatures, as well as oxygen consumption were measured at rest, during exercise until fatigue, and thereafter during the 30 minutes of recovery. Body heating rate, heat storage, threshold core temperature for tail vasodilation, and mechanical efficiency were calculated. There were a greater increase in body heating rate ($0.17 \pm 0.02 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, L-NAME vs $0.09 \pm 0.01 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, Sal, $p < 0.01$) and heat storage ($454.6 \pm 62.8 \text{ cal}$, L-NAME vs $250.0 \pm 37.3 \text{ cal}$, Sal, $p < 0.05$) in the L-NAME group than in the SAL group during the first 11 minutes of exercise (dynamic state). Furthermore, the L-NAME-treated animals had a greater oxygen consumption ($66.8 \pm 0.7 \text{ mL O}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, L-NAME vs $57.1 \pm 0.3 \text{ mL O}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, Sal, $p < 0.05$) and a lower mechanical efficiency ($17.8 \pm 0.7 \%$, L-NAME vs $21.7 \pm 0.7 \%$, Sal, $p < 0.05$) following the first 11 minutes until fatigue (steady state). In addition, there was a significant reduction in running performance by L-NAME-treated animals compared to SAL-treated animals. These results suggest that the reduced workload ($11.82 \pm 1.45 \text{ kgm}$, L-NAME vs $24.05 \pm 2.12 \text{ kgm}$, Sal, $p < 0.01$) observed in L-NAME-treated rats was related to the increased body heating rate in L-NAME-treated animals observed during the first 11 minutes of exercise ($r = 0.74$, $p < 0.01$) due to the change in threshold core temperature for tail vasodilation ($39.12 \pm 0.24 \text{ }^\circ\text{C}$, L-NAME vs $38.27 \pm 0.10 \text{ }^\circ\text{C}$, Sal,

p<0.05). Finally, our data suggest that the central nitric oxide pathway modulates mechanisms of heat dissipation and heat production during exercise, through an inhibitory mechanism, delaying fatigue.

Introdução

Temperatura corporal

Em mamíferos, a temperatura corporal é o resultado do balanço entre os mecanismos de produção e perda de calor. A variável primária é a taxa de produção de calor que ativa os mecanismos de perda de calor (variável secundária), estabelecendo um ponto de equilíbrio ou balanço energético, que determina a temperatura corporal (variável terciária). Queda da temperatura ambiente e conseqüente queda da temperatura corporal ativam os mecanismos de produção e inibem os mecanismos de perda de calor. Por outro lado, os mecanismos de produção de calor são inibidos e os de perda de calor são ativados com aumento da temperatura ambiente.

A capacidade de um organismo de manter a temperatura corporal constante depende do mecanismo de integração da informação térmica interna e ambiental pelo sistema nervoso central gerando uma resposta termorregulatória apropriada (Boulant, 1998a, 1998b).

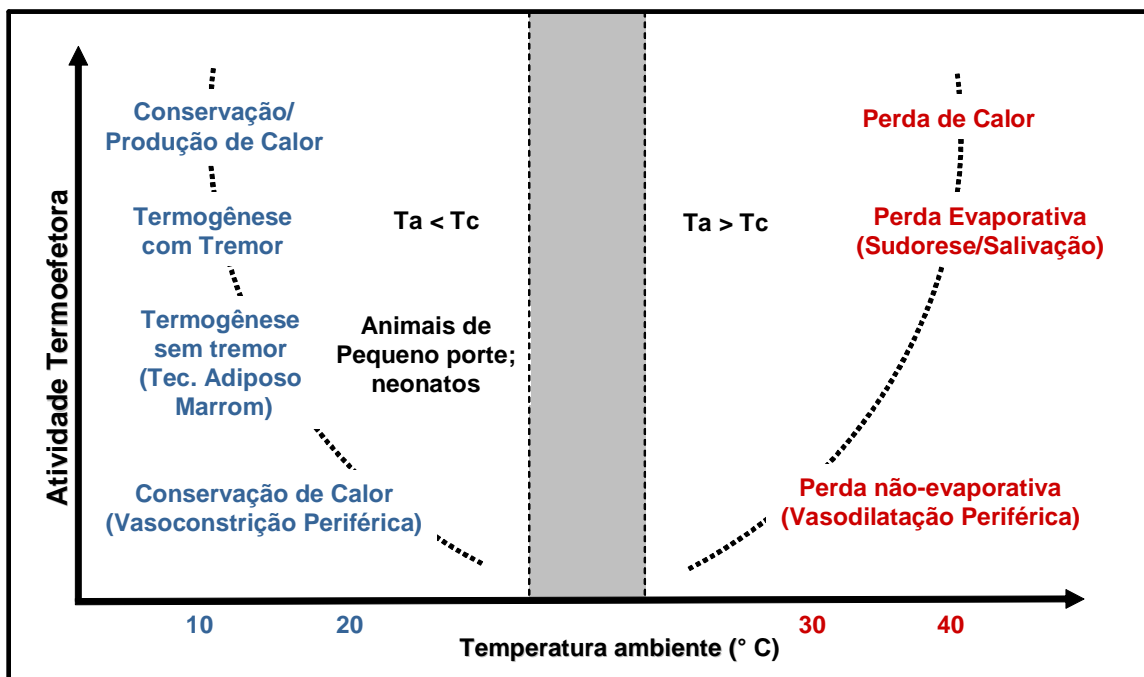


FIGURA 1. Dependência dos mecanismos autonômicos de regulação da temperatura corporal (T_c) em relação à temperatura ambiente (T_a) em mamíferos. A exposição ao frio ativa mecanismos de conservação / produção de calor e inibe mecanismos de perda de calor. O contrário ocorre durante exposição ao calor. Ver texto para mais detalhes. Adaptado de Almeida (2006).

Os mecanismos de regulação da temperatura corporal podem ser divididos em comportamentais e autonômicos. No caso do homem, entre os exemplos de termorregulação comportamental, estão a invenção das vestimentas, a construção de abrigos, o uso do fogo e posteriormente da eletricidade para fornecimento de calor (Milton, 1998). Espécies diferentes apresentam mecanismos termorregulatórios comportamentais distintos, tais como: construção de ninhos, alteração da atividade locomotora e ingestão de alimentos, ajustes posturais e escolha da temperatura ambiental de preferência (Gordon, 1990).

Os mecanismos autonômicos termorregulatórios incluem aqueles destinados a produzir ou conservar calor e aqueles destinados a promover a perda de calor (FIGURA 1). Entre

os mecanismos responsáveis pela produção ativa de calor, além da taxa metabólica basal, estão o tremor muscular, a atividade muscular espontânea e a termogênese sem tremor, que ocorre em tecidos especializados como o tecido adiposo marrom, presente em animais recém-nascidos ou de pequeno porte como os ratos. Tanto a perda quanto a conservação de calor podem ocorrer de maneira passiva com o ambiente, também conhecida como troca newtoniana de calor, pela condução, convecção e radiação. Quando a temperatura ambiente atinge valores maiores que da temperatura corporal, fisicamente a troca newtoniana de calor não é mais possível e os mecanismos pelos quais os animais são capazes de perder calor estão sob controle autonômico que regula a evaporação, que pode ocorrer, por exemplo, pela sudorese, no homem e pela insalivação, em ratos.

O sistema neural de regulação da temperatura corporal é constituído de dois componentes maiores: um de ação rápida, caracterizado pela atividade do sistema motor e simpático com constante de tempo de segundos ou minutos e um outro caracterizado pela ativação endócrina, com constante de tempo de minutos ou horas. Ambos componentes têm interações importantes, tanto central como periféricamente, de maneira a assegurar a termorregulação.

Vias somatossensoriais fazem a comunicação entre os receptores periféricos e o sistema nervoso central, sendo a área pré-óptica do hipotálamo anterior, a principal estrutura do cérebro responsável por este controle.

A temperatura ambiente é detectada por sensores localizados na pele. Os termorreceptores são terminações nervosas livres de diâmetro pequeno, não mielinizadas (fibras aferentes do tipo C). Eles são de dois tipos: sensíveis ao frio e sensíveis ao calor. Os termorreceptores sensíveis ao frio aumentam sua frequência de disparo com a redução da temperatura, enquanto os termorreceptores sensíveis ao calor elevam sua atividade com o aumento da temperatura. A informação gerada nos receptores periféricos é transmitida ao sistema nervoso central pelo corno dorsal da medula espinhal e seus axônios ascendem pelo trato espinotalâmico. Alguns desses axônios projetam-se para o tálamo ventrobasal, onde neurônios talâmicos enviam a informação para o córtex somatosensorial primário. No tálamo e córtex, as informações táteis e térmicas são processadas, permitindo a exata localização das sensações térmicas na superfície cutânea. Projeções dos termorreceptores periféricos de diversas áreas da pele convergem na formação reticular do tronco encefálico, de onde se projetam para a área pré-óptica do hipotálamo anterior (Boulant, 1998b).

Além dos termorreceptores periféricos, também existem termorreceptores centrais, os quais detectam a temperatura corporal interna. Os termorreceptores centrais são populações neuronais localizadas em diversos níveis do sistema nervoso central, incluindo a medula espinhal, a formação reticular e a própria área pré-óptica (Boulant, 2000). Os termorreceptores da medula espinhal também se projetam para a área pré-óptica, levando informações sobre a temperatura corporal do animal (Boulant & Hardy, 1974). Na área pré-óptica, a informação térmica é integrada e processada e sinais efetores são enviados para diferentes áreas do sistema nervoso central para ativar a resposta efetora apropriada.

Segundo Hammel et al. (1963), a área pré-óptica hipotalâmica possui a capacidade única de medir a sua própria temperatura, gerar um sinal de referência constante e ativar respostas termorregulatórias físicas, químicas e comportamentais em proporção ao erro entre a temperatura de equilíbrio e o sinal de referência (set point).

Há controvérsias sobre a existência de um sinal de referência (set point) hipotalâmico. Há mais de 20 anos, Werner (1980) demonstrou que todos os conceitos de ponto de referência representam casos especiais de um conceito mais geral.

Tal conceito geral baseia-se no balanço de processos ativos (controladores) e passivos (controlados) sem necessitar de um ponto de referência fisiológico ou matemático. Para aceitar o conceito de Werner, é necessário transformar as definições atuais das respostas termorregulatórias. Elas não deveriam basear-se em comparações entre a temperatura corporal interna e o sinal de referência, mas em determinar em qual valor de temperatura corporal interna haveria um balanço em uma dada resposta. Sendo assim, a atividade termofetora é dependente da temperatura corporal. Em certa temperatura corporal, o efector é ativado e esta temperatura corporal limiar para a atividade termofetora pode ser vista como um valor de temperatura corporal que este efector defende. Como proposto por Satinoff (1978), confirmado por dados experimentais consistentes (Nagashima et al., 2000), efetores que formam o sistema termorregulatório são amplamente independentes. Quando dois termofetores mudam a sua atividade de forma coordenada (i.e., quando a vasodilatação cutânea ocorre simultaneamente com a inibição da termogênese), eles ainda podem ter limiares distintos e defender diferentes valores de temperatura corporal.

O conceito novo de termorregulação proposto por Romanovsky e colaboradores (2004) sugere a transformação das definições baseadas em comparações entre a temperatura interna e um único valor de set-point hipotalalâmico, em respostas termofisiológicas influenciadas por processos ativos e passivos de controle da temperatura interna. Sendo assim, a mensuração de valores de temperatura corporal limiar para ativar respostas efetoras (e não apenas a atividade termofetora) torna-se uma ferramenta para investigar os mecanismos de termorregulação.

Controle da atividade termofetora pelo sistema nervoso central

Na última década, ocorreu um grande avanço na identificação das vias que controlam a atividade termofetora, especialmente em relação àquelas responsáveis pelo controle da termogênese no tecido adiposo marrom e vasomotricidade de órgãos especializados em troca de calor (Nagashima et al., 2000) (FIGURA 2). Os neurônios pré-motores simpáticos (aqueles que se projetam diretamente para a coluna intermediolateral da medula espinhal) que controlam a termogênese no tecido adiposo marrom e vasomotricidade de órgãos especializados em troca de calor, localizam-se nos núcleos da rafe pallidus e magnus. Esses neurônios estão sob controle de estruturas superiores do eixo neural, incluindo o hipotálamo dorsomedial (DMH), núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), substância cinzenta periaquedutal, campo retrorubro e área tegmental ventral (Bamshad et al., 1999; Oldfield et al., 2002; Cano et al., 2003). Por essas vias, os termofetores são controlados de maneira independente (Nagashima et al., 2000; McAllen, 2004).

	Secreção salivar	Vasomotricidade	Termogênese com tremor	Termogênese sem tremor	Comportamento
POA	●	●	●	●	
Hipotálamo	PVN	PVN / MFB	Hipotálamo Posterior	PVN VMH/DMH	
Ponte		VTA PAG/RF	RF	Área Inibitória Pontina	?
Bulbo	Núcleo Salivar	RAFE		Rafe/Oliva inf.	
Medula Espinhal		IML	Moto-Neurônio- α	IML	
Tecidos periféricos					
	Glândula salivar	Vasos sang. Cutâneos	Músculo esquelético	Tec. Adiposo marrom	

Figura 2. Esquema ilustrando as vias termorregulatórias efetoras da área pré-óptica do hipotálamo (POA) para cada efector termorregulatório. Abreviações: PVN (núcleo paraventricular do hipotálamo), MFB (feixe prosencefálico medial), VTA (área tegmental ventral), PAG (substância cinzenta periaquedutal), IML (coluna intermediolateral), RF (formação reticular), VMH (hipotálamo ventromedial), DMH (hipotálamo dorsomedial). Adaptado de Nagashima e colaboradores (2000).

Termorregulação durante o exercício

O aumento na temperatura central que ocorre em resposta a exercício contínuo resulta de um desequilíbrio temporário entre as taxas de produção e dissipação de calor durante os estágios iniciais do exercício e da velocidade com a qual os mecanismos de dissipação de calor respondem ao aumento na temperatura corporal (Gleeson, 1998; Jessen, 1987; Webb, 1995). Experimentos descritos por Webb (1995) sobre os ajustes de produção e dissipação de calor corporal durante o exercício em humanos estão ilustrados na figura 3. Esses experimentos mostraram

que as mudanças exponenciais rápidas na produção de calor são seguidas por mudanças exponenciais lentas na perda de calor. O retardo nos ajustes de perda de calor causa mudanças no conteúdo de calor corporal e conseqüente mudança na temperatura corporal central. A vasoconstrição mediada pelo simpático neste estágio do exercício (Hartley et al., 1972; McAllister et al., 1995) dificulta a perda de calor. Conseqüentemente, a temperatura central aumenta rapidamente até alcançar o limiar para a vasodilatação periférica, aumentando a dissipação de calor e estabilizando a temperatura central em um valor mais elevado.

Experimentos recentes do nosso laboratório mostram que a teoria proposta por Webb se ajusta bem ao controle do calor corporal durante o exercício em ratos (FIGURA 4).

É difícil saber se o aumento na temperatura corporal induzido pelo exercício ocorre por causa do deslocamento no sinal de referência (set point) ou ocorre passivamente, conseqüência de um acúmulo indesejado de calor. Em ratos, correr na esteira a uma velocidade de $26.8 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$ ou mais rápido é um exercício vigoroso e nestas velocidades a temperatura corporal aumenta em função da carga de trabalho (Gollnick & Ianuzzo, 1968). Esses achados apóiam a idéia de que o aumento na temperatura corporal ocorre por causa de acúmulo de calor durante o exercício.

Além disso, quando a mudança na temperatura corporal é resultante de ganho passivo de calor, as respostas termofetoras se opõem a essa mudança. Para

corrigir um aumento na temperatura corporal devido à sobrecarga de calor, sem mudança no ponto de equilíbrio, as respostas termofetoras envolvem sudorese, vasodilatação, hiperpnéia, preferência à temperatura ambiente fria, sensação de calor. Em outras palavras, quando o acúmulo de calor eleva a temperatura corporal acima do ponto de equilíbrio, as respostas termofetoras são ativadas. Essas respostas são classificadas como respostas de combate ao calor e ocorrem durante a realização de exercício físico. Sendo assim, o aumento da temperatura corporal durante o exercício físico é considerado como hipertermia resultante de acúmulo de calor.

Quando o calor metabólico é acumulado, a temperatura central aumenta e atinge uma temperatura interna crítica cuja persistência poderia causar apoptose celular ou dano cerebral. Coincidente com essa elevação da temperatura interna ocorre a fadiga protetora, fazendo com que o animal voluntariamente cesse o exercício apesar dos estoques musculares de glicogênio (Fuller et al., 1998; Gleeson, 1998; Gonzalez-Alonso, 1999; McArdle et al., 2003; Walters et al., 2000). Os mecanismos responsáveis pela fadiga central devido a um aumento na temperatura interna ainda não estão bem estabelecidos; existem controvérsias sobre se haveria uma temperatura interna absoluta crítica ou se a taxa de armazenamento de calor seria tão importante ou mesmo mais importante do que a temperatura interna na determinação da fadiga central.

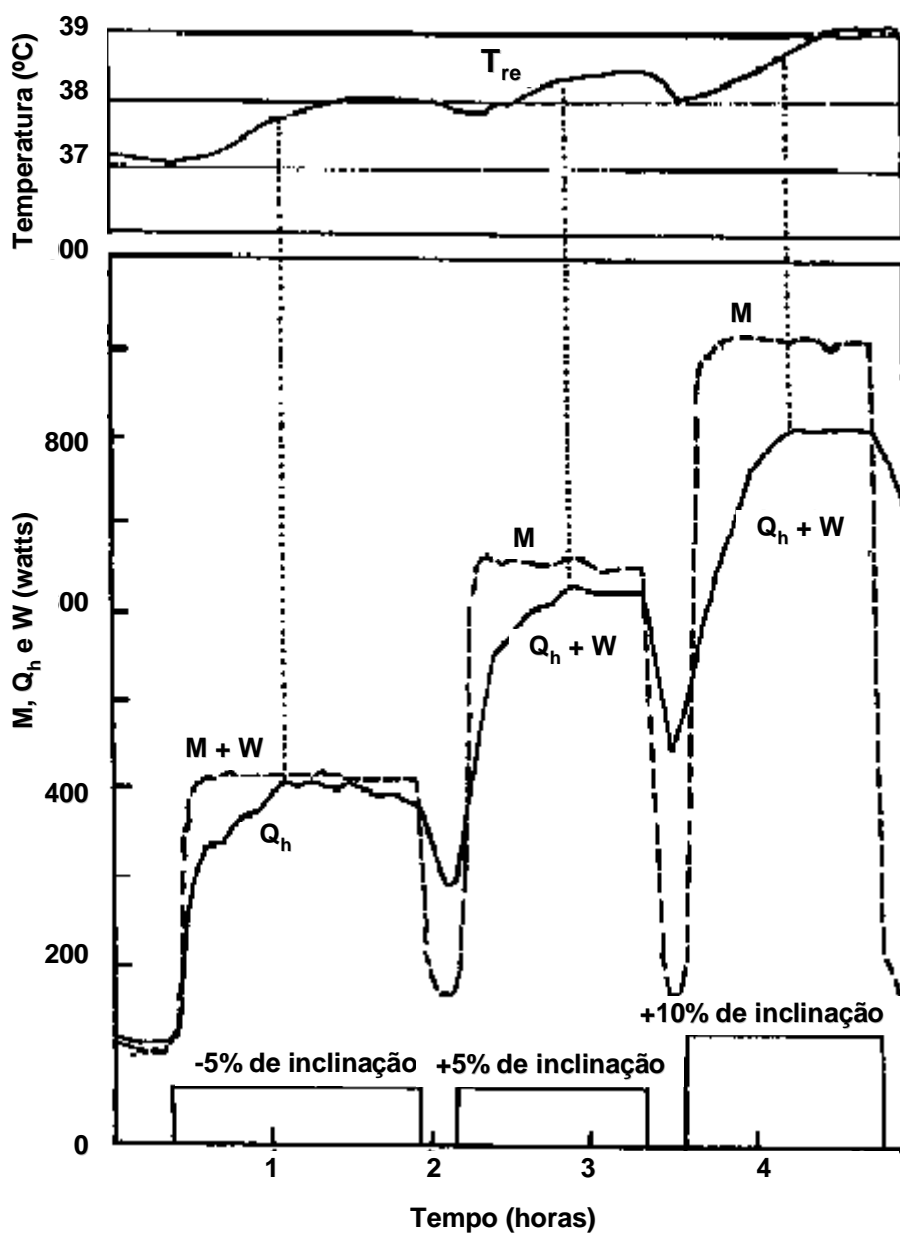


FIGURA 3. Mudanças exponenciais e estado de equilíbrio resultantes de uma série de caminhadas na esteira a 5.4 km/h com intervalo de repouso de 15-min. Graduação na esteira foi -5% de declinação e 5 e 10% de inclinação para as 3 caminhadas. O voluntário era um homem de 34 anos, 1.75 m de estatura e 74 kg de peso corporal; O VO_{2max} era 62 mL/kg/min. Início exponencial e declínio das 3 variáveis sendo a produção de calor a mais rápida (M). Linhas verticais mostram que o estado de equilíbrio da perda de calor (Q_h) é alcançado antes do que o estado de equilíbrio para a temperatura retal (T_{re}). A potência do trabalho negativo ($-W$) na caminhada descendente, que adiciona calor ao corpo, é somada à curva de M no primeiro exercício, ao passo que o trabalho externo da caminhada ascendente (W) na segunda e terceira caminhada é adicionado ao Q_h . (Ambas as taxas de energia positiva e negativa são mostradas como positivas para facilitar as comparações). [adaptado a partir de Webb, 1995].

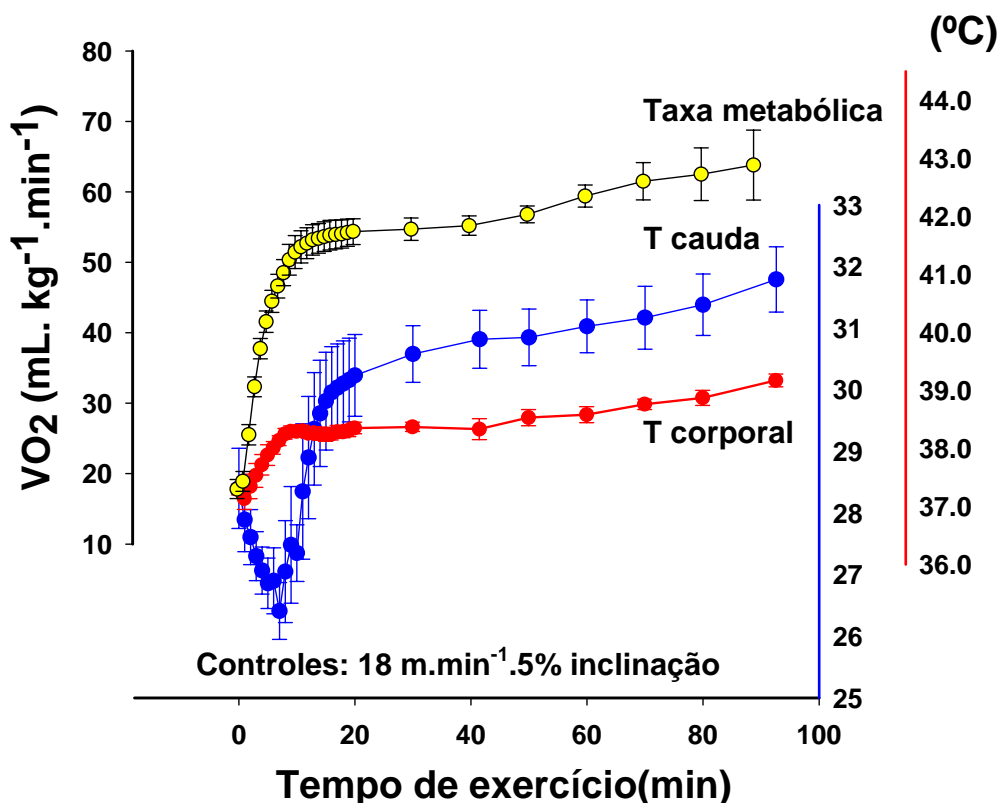


FIGURA 4. Taxa metabólica, temperatura da cauda (T cauda) e temperatura corporal (T corporal) de ratos Wistar tratados intracerebroventricularmente com salina, durante o exercício na esteira até a fadiga (18 m.min⁻¹, 5% inclinação). Os dados estão apresentados como Média±SEM. n=6 para cada variável. Aumento exponencial rápido na taxa metabólica e na temperatura corporal, seguido de estabilização com o valor mais alto atingido no momento da fadiga. A temperatura da cauda aumentou somente por volta de 14-20 minutos de exercício, indicando que a ativação dos mecanismos de perda de calor ocorreu mais tardiamente. Após este aumento inicial, a temperatura da cauda estabilizou com o valor mais alto atingido no momento da fadiga. [adaptado de Lacerda et al., 2005 e 2006].

Informações sensoriais sobre a temperatura corporal são enviadas para área de controle da atividade termoeferora, localizada na área pré-óptica (hipotálamo anterior), por inervações ascendentes oriundas de termorreceptores corporais profundos e periféricos. Os últimos, localizados na pele, informam sobre a quantidade de calor do ambiente. Termorreceptores centrais localizados no hipotálamo são sensíveis a mudanças na temperatura corporal central e monitoram

efetivamente a temperatura local do cérebro. A informação desses receptores é mais importante do que a dos periféricos em promover resposta efetora apropriada designada para limitar aumentos adicionais na temperatura corporal. A área central de controle da atividade termofetora recebe também informações sensoriais não térmicas que são capazes de modular a regulação homeostática da temperatura corporal. Estas outras informações incluem sinais nervosos de osmoreceptores e receptores de pressão, sendo assim mudanças na osmolaridade plasmática e volume sanguíneo afetam a sudorese e a resposta da vasodilatação cutânea ao aumento na temperatura central. Alguns hormônios (ex. estrógeno) e citocinas (ex. interleucina-1) também influenciam as respostas termoregulatórias (FIGURA 5) (Gleeson, 1998).

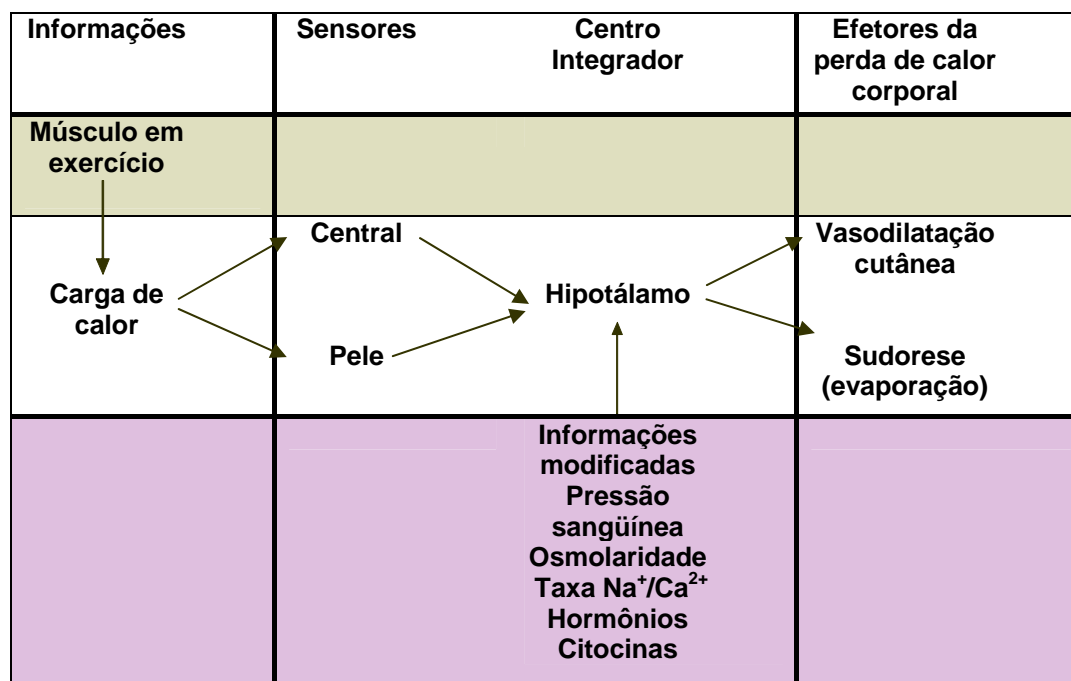


FIGURA 5. Resumo da termorregulação durante o exercício em ambiente termoneutro [adaptado de Gleeson, 1998].

Consumo de oxigênio e eficiência mecânica durante o exercício

Durante o exercício, o consumo de oxigênio é um importante parâmetro no trabalho físico que reflete tanto o desempenho do esforço físico quanto a eficiência mecânica (Brooks & White, 1978; Sonne & Galbo, 1980).

A mensuração do gasto energético em repouso e durante o exercício é possível utilizando-se a calorimetria direta e indireta. A calorimetria direta utiliza a mensuração da produção de calor como um indicador de taxa metabólica. A calorimetria indireta estima a taxa metabólica por meio da mensuração do consumo de oxigênio, uma vez que todas as reações que liberam energia no corpo dependem essencialmente de oxigênio.

A eficiência da energia utilizada durante o exercício para realizar trabalho externo gira em torno de ~20-27 %, ao passo que a produção de trifosfato de adenosina (ATP) restante é utilizada para a homeostase corporal ou dissipada como calor (FIGURA 6) (Brooks et al, 1984).

$$\text{Eficiência mecânica} = \frac{\text{Trabalho}}{\text{Dispêndio de energia}} \times 100$$

FIGURA 6. Determinação da eficiência mecânica.

Ao realizar um exercício numa velocidade constante, o consumo de oxigênio aumenta exponencialmente nos primeiros minutos de exercício (componente rápido da cinética do consumo de oxigênio) até alcançar um platô (Barstow, 1994). A seguir permanece relativamente estável durante toda a duração do exercício. Estado estável reflete um equilíbrio entre a energia de que os músculos ativos necessitam e a produção de trifosfato de adenosina (ATP) no metabolismo aeróbico. Nesta fase de exercício, as reações que consomem oxigênio fornecem a energia para o exercício (FIGURA 4). Durante este período, ocorre também um equilíbrio na taxa de renovação do lactato produzido que será oxidado ou transformado em glicose pelo ciclo de Cori no fígado. Entretanto, o consumo de oxigênio na fase estável do exercício apresenta um segundo aumento. Esse fenômeno é chamado de componente lento da cinética do consumo de oxigênio e representa um aumento no consumo de oxigênio sem modificações no trabalho, sugerindo uma possível redução na eficiência mecânica nesta fase do esforço (Schrauwen & Hesselink, 2003).

Óxido nítrico

O óxido nítrico (NO), um radical livre gasoso altamente difusível, tem emergido como uma molécula mensageira importante que apresenta papéis fisiológicos múltiplos. A sua produção é catalisada pela enzima denominada sintase do óxido nítrico (NOS) durante a conversão de L-arginina para L-citrulina. O NO exerce a maior parte de suas ações ativando a guanilato ciclase solúvel e aumentando conseqüentemente os níveis do mediador cíclico intracelular GMP (cGMP) em

vários tecidos, incluindo o sistema nervoso central (SNC) (Dawson & Snyder, 1994; Moncada et al., 1991; Traystman et al., 1995) (FIGURA 7).

Há duas diferentes classes da NOS: a forma induzível e a constitutiva. As isoformas endotelial (eNOS) e neuronal (nNOS) são classificadas como constitutivas. Elas se expressam respectivamente em células endoteliais vasculares e células do sistema nervoso central e periférico. A isoforma induzível (iNOS) torna-se expressa em macrófagos e presumivelmente em outros tipos celulares nucleados, incluindo células não neuronais do SNC, em resposta a citocinas e pirogênicos exógenos (Bredt et al., 1991).

Diferente dos neurotransmissores convencionais, o óxido nítrico simplesmente difunde nas terminações nervosas formando ligações covalentes com alvos potenciais, o qual inclui a guanilato ciclase solúvel. A sua ação é finalizada pela sua difusão para longe do seu alvo, sendo convertido em Nitrito/Nitrato (Dawson & Snyder, 1994).

Uma substância análoga à L-arginina, éster metil *N*^o-nitro-L-arginina (L-NAME), tem sido utilizada como bloqueadora inespecífica de óxido nítrico para a investigação do papel do óxido nítrico na termorregulação (Almeida & Branco, 2001; De Paula et al., 2000; Steiner et al., 2002).

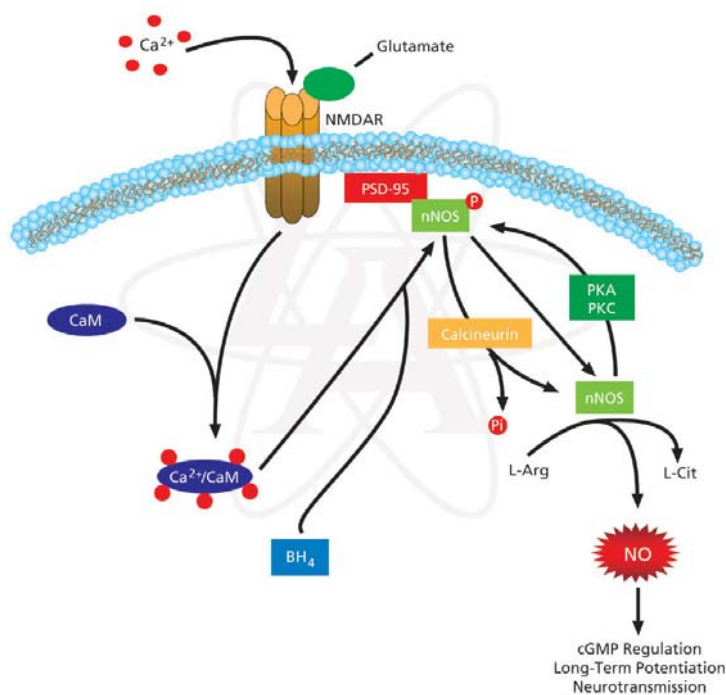


FIGURA 7. Esquema representando a formação de óxido nítrico catalisada pela isoforma neuronal da enzima sintase de óxido nítrico (nNOS). PSD-95 (proteína de densidade pós-sináptica), CaM (calmodulina), BH_4 (tetrahydrobiopterina), L-Arg (L-arginina), L-Cit (L-citrulina), PKA e PKC (proteína quinase A e C). [Dawson (1998)].

Óxido nítrico no sistema nervoso central

Vários estudos indicam que o óxido nítrico no sistema nervoso central exerce efeitos termorregulatórios, tais como: antipirese (Gourine, 1995; Moncada et al., 1991), hipotermia (Benamar et al., 2003; Branco et al., 1997; Almeida & Branco, 2001; Steiner et al., 1998) e febre (Lin & Lin, 1996; Lin & Lin, 1997). É importante enfatizar que esses estudos adotaram estratégias diferentes para avaliar o papel do óxido nítrico central, variando a espécie do animal experimental, a dose e a via de administração do pirogênico, bem como o inibidor do óxido nítrico utilizado.

Os estudos de Steiner & Branco (2002), Branco e colaboradores (1997), De Paula e colaboradores (2000) e Steiner e colaboradores (1998) mostram que a injeção intracerebroventricular (icv) de L-NAME causa um aumento na temperatura corporal de ratos indicando que o aumento nas concentrações de óxido nítrico no sistema nervoso central promove uma hipotermia devido à anapirexia (i.e., alteração do ponto de referência do controle da temperatura corporal).

Poucos estudos, dentro dos quais a disponibilidade de óxido nítrico foi modificada experimentalmente, apresentam o monitoramento dos efetores termoregulatórios autonômicos e da temperatura corporal simultaneamente (Eriksson et al., 1997; Mathai et al., 1997). Esses experimentos mostrados na FIGURA 8 indicam respostas de perda de calor coordenadas induzidas pelo óxido nítrico quando doadores de óxido nítrico são administrados no terceiro ventrículo cerebral (icv) ou intravenosamente (iv). Devido ao fato de as respostas termorregulatórias à aplicação da droga central ou periférica serem tão similares, a explicação mais provável seria que ambas foram mediadas centralmente. Entretanto, as respostas cardiovasculares foram diferentes dependendo da via de infusão do doador de óxido nítrico, sugerindo que o óxido nítrico agiu em diferentes alvos. A via intravenosa promoveu uma redução na pressão sanguínea e taquicardia e a via intracerebroventricular promoveu aumento na pressão arterial e bradicardia.

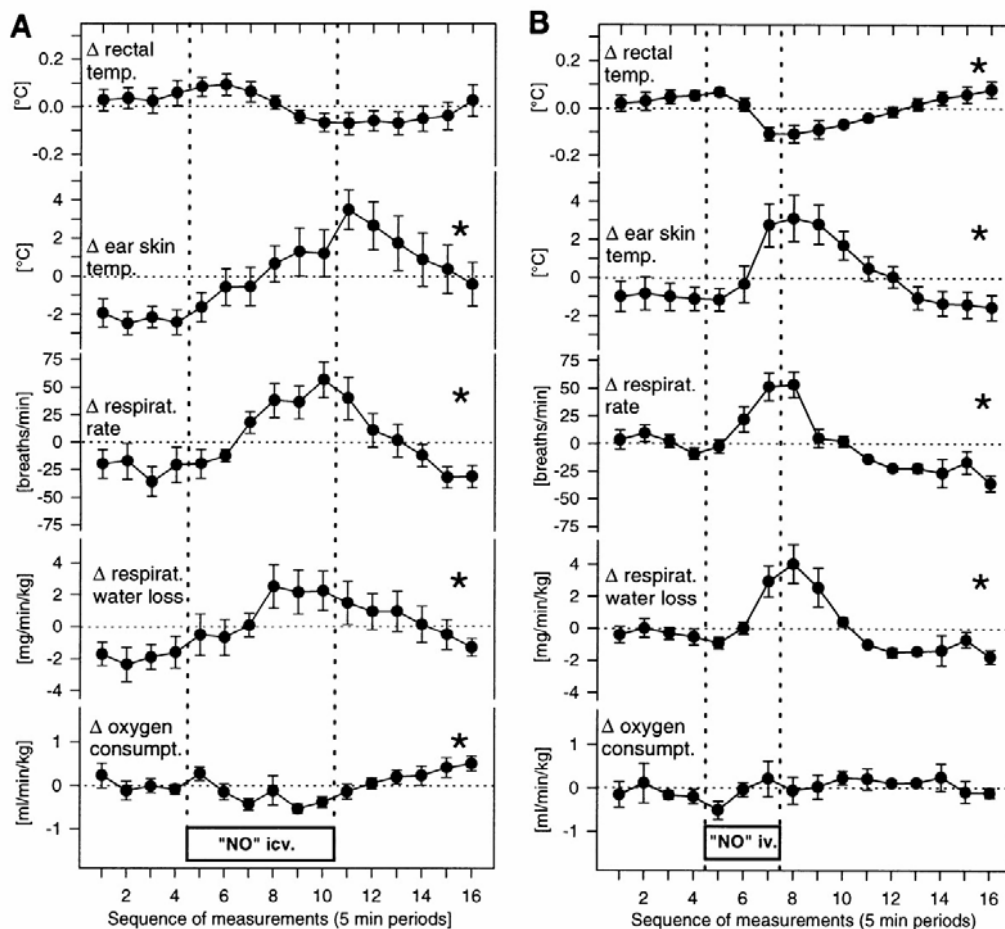


FIGURA 8. Efeitos dos doadores de óxido nítrico na regulação da temperatura: A: infusão de 3-morfolinossidnonimina (SIN-1) no terceiro ventrículo cerebral [22-45 nmol/min durante 30 min (Eriksson et al., 1997)]. B: infusão intravenosa de SIN-1 or S-nitroso-N-acetilpenicilamina [SNAP; 75 mmol.min⁻¹.kg⁻¹ durante 15 min (Mathai et al., 1997)] nos parâmetros termorregulatórios medidos em coelhos conscientes expostos a uma carga de calor externa intermediária (temperatura ambiente 24°C). Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão. Foram colhidas 16 medidas consecutivas com intervalo de 5 min entre as mesmas, iniciadas 20 min antes do início da infusão de doador de óxido nítrico. *efeito significativo do tratamento (ANOVA).

O óxido nítrico no SNC reduz o tônus simpático agindo em várias áreas cerebrais, incluindo o núcleo paraventricular, hipotálamo posterior e o núcleo do trato solitário (Krukoff, 1999; Goodson et al., 1994). Como as eferências simpáticas têm um papel importante, tanto na termogênese do tecido adiposo marrom, quanto na vasoconstrição do leito vascular superficial (Foster & Frydman, 1979;

Nagashima et al., 1994; Gerstberger, 1999), essas respostas contribuem para um aumento na temperatura corporal. Diante disso, seria pertinente propor o óxido nítrico central como responsável pelo tônus inibitório no sistema nervoso autônomo simpático.

Em situações de febre induzida por interleucina-1 (IL-1), lipopolisacarídeos (LPS) ou estresse psicológico, a injeção icv de L-NAME acentua a resposta febril em ratos. Esse efeito reforça a hipótese de que o óxido nítrico age como um fator antipirético endógeno no sistema nervoso central (De Paula et al., 2000; Sanches et al., 2003; Perotti et al., 1999; Steiner & Branco, 2001). O estudo de Steiner et al. (2002) aponta a região pré-óptica anteroventral como provável área responsável pelo papel antipirético da via NO-cGMP. Entretanto, essa evidência não exclui que o NO poderia exercer também um efeito pirético em outras áreas do cérebro como no organum vasculosum da lâmina terminal (OVLT) (Lin & Lin, 1996; Lin & Lin, 1997) que é um sítio importante de sinalização de pirogênicos circulantes no cérebro.

A marcação da enzima NADPH-diaforase em cortes coronais de cérebro de ratos expostos ao calor (2 dias, 34°C) mostra a expressão da isoforma neuronal da enzima sintase do óxido nítrico (nNOS) no organum vasculosum da lâmina terminal (OVLT) e na área pré-óptica ventromedial (VMPO), implicando um papel termorregulatório específico para estes sistemas nitrérgicos locais (Gerstberger, 1999). Além da grande atividade da nNOS, estruturas hipotalâmicas anteriores envolvidas na termorrecepção e integração, como a área pré-óptica

medial (MPO) e a área pré-óptica ventromedial (VMPO), mostraram aumentos de 5 a 9 vezes, respectivamente, no número de núcleos celulares imunopositivos à proteína Fos após dois dias de exposição, indicativo de ativação neuronal induzida. Essa responsividade sugere especificidade funcional da ativação da Fos e da nNOS (Gerstberger, 1999).

Óxido nítrico durante o exercício

O papel do óxido nítrico periférico durante o exercício

Há relatos na literatura de que a inibição da NOS periférica, via L-NAME, diminui a taxa de sudorese e aumenta as temperaturas central e periférica desajustando a termorregulação durante o exercício físico em cavalos (Mills et al., 1999; Mills et al., 1997). O mecanismo responsável por essa redução na taxa de sudorese pelo L-NAME está relacionado com vasoconstrição periférica, uma vez que o limiar para a sudorese se correlaciona com fluxo sanguíneo cutâneo (Rowell, 1986). O óxido nítrico, que é amplamente conhecido como fator de relaxamento do endotélio, regula o fluxo sanguíneo regional da musculatura lisa do leito vascular, induzindo vasodilatação e opondo-se à resposta pressórica (Gardiner et al., 1990; Moncada et al., 1991). Entretanto, a redução da taxa de sudorese pelo L-NAME envolve o controle neurogênico simpático periférico e/ou central da sudorese (Mills et al., 1997).

A inibição do óxido nítrico periférico com L-NAME, durante o exercício, aumenta as concentrações plasmáticas de lactato (Mills et al., 1999) e acelera a cinética do consumo de oxigênio tecidual (Kindig et al., 2001; Kindig et al., 2002; Jones et al., 2004). Essas ações reduzem a tolerância ao exercício e promovem um grande desequilíbrio hemodinâmico (redução do débito cardíaco e do transporte de oxigênio) (Kindig et al., 2002; Kindig et al., 2000). Outro papel do óxido nítrico periférico no exercício é a estimulação da utilização de glicose no músculo esquelético por um mecanismo distinto das vias de insulina e contração (Etgen et al., 1997; Higaki et al., 2001; Roberts et al., 1997). Esse aumento na utilização de glicose no músculo esquelético pelo óxido nítrico periférico tem sido atribuído à regulação no fluxo de nutrientes, bem como a um possível aumento na translocação da proteína transportadora GLUT4 para o sarcolema e túbulos transversos do músculo esquelético durante o exercício melhorando o transporte de glicose pela membrana (Rose & Richter, 2005).

O papel do óxido nítrico central durante o exercício

Como mencionado anteriormente, os estudos mostram que a inibição da produção de óxido nítrico icv acentua a febre induzida por IL(1), LPS ou pelo estresse psicológico. Entretanto, não há relatos na literatura com relação a outras situações onde ocorrem elevações da temperatura corporal, como o exercício físico. Levando em consideração o envolvimento do óxido nítrico central na regulação da temperatura corporal, foram realizados os experimentos descritos a seguir, para avaliar o papel do óxido nítrico central na regulação da temperatura corporal durante o exercício físico.

Objetivos

Objetivo geral

Investigar o papel do óxido nítrico central na produção e na dissipação de calor durante o exercício físico agudo e sua contribuição para o mecanismo de fadiga central.

Objetivos específicos

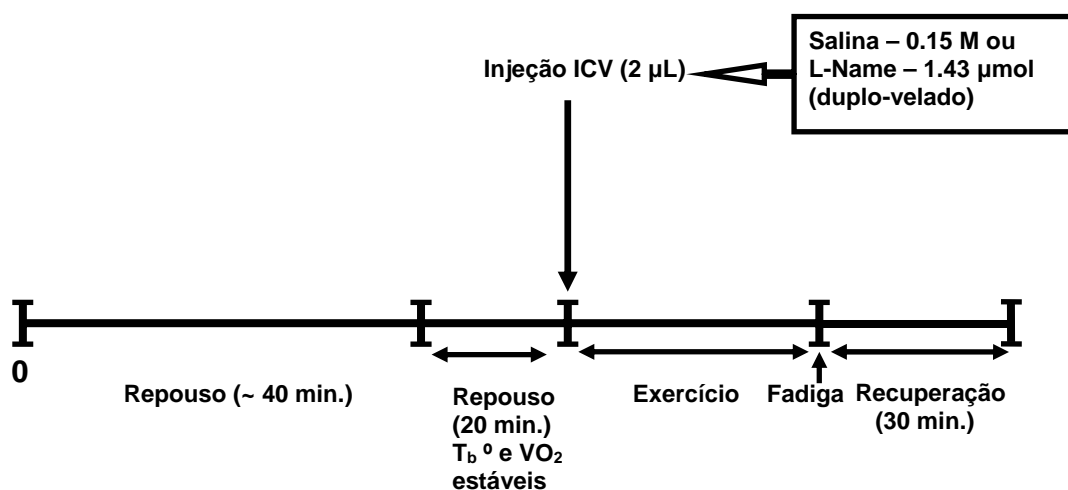
- 1) Estudar os efeitos da injeção intracerebroventricular de L-NAME, inibidor da enzima sintase de óxido nítrico, sobre as respostas termorregulatórias em ratos não treinados submetidos ao exercício físico agudo submáximo e procurar relacioná-las com a indução da fadiga central.
- 2) Estudar os efeitos da injeção intracerebroventricular de L-NAME sobre a taxa metabólica e a eficiência mecânica em ratos não treinados submetidos a exercício físico agudo submáximo e procurar relacioná-las com a indução da fadiga central.
- 3) Estudar os efeitos da injeção intracerebroventricular de L-NAME sobre o fluxo de substrato energético em ratos não treinados submetidos a exercício físico agudo progressivo até a fadiga.

Modelos Experimentais e Parâmetros Analisados

Foram utilizados ratos Wistar (200-340 g) mantidos individualmente em gaiolas com ciclo de luz: escuro de 14:10 hs e com livre acesso a água e ração. Após anestesia com 2,2,2-tribromoetanol (300 mg/kg de peso corporal ip), os ratos foram fixos a um aparato estereotáxico (David Kopf Instruments, M-900, Tujunga, CA, USA) e uma cânula guia (22 G) foi implantada no ventrículo cerebral lateral direito utilizando as coordenadas estereotáxicas: -1.5 mm antero-posterior, 2.5 mm lateral e 3.0 mm vertical acima da base do crânio (De Groot, 1959). A confirmação da cânula no espaço ventricular foi feita com o uso de um manômetro preenchido com salina fixo à cânula. A redução da pressão no manômetro confirmava a presença da cânula no ventrículo cerebral lateral direito (Antunes-Rodrigues et al., 1970). Todos os animais se recuperavam por pelo menos 1 semana antes de serem submetidos aos experimentos propriamente dito. Os ratos foram familiarizados ao exercício na esteira durante 4 a 5 dias consecutivos. O período de familiarização dos experimentos 1 e 2, que foi de 4 dias consecutivos, constituiu de exercício a $18 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$, com a esteira inclinada a 5%, tendo cada sessão a duração de 5 min. No experimento 3, a familiarização foi de 5 dias consecutivos, tendo cada sessão a duração de 5 min. A esteira foi mantida a 10% de inclinação nos dias de familiarização e a velocidade nos dois primeiros dias foi de $10 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$. No terceiro dia a velocidade foi $11 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$, no quarto dia $13 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$ e no quinto dia $15 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$. A proposta desse exercício preliminar foi orientar o animal em qual direção correr e prevenir resposta hipertérmica condicionada. Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética para Experimentos com Animais da Universidade Federal de

Minas Gerais e foram realizados de acordo com as normas descritas no Manual desse Comitê (protocolo 012/05).

Os experimentos 1 e 2 foram conduzidos seguindo o diagrama ilustrado abaixo:



No dia do experimento, os animais permaneciam em repouso por um período de 60 minutos na esteira para roedores antes de serem submetidos ao teste. Uma agulha (30 G) 0.3 mm maior do que a cânula guia foi introduzida no ventrículo cerebral lateral direito. Essa agulha estava conectada à seringa Hamilton.

Imediatamente antes do exercício, 2.0 µL de 0.15 M NaCl (n=6) ou 2.0 µL de L-NAME (1.43 µmol, n=6) foram injetados no ventrículo lateral direito. A dose do L-NAME cerebral foi baseada nos resultados do nosso experimento prévio que mostrou que a resposta da redução no percentual do trabalho realizado durante o exercício, relativo ao grupo salina, foi claramente dose-dependente (Lacerda et al., 2005). Os animais receberam aleatoriamente e de forma duplo-velado solução salina ou L-NAME.

Imediatamente após as injeções, os animais foram submetidos ao exercício físico na esteira até a instalação da fadiga. Após a fadiga, os ratos permaneciam durante 30 minutos recuperando-se na esteira. Fadiga foi definida como o momento no qual o animal não era mais capaz de manter o ritmo na esteira (Rodrigues et al., 2004).

O registro das variáveis estudadas foi realizado em repouso, a cada minuto do exercício, no momento da fadiga e durante os 30 minutos de recuperação.

Exercício físico submáximo até a fadiga

Esse exercício foi realizado em uma esteira metabólica (Columbus Instruments, OH, USA, esteira modular para roedores). A intensidade do exercício (18 m.min⁻¹ e 5% de inclinação) corresponde a um consumo de oxigênio de ~ 66% do consumo máximo de oxigênio (Brooks & White, 1978; Hussain et al., 2001). A fadiga foi definida como o ponto no qual os animais não eram mais capazes de manter a cadência na esteira (American Physiological Society, 2006; Rodrigues et al., 2004; Soares et al., 2003).

- Variável de desempenho físico mensurada diretamente:
 - ***Tempo para a fadiga*** (TTF; min).

- Variável de desempenho físico calculada:
 - ***Trabalho*** (W; kgm) – foi calculado como $W = [\text{peso corporal (kg)}] \cdot [\text{TTF}] \cdot [\text{velocidade na esteira (m.min}^{-1}\text{)}] \cdot [\text{seno } \theta \text{ (inclinação na esteira)}]$, onde TTF é tempo até a fadiga (Brooks et al., 1984; Brooks & White, 1978; Lima et al., 2001).

Experimento 1

- Variáveis mensuradas diretamente:
 - *Temperatura retal* (T_b ; °C) – utilização de uma sonda modelo 401 (Yellow Springs Instruments, USA);
 - *Temperatura da pele da cauda* (T_{skin} ; °C) – utilização de um sensor série 409-B (Yellow Springs Instruments, USA).

- Variáveis calculadas:
 - *Taxa de aquecimento corporal* (BHR; °C.min⁻¹); i.e. taxa de aumento na temperatura corporal, foi calculada como:
$$BHR = \Delta T_b / (\text{intervalo de tempo de corrida}),$$
 onde ΔT_b é a variação na temperatura corporal (temperatura corporal no ponto da fadiga – temperatura corporal inicial medida antes do exercício);
 - *Armazenamento de calor* (HS; cal) – foi calculado como:
$$HS = (\Delta T_b).m.c,$$
 onde “m” é o peso corporal em gramas e “c” é o calor específico dos tecidos corporais (0.826 cal.g⁻¹.°C⁻¹) (Gordon, 1990).

Experimento 2

- Variável mensurada diretamente:
 - *Consumo de oxigênio* (VO_2 ; $\text{mL.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$) – foi mensurado por um calorímetro indireto de fluxo aberto (Columbus Instruments) calibrado antes de cada uso com uma mistura padrão de gases (20.5% O_2 e 0.5% CO_2). Os dados eram registrados on-line utilizando um sistema computadorizado (Oxymax Apparatus, Columbus Instruments).

- Variável calculada:
 - *Eficiência mecânica* (ME; %) – foi calculada pela fórmula:
$$\text{ME} = [\text{W (kgm)} / \text{custo energético (kgm)}] \times 100.$$

Experimento 3

No dia do experimento, os animais permaneciam em repouso por um período de 60 minutos na esteira para roedores antes de serem submetidos ao teste. Uma agulha (30 G) 0.3 mm maior do que a cânula guia foi introduzida no ventrículo cerebral lateral direito. Essa agulha estava conectada à seringa Hamilton.

Imediatamente antes do exercício, 2.0 μL de 0.15 M NaCl (n=6) ou 2.0 μL de L-NAME (1.43 μmol , n=6) foram injetados no ventrículo cerebral lateral direito.

Os animais receberam aleatoriamente e de forma duplo-velado solução salina ou L-NAME. Imediatamente após as injeções, os animais foram submetidos ao exercício físico na esteira até a instalação da fadiga.

Exercício físico progressivo até a fadiga

Esse exercício foi realizado em uma esteira metabólica (Columbus Instruments, OH, USA, esteira modular para roedores) com uma inclinação de 10°. Os ratos começaram a exercitar numa velocidade de 10 m.min⁻¹ com aumento de 1 m.min⁻¹ a cada 3 minutos até a fadiga. A fadiga foi definida como o ponto no qual os animais não eram mais capazes de manter a cadência na esteira (American Physiological Society, 2006; Rodrigues et al., 2004; Soares et al., 2003).

Amostras de sangue (0.3 mL) foram colhidas em repouso, utilizando um cateter inserido na veia jugular (Harms & Ojeda, 1974), antes da infusão intracerebroventricular de L-NAME ou salina, após o início do exercício (3, 6, 9, 12, 15 e 21 min) e no momento da fadiga. O volume sanguíneo colhido em cada amostra foi repostado pelo sangue de um animal doador normal para evitar redução no volume sanguíneo do animal. As amostras de sangue foram centrifugadas e o plasma separado. As amostras de plasma foram então congeladas (-20 °C) até a análise bioquímica.

- Variável de desempenho físico mensurada diretamente:
 - ***Tempo para a fadiga*** (TTF; min).

- Variável de desempenho físico calculada:
 - **Trabalho** (W; kgm) – foi calculado como $W = [\text{peso corporal (kg)}] \cdot [\text{TTF}] \cdot [\text{velocidade na esteira (m.min}^{-1}\text{)}] \cdot [\text{seno } \theta \text{ (inclinação na esteira)}]$, onde TTF é tempo até a fadiga (Brooks et al., 1984; Brooks & White, 1978; Lima et al., 2001).

- Análise bioquímica do plasma:
 - **Concentrações plasmáticas de glicose e lactato** (mM) – foi utilizado o método enzimático de glicose e lactato oxidase (Glucose Analyser YSI 300 Plus)
 - **Concentração plasmática de ácidos graxos livres** (mM) – foi utilizado o método espectrofotométrico (WACO kit).

Resultados Alcançados

Demonstramos que a via do óxido nítrico é um importante modulador da perda de calor durante o exercício em ratos [Brain Research Bulletin 67 (2005) 110-116]

Para avaliar o papel do óxido nítrico (NO) nos mecanismos termorregulatórios durante o exercício, 1.43 μmol (2 μl) de éster metil $N^{\text{º}}$ -nitro-L-arginina (L-NAME, n=6), um inibidor da NO sintase, ou 2 μl de 0.15 M NaCl (SAL, n=6) foi injetado no ventrículo cerebral lateral de ratos Wistar machos imediatamente antes dos animais começarem a correr (18m/min, 5% inclinação). As temperaturas retal e da cauda foram medidas. A taxa de aquecimento corporal, o limiar da temperatura central para vasodilatação da cauda e o trabalho realizado foram calculados. Durante os 11 minutos iniciais de exercício, houve um maior aumento na temperatura central no grupo tratado com L-NAME do que no grupo SAL (taxa de aquecimento corporal = $0.17 \pm 0.02 \text{ } ^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$, L-NAME vs $0.09 \pm 0.01 \text{ } ^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$, Sal, $p < 0.05$). Após os 11 minutos iniciais até ~40 minutos de exercício, os níveis de temperatura central estavam estáveis em ambos os grupos, mas os níveis permaneceram mais altos no grupo tratado com L-NAME do que no grupo SAL ($39.16 \pm 0.04 \text{ } ^\circ\text{C}$, L-NAME, vs $38.33 \pm 0.02 \text{ } ^\circ\text{C}$, Sal, $p < 0.01$). Entretanto, o exercício induziu a um aumento adicional na temperatura central no grupo SAL antes da ocorrência da fadiga. Esses resultados sugerem que o menor trabalho desenvolvido pelos ratos tratados com L-NAME ($10.8 \pm 2.0 \text{ kgm}$, L-NAME vs $25.0 \pm 2.1 \text{ kgm}$, Sal, $p < 0.01$) estava inversamente relacionado com a taxa de aquecimento corporal aumentada nos animais tratados com L-NAME observada durante os 11 minutos iniciais

de exercício ($r=0.74$, $p<0.01$) devido a mudanças no limiar da temperatura central para a vasodilatação da cauda (39.12 ± 0.24 °C, L-NAME vs 38.27 ± 0.10 °C, Sal, $p<0.05$). Finalmente, os nossos dados sugerem que a via do óxido nítrico central modula mecanismos de dissipação de calor durante o exercício por um mecanismo inibitório.

Evidências de que a inibição do óxido nítrico central reduz a eficiência mecânica, antecipando a fadiga [Neuroscience Letters 393 (2006) 260-263]

Para avaliar o papel do óxido nítrico (NO) nos mecanismos termorregulatórios durante o exercício, 1.43 μmol (2 μl) de éster metil *N*^o-nitro-L-arginina (L-NAME, n=6), um inibidor da NO sintase, ou 2 μl de 0.15 M NaCl (SAL, n=6) foi injetado no ventrículo cerebral lateral de ratos Wistar machos imediatamente antes dos animais começarem a correr (18m/min, 5% inclinação). O consumo de oxigênio foi medido em repouso, durante o exercício até a fadiga e subseqüentemente durante os 30 minutos de recuperação usando um sistema de calorimetria indireta. A eficiência mecânica também foi calculada durante o período da corrida. Durante os primeiros 11 minutos de exercício, houve um aumento similar no consumo de oxigênio, ao passo que a eficiência mecânica permaneceu a mesma em ambos os grupos. Depois disso, o consumo de oxigênio ficou estável no grupo SAL, mas continuou a aumentar permanecendo mais alto no grupo L-NAME até a instalação da fadiga. Os ratos tratados com L-NAME apresentaram também uma redução significativa na eficiência mecânica comparado com os animais tratados com SAL. Além disso, houve uma redução significativa no trabalho desenvolvido pelos animais tratados com L-NAME comparado com os animais tratados com SAL. Isso sugere que o bloqueio do óxido nítrico central aumenta o gasto metabólico durante o exercício, reduz a eficiência mecânica e o desempenho de corrida em ratos.

Evidências de que a inibição do óxido nítrico central modifica os ajustes metabólicos induzidos pelo exercício físico em ratos [Neuroscience Letters, em processo de análise pela revista]

A influência do sistema nervoso central na função metabólica é de interesse em situações que desviam do estado basal, como durante o exercício. Nossos estudos prévios demonstraram que o bloqueio do óxido nítrico aumenta a taxa metabólica, reduzindo a eficiência mecânica durante o exercício físico em ratos. Para avaliar o papel do óxido nítrico cerebral (NO) nas concentrações plasmáticas de glicose, lactato e ácidos graxos livres de ratos submetidos a um protocolo de exercício físico progressivo na esteira até a fadiga, 1.43 μmol (2 μL) de éster metil *N*^o-nitro-L-arginina (L-NAME, n=6), um inibidor da NO sintase, ou 2 μL de 0.15 M NaCl (SAL, n=6) foram injetados no ventrículo cerebral lateral de ratos Wistar machos imediatamente antes dos animais começarem a se exercitar (iniciando a 10 m/min, com aumento de 1 m/min a cada 3 minutos até a fadiga, 10% de inclinação). Amostras de sangue foram colhidas por meio de um cateter inserido e mantido cronicamente na veia jugular em repouso e durante o exercício até a fadiga. Durante o exercício, os animais tratados com L-NAME tiveram as seguintes respostas metabólicas comparado com o controle: 1) uma resposta hiperglicêmica aumentada durante os primeiros 60% do trabalho máximo; 2) níveis plasmáticos de lactato mais altos; 3) um aumento transitório significativo nas concentrações plasmáticas de ácidos graxos livres durante a fase dinâmica do exercício, retornando aos níveis basais mais cedo do que o controle durante a fase estável do exercício. Além disso, os ratos tratados com L-NAME fadigaram mais cedo do que os animais do grupo controle. Os dados indicam que a inibição do sistema nitrérgico

cerebral, induzido pelo tratamento intracerebroventricular com L-NAME, modificou os mecanismos neurais que regulam a mobilização plasmática de glicose e ácidos graxos livres durante o exercício em ratos.

Central nitric oxide inhibition modifies metabolic adjustments induced by exercise in rats

Ana Cristina R. Lacerda; Umeko Marubayashi; Cláudio H. Balthazar; Laura H. R. Leite; Cândido C.

Coimbra*

*Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas
Gerais, 31270-901 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil*

*Address for correspondence: Cândido C. Coimbra, Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas/UFMG, Av. Antônio Carlos, 6627, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil.
Telephone: +55 (031) 34992936. Fax: +55 (031) 34992924

E-mail:coimbrac@icb.ufmg.br

Number of text pages of the whole manuscript: 12

Number of figures: 02

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank CNPq, CAPES, and FAPEMIG for financial support. The technical assistance of Mr. André Luis Pimenta de Faria is also acknowledged.

ABSTRACT

The influence of the central nervous system on metabolic function is of interest in situations deviating from basal states, such as during exercise. Our previous study in rats demonstrated that central nitric oxide blockade increases metabolic rate, reducing mechanical efficiency during exercise. To assess the role of brain nitric oxide (NO) in the plasma glucose, lactate and free fatty acids concentrations of rats submitted to an incremental exercise protocol on a treadmill until fatigue, 1.43 μmol (2 μl) of *N*^o-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, n=6), a NO synthase inhibitor, or 2 μl of 0.15 M NaCl (SAL, n=6) was injected into the lateral cerebral ventricle (icv) of male Wistar rats immediately before exercise (starting at 10 m/min, with increments of 1 m/min every 3 minutes until fatigue, 10% inclination). Blood samples were collected through a chronic jugular catheter at rest and during exercise until fatigue. During exercise, the L-NAME-treated animals had the following metabolic response compared to controls: 1) an increased hyperglycemic response during the first 60% of time to fatigue; 2) higher plasma lactate levels; and 3) a significant transitory increase in plasma free fatty acids (FFA) during the dynamic phase of exercise that returned to basal levels earlier than controls during the steady state phase of exercise. In addition L-NAME-treated rats fatigued earlier than controls. The data indicate that the inhibition of the brain nitrenergic system induced by icv L-NAME treatment disrupted the accuracy of the neural mechanism that regulates plasma glucose and free fatty acid mobilization during exercise in rats.

Key Words: Exercise, Glucose, Lactate, Free Fatty Acids, Fatigue.

The central regulation of hepatic glucose production, catecholamine outflow from the adrenal medulla, and the mobilization of free fatty acid (FFA) from the adipose tissue during exercise have been shown to be mediated by direct sympathetic innervation [7, 14]. In such cases, during exercise, the sympathetic drive acts redundantly together with some hormones to increase FFA mobilization, to stimulate liver glycogenesis and glycogenolysis, as well as to inhibit peripheral glucose uptake, thus conserving blood glucose, and inducing FFA utilization as energetic fuel [4].

In our previous study, intracerebroventricular (icv) infusion of L-NAME [N^{ω} -nitro-L-arginine methyl ester – a nitric oxide synthase (NOS) blocker] induced a significant increase in metabolic rate and a decrease in mechanical efficiency, reducing running performance in rats [12]. However, we do not know whether fuel sources were also altered with the higher metabolic rate as a result of L-NAME-treated rats. Matsumura et al. (1998) demonstrated that intracerebroventricular infusion of L-NAME increases plasma epinephrine and norepinephrine concentrations at rest, inducing hyperglycemia. They attributed these findings mainly to the enhanced sympathetic outflow. However, it is not known whether this central inhibitory effect on sympathetic outflow by brain NO would affect plasma glucose, lactate, and FFA levels during exercise in same extension as it did in metabolic rate [12]. Therefore the influence of the central nervous system on metabolic adjustments during exercise is of particular interest. Exercise represents a physiological state in which metabolic and hormonal adaptations are required to increase the supply of glucose and FFA levels to the working muscle and to maintain an adequate flow of glucose to the brain [6].

The aim of this study was to assess the effects of the central administration of the NOS inhibitor L-NAME on plasma glucose, lactate and FFA concentrations of untrained rats submitted to progressive exercise until fatigue.

Male Wistar rats (200-280 g) were individually housed under 14/10 hour, light-dark cycles and had free access to water and rat chow. Following anesthesia achieved using 2,2,2-tribromoethanol (300 mg/kg body weight ip), the rats were fixed to a stereotaxic apparatus (David Kopf Instruments, M-900, Tujunga, CA, USA) and a guide cannula (22 G) was implanted into the right lateral cerebral ventricle using a previously described technique [15, 20]. A chronic jugular vein catheter was also implanted into these animals as described previously [14]. All animals were allowed to recover for at least 1 week before being submitted to the experiments. The rats were familiarized with exercise on the motor-driven treadmill by running at 10% inclination for 5 minutes per day for the 5 consecutive days prior to the experiments. In the first and second day of familiarization, they exercised at a speed of 10 m.min⁻¹, while in the subsequent days of familiarization they exercised at a speed of 11, 13 and 15 m. min⁻¹ consecutively. The purpose of this preliminary exercise was to show the animals in which direction to run. All experiments were approved by the Ethics Committee for the Care and Use of Laboratory Animals at the Federal University of Minas Gerais and were carried out in accordance with the regulations described in the Committee's Guiding Principles Manual (protocol 012/05).

All the proceedings were carried out between 13:00 and 17:00 hours at a room temperature of 21±2 °C. On the day of the experiment, the animals were allowed to rest for 1 hour in the rodent treadmill chamber before being submitted to the test. A needle (30 G) protruding 0.3 mm from the tip of the guide cannula was introduced into the right lateral cerebral ventricle by connecting it to a Hamilton syringe. Immediately prior to

exercise, 2.0 μL of 0.15 M NaCl (n=6) or 2.0 μL of L-NAME (1.43 μmol , n=6) was injected into the right lateral ventricle. The dose of brain L-NAME was based on the results of our previous experiments that showed that the response of reduction in workload was clearly L-NAME dose-dependent [11]. Rats were randomly assigned to groups receiving either saline or L-NAME solution. Immediately after the injections, the animals were submitted to progressive running exercise until reaching fatigue.

Progressive work was performed on a motor-driven treadmill (Columbus Instruments, OH, USA, Modular Treadmill) at a constant slope of 10° . The rats started running at $10 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$ and treadmill speed was increased by $1 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$ every 3 minutes until fatigue. Fatigue was defined as the point at which the animals were no longer able to keep pace with the treadmill [25, 26]. Time to fatigue (minutes) and workload (kgm) were considered indexes of running performance.

During the experimental situation, blood samples (0.3 mL) were collected at rest, using a jugular vein catheter [8], before L-NAME or SAL intracerebroventricular infusion, at 3, 6, 9, 12, 15, and 21 minutes following initiation of exercise and at fatigue point. The blood volume collected in each sample was replaced by normal donated blood to avoid reduction in the blood volume of the animal. The blood samples were centrifuged and the plasma separated. The plasma samples were then frozen (-20°C) until biochemical analyses were carried out using the enzymatic method of glucose and lactate oxidase (Glucose Analyser YSI 300 Plus), and the spectrophotometric method of FFA (WACO kit).

Workload (W; kgm) was calculated as $W = \text{body weight (kg)} \times \text{TTF} \times \text{treadmill speed (m}\cdot\text{min}^{-1}) \times \text{sine } \theta$ (treadmill inclination) [1, 2, 15], where TTF is time to fatigue (minutes). The data are reported as mean \pm S.E.M. Differences between groups and the

effect of time were evaluated using the analysis of variance (ANOVA) test followed by the Newman-Keuls test. The data were also compared using paired or unpaired Student's *t*-test, as applicable.

Intracerebroventricular injection of L-NAME in untrained normal rats resulted in a marked decrease in workload (L-NAME: 6.0 ± 0.6 kgm vs SAL: 7.8 ± 0.6 kgm, $p < 0.01$) (Figure 1) and time to fatigue (L-NAME: 19.6 ± 2.5 min vs SAL: 23.3 ± 1.9 min, $p < 0.01$) compared to SAL-treated rats.

As seen in Figures 2A and 2D, exercise induced a rise in plasma glucose level in control animals, which was evident as early as 12 m/min (9 minutes of exercise) (2A) and 20% of maximal work (2D), and continued to rise until fatigue. L-NAME-treated rats also exhibited a gradual rise in plasma glucose concentration, however showing an increased hyperglycemic response compared to control animals during the first 60% of maximal work.

Plasma lactate level increased in both groups during the progressive exercise until fatigue. However, much higher values were recorded in L-NAME-treated rats during all the experimental protocol compared to SAL-treated animals (Figure 2B and 2E). The analysis under the lactate curve showed that plasma lactate accumulation during exercise in L-NAME-treated rats was ~25% higher than control ($p \leq 0.02$).

There was an increase in plasma FFA levels in the control animals that was only evident at 40% of maximal work. Thereafter, plasma FFA levels returned to basal values, remaining stable throughout the experiment. On the other hand, there was a marked increase in plasma FFA concentration in L-NAME-treated rats that was evident as early as 3 minutes (10 m/min) and started higher than control during the first 20% of maximal work. Furthermore, at this speed and at this stage in the exercise, the plasma FFA levels

of L-NAME-treated animals were ~15% higher than those of the controls ($p < 0.01$). Thereafter, plasma FFA level returned to basal values and remained stable throughout the experiment (Figure 2C e 2F).

The results of the present study show that inhibition of the nitric oxide (NO) pathway in the CNS by icv injection of L-NAME shifts the balance of substrate utilization during exercise. L-NAME treatment increased plasma glucose concentration and glycolytic flux as showed by the huge increased in plasma lactate accumulation. Furthermore, the inhibition of the brain nitrergic system promoted high levels of plasma free fatty acids in the initial 20% of maximal work. This data indicated an increased peripheral sympathetic outflow in the liver and adipose tissue. To the best of our knowledge, this is the first study describing the role of brain nitric oxide in the neural control of plasma glucose and lactate levels, and free fatty acid mobilization from adipose tissue during exercise.

It has generally been assumed that the regulation of energy metabolism during exercise is a very sensitive feedback mechanism that depends on the metabolic demands of the exercising muscles and the ambient glucose and free fatty acid concentrations in plasma [6]. Our results suggest that L-NAME injection into the cerebral ventricle disrupted the feedback control of plasma glucose, as well as of plasma free fatty acids when compared with control animals treated with saline. The metabolic profile observed after L-NAME injection indicates a defective feedback mechanism adjustment in these animals. Therefore, because of this increase in blood glucose and in free fatty acids, the reduction in running performance in L-NAME-treated rats would appear to be unrelated to availability of an energy substrate.

Interestingly, the high lactate concentration observed in L-NAME-treated rats was even higher than the lactate threshold described in the literature for running rats (3.0 mM to

4.0 mM for rats) at 80% of VO₂max [13, 19]. Such a high concentration indicates a new regulation point of the renovation rate of the plasma lactate. This shift in lactate during exercise is in agreement with the previous observations of an increased sympathoadrenal activity in L-NAME-treated rats [12].

The findings of various studies involving icv administration of NOS blockers [17, 18, 24] or administration within specific sites in the central nervous system (CNS) [18, 21], are all in general agreement with the view that the central nitric oxide (NO) system is inhibitory to overall sympathetic outflow. Matsumura et al. (1998) demonstrated that intracerebroventricular infusion of L-NAME increases epinephrine and norepinephrine plasmatic concentrations at rest, inducing hyperglycemia. They attributed these findings mainly to the enhanced sympathetic outflow. Our results are in agreement with the general idea that central NO plays a role in reducing sympathetic tonus. The hyperglycemia, increased plasma lactate concentration, and the high level of free fatty acids in the initial 20% of time to fatigue induced by L-NAME treatment support this hypothesis.

The exact location and precise pathways involved in the nitrenergic mediation of metabolic homeostasis during exercise still require clarification. However, hypothalamic regions expressing NOS, such as the preoptic area or paraventricular nucleus, are possible sites. It has been established that the POA/AH is an integrative region for the maintenance of metabolic, vasomotor and thermal homeostasis [3, 5, 9, 10, 22, 23]. However, further research is necessary to identify the exact location of nitrenergic mediation involved in normal metabolic homeostasis during exercise.

In summary, the results of this study indicate that central NO plays an important role in metabolic adjustment during exercise and that central blockage of nitric oxide synthase

by icv injection of L-NAME in rats induces increased glycolytic flux as shown by a higher lactate accumulation in plasma, and high levels of plasma free fatty acids in the initial stages of exercise.

REFERENCES

1. G.A. Brooks, C.M. Donovan, T.P. White, Estimation of anaerobic energy production and efficiency in rats during exercise, *J Appl Physiol.* 56 (1984) 520-525.
2. G.A. Brooks, T.P. White, Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise, *J Appl Physiol.* 45 (1978) 1009-1015.
3. C.C. Coimbra, R.H. Migliorin, Cold induced free fatty acid mobilization is impaired in rats with lesions in preoptic area, *Neurosci Lett.* 88 (1988) 1-5.
4. R.H. Coker, M. Kjaer, Glucoregulation during exercise: the role of the neuroendocrine system, *Sports Med.* 35 (2005) 575-583.
5. M.L. Ferreira, U. Marubayashi, C.C. Coimbra, The medial preoptic area modulates the increase in plasma glucose and free fatty acid mobilization induced by cold exposure, *Brain Res Bull.* 49 (1999) 189-193.
6. H. Galbo, Exercise physiology: humoral function, *Sport Sci Rev.* 1 (1992) 65-93.
7. H. Galbo, E.A. Richter, N.J. Christensen, J.J. Holst, Sympathetic control of metabolic and hormonal responses to exercise in rats, *Acta Physiol Scand.* 102 (1978) 441-449.

8. P.G. Harms, S.R.A. Ojeda, A rapid and simple procedure for chronic cannulation of rat jugular vein, *J Appl Physiol.* 36 (1974) 391-392.
9. H. Hasegawa, T. Ishiwata, T. Saito, T. Yazawa, Y. Aihara, R. Meeusen, Inhibition of the preoptic area and anterior hypothalamus by tetrodotoxin alters thermoregulatory functions in exercising rats, *J Appl Physiol.* 98 (2005) 1458-1462.
10. T. Ishiwata, H. Hasegawa, T. Yazawa, M. Otokawa, Y. Aihara, Functional role of the preoptic area and anterior hypothalamus in thermoregulation in freely moving rats, *Neurosci Lett.* 325 (2002) 167-170.
11. A.C.R. Lacerda, U. Marubayashi, C.H. Balthazar, C.C. Coimbra, Nitric oxide pathway is an important modulator of heat loss in rats during exercise, *Brain Res Bull.* 67 (2005) 110-116.
12. A.C.R. Lacerda, U. Marubayashi, C.H. Balthazar, C.C. Coimbra, Evidence that brain nitric oxide inhibition increases metabolic cost of exercise, reducing running performance in rats, *Neurosci Lett.* 393 (2006) 260-263.
13. J. Langfort, R. Zarzaczny, W. Pilis, H. Kaciuba-Uscilko, K. Nazar, S. Porta, Effect of sustained hyperadrenalinemia on exercise performance and lactate threshold in rats, *Comp Biochem Physiol A Physiol.* 114A (1996) 51-55.
14. N.R.V. Lima, C.C. Coimbra, U. Marubayashi, Effect of intracerebroventricular injection of atropine on metabolic responses during exercise in untrained rats. *Physiol Behav.* 64 (1998) 69-74.
15. N.R.V. Lima, W. Pereira, A.M. Reis, C.C. Coimbra, U. Marubayashi, Prolactin release during exercise in normal and adrenalectomized untrained rats

- submitted to central cholinergic blockade with atropine, *Horm Behav.* 40 (2001) 526-532.
16. K. Matsumura, I. Abe, T. Tsuchihashi, M. Fujishima, Central nitric oxide attenuates the baroreceptor reflex in conscious rabbits, *Am J Physiol.* 274 (1998) 1142-1149.
 17. M. Monda, S. Amaro, A. Sullo, B. De Luca, Nitric oxide reduces body temperature and sympathetic input to brown adipose tissue during PGE1-hyperthermia, *Brain Res Bull.* 38 (1995) 489-493.
 18. K.P. Patel, Y. Li, Y. Hirooka, Role of nitric oxide in central sympathetic outflow, *Exp Biol Med.* 226 (2001) 814-824.
 19. W. Pilis, R. Zarzeczny, J. Langfort, H. Kaciuba-Uscilko, K. Nazar, J. Wojtyna, Anaerobic threshold in rats, *Comp Biochem Physiol Comp Physiol.* 102A (1993) 285-289.
 20. A.G. Rodrigues, N.R.V. Lima, C.C. Coimbra, U. Marabayashi, Intracerebroventricular physostigmine facilitates heat loss mechanisms in running rats, *J Appl Physiol.* 97 (2004) 333-338.
 21. W.A. Saad, I.F.M.S. Guarda, L.A.A. Camargo, G. Garcia, L.I. Gutierrez, W.A. Saad, S. Simões, R. Guarda, Lateral hypothalamus lesions influences water and salt intake, and sodium and urine excretion, and arterial blood pressure induced by L-NAME and FK 409 injections into median preoptic nucleus in conscious rats, *Life Sci.* 75 (2004) 685-697.
 22. G.L. Santos, J.V.P. Leite, C.C. Coimbra, Metabolic adjustments induced by exposure to elevated ambient temperature is impaired in rats bearing lesions in the preoptic area, *Braz J Med Biol Res.* 23 (1990) 831-834.

23. G.L. Santos, J.V.P. Leite, C.C. Coimbra, Metabolic adjustment during adaptation to high ambient temperature in preoptic-lesioned rats, *Braz J Med Biol Res.* 24 (1991) 1169-1172.
24. E. Simon, Nitric oxide as a peripheral and central mediator in temperature regulation, *Amino Acids.* 14 (1998) 87-93.
25. D.D. Soares, N.R.V. Lima, C.C. Coimbra, U. Marubayashi, Evidence that tryptophan reduces mechanical efficiency and running performance in rats, *Pharmacol Biochem Behav.* 74 (2003) 357-362.
26. D.D. Soares, N.R.V. Lima, C.C. Coimbra, U. Marubayashi, Intracerebroventricular tryptophan increases heating and heat storage rate in exercising rats, *Pharmacol Biochem Behav.* 78 (2004) 255-261.

FIGURE LEGENDS

FIG. 1. Effect of icv injection of L-NAME (1.43 μmol / 2 μL) or 0.15 M NaCl (2 μL , SAL) on workload until fatigue. n=6 in each group. *Significantly different from the control group ($p<0.05$).

FIG. 2. Effect of icv injection of L-NAME (1.43 μmol / 2 μL) or 0.15 M NaCl (2 μL , SAL) on increase in plasma glucose (A and D; Basal level - L-NAME: 5.4 ± 0.2 mM vs SAL: 5.8 ± 0.2 mM), lactate (B and E; Basal level - L-NAME: 1.9 ± 0.3 mM vs 1.8 ± 0.1 mM), and free fatty acid concentrations (C and F; Basal level - L-NAME: 0.46 ± 0.05 mM vs SAL: 0.66 ± 0.10 mM). On the left panel, the values represent the animals that were still exercising. The number in the brackets represents the rats that were not fatigued. Values are expressed as mean \pm SEM. n=6 in each group. * $p<0.05$ compared with saline-treated group. $^{\dagger}p<0.05$ compared with corresponding basal value.

Figure 1

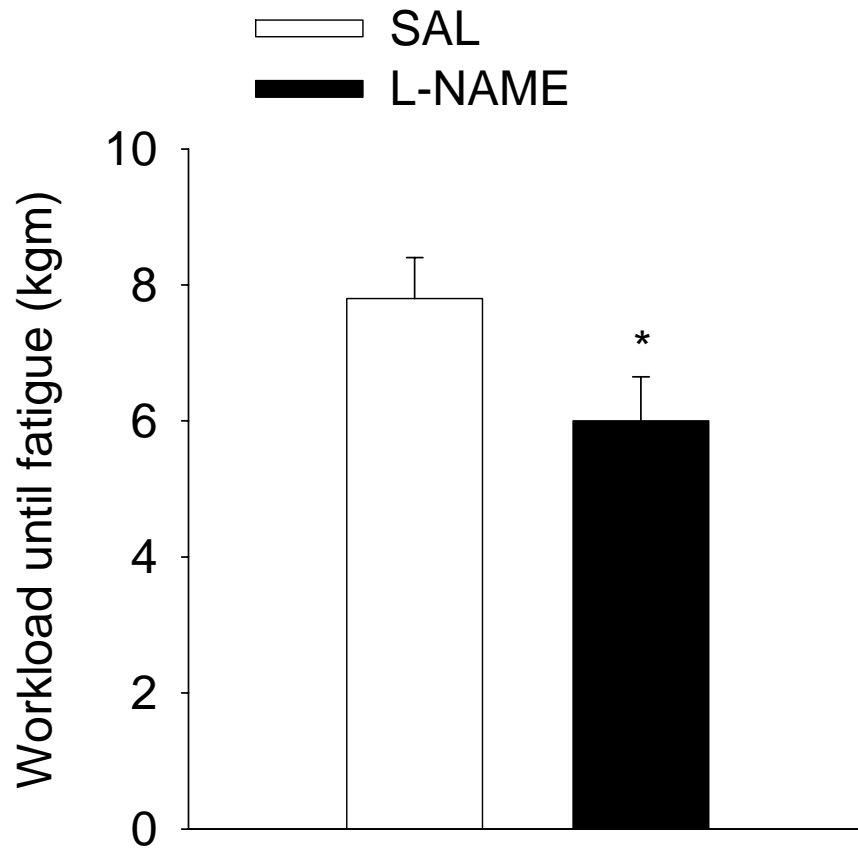
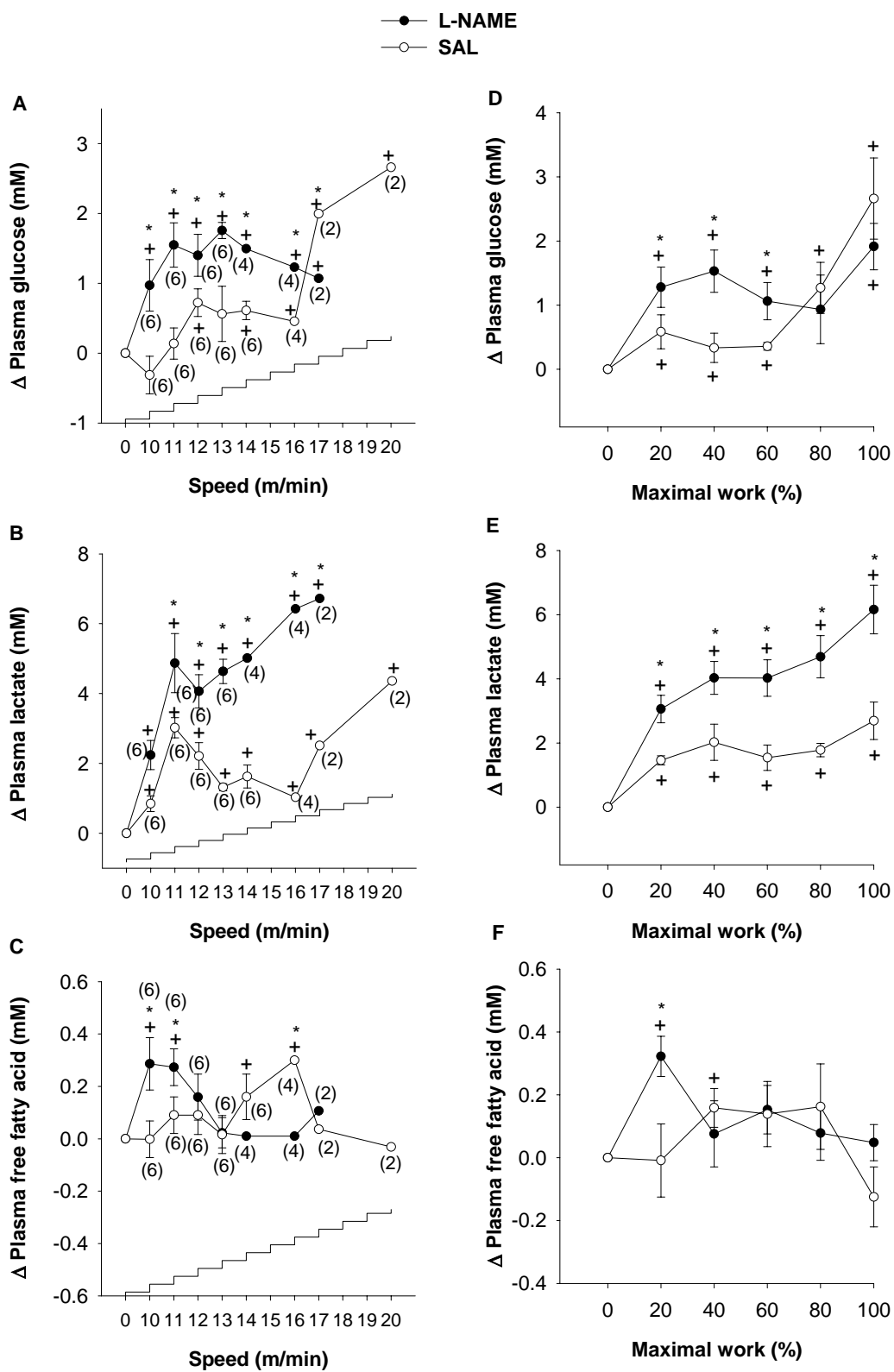


Figure 2



Conclusões

Nossos resultados indicam que o óxido nítrico central está envolvido na termorregulação durante o exercício físico agudo, provavelmente promovendo um tônus simpático inibidor, que reduz a produção de calor, melhorando a eficiência mecânica e o desempenho do animal. Além disso, a via do óxido nítrico central ativa mecanismos de dissipação de calor durante o exercício físico agudo, reduzindo o limiar da temperatura central para vasodilatação da cauda e diminuindo a taxa de aquecimento corporal bem como o armazenamento de calor. Esses efeitos termorregulatórios do óxido nítrico no sistema nervoso central aumentam o impulso neural para o desempenho físico durante o exercício físico agudo, adiando o surgimento da fadiga. Sendo assim, a via do óxido nítrico central é fundamental para o equilíbrio entre produção e dissipação de calor durante o exercício físico agudo, promovendo uma proteção neuronal que previne o superaquecimento corporal e possivelmente apoptose cerebral. Além disso, a via do óxido nítrico central influencia o fluxo de substratos durante o exercício físico agudo.

Referências Bibliográficas

Almeida MC. *Vias termofetoras no controle da termogênese e comportamento: Participação do locus ceruleus e hipotálamo dorsomedial*. 2006. Tese (Doutorado em Fisiologia) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

Almeida MC, Branco LGS. Role of nitric oxide in insulin-induced hypothermia in rats. *Brain Res Bull*. 54:49-53, 2001.

American Physiological Society. Resource book for the design of animal exercise protocols, 2006.

Antunes-Rodrigues J, McCann SM. Water, sodium chloride, and food intake induced by injections of cholinergic and adrenergic drugs into the third ventricles of the rat brain. *Proc Soc exp Biol Med*. 133:1464-1470, 1970.

Bamshad M, Song CK, Bartness TJ. CNS origins of the sympathetic nervous system outflow to brown adipose tissue. *Am J Physiol*. 276:1569-1578, 1999.

Barstow TJ. Characterization of VO₂ kinetics during heavy exercise. *Med Sci Sports Exerc*. 26:1327, 1994.

Benamar K, Yondorf MZ, Kon D, Geller EB, Adler MW. Role of nitric-oxide synthase isoforms during morphine-induced hyperthermia in rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 307(1):219-222, 2003.

Boulant JA. Hypothalamic neurons: mechanisms of sensitivity to temperature. *Ann N Y Acad Sci*. 856:108-115, 1998a.

Boulant JA. Neural thermal reception and regulation of body temperature. In: *Physiology and pathophysiology of temperature regulation* (Blatteis CM, ed.). World Scientific, New Jersey, USA, p.94-104, 1998b.

Boulant JA. Role of preoptic-anterior hypothalamus in thermoregulation and fever. *Clin Infect Dis*. 31:157-161, 2000.

Boulant JA & Hardy JD. The effect of spinal and skin temperatures on the firing rate and thermosensitivity of preoptic neurones. *J Physiol*. 240:639-660, 1974.

Branco LGS, Carnio EC, Barros RCH. Role of nitric oxide pathway in hypoxia-induced hypothermia. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*. 273:967-971, 1997.

Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR, Snyder SH. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* 351:714-718:1991.

Brooks GA, Donovan CM, White TP. Estimation of anaerobic energy production and efficiency in rats during exercise. *J Appl Physiol.* 56:520-525, 1984.

Brooks GA, White TP. Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise. *J Appl Physiol.* 45:1009-1015, 1978.

Cano G, Passerin AM, Schiltz JC, Card JP, Morrison SF, Sved AF. Anatomical substrates for the central control of sympathetic outflow to interscapular adipose tissue during cold exposure. *J Comp Neurol.* 460:303-326, 2003.

Dawson TM. Regulation of neuronal nitric oxide synthase and identification of novel nitric oxide signaling pathways. *Prog Brain Res.* 118:3-11, 1998.

Dawson TM, Snyder SH. Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. *J Neurosci.* 14(9):5147-5159, 1994.

De Groot J. The rat forebrain stereotaxic coordinates. *Proc K Ned Wet.* 62:1-40, 1959.

De Paula D, Steiner AA, Branco LGS. The nitric oxide pathway is an important modulator of stress-induced fever in rats. *Physiol Behav.* 70(5):505-511, 2000.

Eriksson S, Hjelmqvist H, Keil R, Gerstberger R. Central application of a nitric oxide donor activates heat defense in the rabbit. *Brain Res.* 774:269-273, 1997.

Etgen GJ Jr, Fryburg DA, Gibbs EM. Nitric oxide stimulates skeletal muscle glucose transport through a calcium/contraction-d phosphatidylinositol-3-kinase-independent pathway. *Diabetes.* 46(11):1915-1919, 1997.

Foster DD, Frydman ML. Tissue distribution of cold-induced thermogenesis in conscious warm or cold acclimated rats reevaluated from changes in tissue blood flow: the dominant role of brown adipose tissue in the replacement of shivering by nonshivering thermogenesis. *Can J Physiol Pharmacol.* 57:257-270, 1979.

Fuller A, Carter RN, Mitchell D. Brain and abdominal temperatures at fatigue in rats exercising in the heat. *J Appl Physiol.* 84(3):877-883, 1998.

Gardiner SM, Compton AM, Bennett T, Palmer RMJ, Moncada S. Control of regional blood flow by endothelium-derived nitric oxide. *Hypertension.* 15:486-492, 1990.

Gerstlberger R. Nitric oxide and body temperature control. *News Physiol Sci.* 14:30-36, 1999.

Gleeson M. Physiology of body temperature regulation: temperature regulation during exercise. *Int J Sports Med.* 19:96-99, 1998.

Gollnick PD, Ianuzzo CD. Colonic temperature of rats during exercise. *J Appl Physiol.* 24:747-750, 1968.

González-Alonso J, Teller C, Andersen SL, Jensen FB, Hyldig T, Nielsen B. Influence of body temperature on the development of fatigue during prolonged exercise in the heat. *J Appl Physiol.* 86(3):1032-1039, 1999.

Goodson AR, Leibold JM, Gutterman DD. Inhibition of nitric oxide synthesis augments centrally induced sympathetic coronary vasoconstriction in cats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 267:1272-1278, 1994.

Gordon CJ. Thermal biology of the laboratory rat. *Physiol Behav.* 47:963-991, 1990.

Gourine AV. Pharmacological evidence that nitric oxide can act as an endogenous antipyretic factor in endotoxin-induced fever in rabbits. *Gen Pharmacol.* 26(4):835-841, 1995.

Hammel HT, Jackson DC, Stolwijk JA, Hardy JD, Stromme SB. Temperature regulation by hypothalamic proportional control with an adjustable set point. *J Appl Physiol.* 18:1146-1154, 1963.

Harms PG, Ojeda SRA. A rapid and simple procedure for chronic cannulation of rat jugular vein. *J Appl Physiol.* 36:391-392, 1974.

Hartley LH, Mason JW, Hogan RP, Jones LG, Kotchen TA, Mougey EH, Wherry FE, Pennington LL, Ricketts PT. Multiple hormonal responses to graded exercise in relation to physical training. *J Appl Physiol.* 33:602-606, 1972.

Higaki Y, Hirshman MF, Fujii N, Goodyear LJ. Nitric oxide increases glucose uptake through a mechanism that is distinct from the insulin and contraction pathways in rat skeletal muscle. *Diabetes.* 50(2):241-247, 2001.

Jessen C. Hyperthermia and its effects on exercise performance. In: *Heat Stress: Physical Exertion and Environment*, edited by Hales JRS and Richards DAB, Elsevier, Amsterdam, 241-249, 1987.

Hussain SO, Barbato JC, Koch LG, Meeting PJ, Britton SL. Cardiac function in rats selectively bred for low- and high-capacity running. *Am J Physiol.* 281:1787-1791, 2001.

Jones AM, Wilkerson DP, Wilmschurst S, Campbell IT. Influence of L-NAME on pulmonary O₂ uptake kinetics during heavy-intensity cycle exercise. *J Appl Physiol.* 96:1033-1038, 2004.

Kindig CA, Gallatin LL, Erickson HH, Fedde MR, Poole DC. Cardiorespiratory impact of the nitric oxide synthase inhibitor L-NAME in the exercising horse. *Resp Physiol.* 120(2):151-166, 2000.

Kindig CA, McDonough P, Erickson HH, Poole DC. Effect of L-NAME on oxygen uptake kinetics during heavy-intensity exercise in the horse. *J Appl Physiol.* 91(2):891-896, 2001.

Kindig CA, McDonough P, Erickson HH, Poole DC. Nitric oxide synthase inhibition speeds oxygen uptake kinetics in horses during moderate domain running. *Respir Physiol Neurobiol.* 132:169-178, 2002.

Lacerda ACR, Marubayashi U, Balthazar CH, Coimbra CC. Evidence that brain nitric oxide inhibition increases metabolic cost of exercise, reducing running performance in rats. *Neurosci Lett.* 393: 260-263, 2006.

Lacerda ACR, Marubayashi U, Coimbra CC. Nitric oxide pathways is an important modulator of heat loss in rats during exercise. *Brain Res Bull.* 67:110-116, 2005.

Lima NRV, Pereira W, Reis AM, Coimbra CC, Marubayashi U. Prolactin release during exercise in normal and adrenalectomized untrained rats submitted to central cholinergic blockade with atropine. *Horm Behav.* 40:526-532, 2001.

Lin JH, Lin MT. Nitric oxide synthase-cyclo-oxygenase pathways in organum vasculosum laminae terminalis: possible role in pyrogenic fever in rabbits. *Br J Pharmacol.* 118(1):185-197, 1996.

Lin MT, Lin JH, Yang YL. Dexamethasone administered into organum vasculosum laminae terminalis of rabbits induced antipyresis via inhibiting nitric oxide pathway in situ. *Neurosci Lett.* 230:53-56, 1997.

Mathai M, Hjelmqvist H, Keil R, Gerstberger R. Nitric oxide increases cutaneous and respiratory heat dissipation in conscious rabbits. *Am J Physiol.* 272(Regulatory Integrative Comp Physiol 41): 1691-1697, 1997.

McAllen RM. Preoptic thermoregulatory mechanisms in detail. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 287:272-273, 2004.

McAllister RM, Hirai T, Musch TI. Contribution of endothelium-derived nitric oxide (EDNO) to the skeletal muscle blood flow response to exercise. *Med Sci Sports Exerc.* 27:1145-1151, 1995.

McArdle WD, Katch FI, Katch VL. *Fisiologia do Exercício: Energia, nutrição e desempenho humano.* Ed.5º, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., p. 648, 2003.

Mills PC, Marlin DJ, Scott CM, Smith NC. Metabolic effects of nitric oxide synthase inhibition during exercise in the horse. *Res Vet Sci.* 66(2): 135-138, 1999.

Mills PC, Marlin CM, Smith NC. Nitric oxide and thermoregulation during exercise in the horse. *J appl Physiol.* 82(4):1035-1039, 1997.

Mills PC, Scott CM, Marlin DJ. Effects of nitric oxide inhibition on thermoregulation during exercise in the horse. *Ann N Y Acad Sci.* 813:591-599, 1997.

Milton AS. Thermal physiology: briefly history and perspectives. In: *Physiology and pathophysiology of temperature regulation* (CM Blatteis, ed.). World Scientific, New Jersey, USA, p.3-11, 1998.

Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 43:109-142, 1991.

Nagashima K, Nakai S, Tanaka M, Kanosue K. Neuronal circuitries involved in thermoregulation. *Auton Neurosci.* 85:18-25, 2000.

Nagashima T, Ohinata H, Kuroshima A. Involvement of nitric oxide in noradrenaline-induced increase in blood flow through Brown adipose tissue. *Life Sci.* 54:17-25, 1994.

Oldfield BJ, Giles ME, Watson A, Anderson C, Colvill LM, McKinley MJ. The neurochemical characterization of hypothalamic pathways projecting polysynaptically to brown adipose tissue in the rat. *Neurosci.* 110:515-526, 2002.

Perotti CAA, Nogueira MS, Antunes-Rodrigues J, Cárnio EC. Effects of a neuronal nitric oxide synthase inhibitor on lipopolysaccharide-induced fever. *Braz J Med Biol Res.* 32(11):1381-1387, 1999.

Roberts CK, Barnard RJ, Scheck SH, Balon TW. Exercise-stimulated glucose transport in skeletal muscle is nitric oxide dependent. *Am J Physiol.* 273:220-225, 1997.

Rodrigues AG, Lima NRV, Coimbra CC, Marabayashi U. Intracerebroventricular physostigmine facilitates heat loss mechanisms in running rats. *J Appl Physiol.* 97:333-338, 2004.

Romanovsky AA. Do fever and anapyrexia exist? Analysis of set point-based definitions. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 287:992-995, 2004.

Rose AJ, Richter EA. Skeletal muscle glucose uptake during exercise: how is it regulated? *Physiol.* 20:260-270, 2005.

Rowell LB. Cutaneous vascular circulation and exercise. In: *Human Circulation. Regulation during physical stress.* Oxford, UK: Clarendon, 57-82, 1986.

Sanches DB, Carnio EC, Branco LGS. Central nNOS is involved in restraint stress-induced fever: evidence for a cGMP pathway. *Physiol Behav.* 80:139-145, 2003.

Satinoff E. Neural organization and evolution of thermal regulation in mammals. *Science.* 201:16-22, 1978.

Schrawen P, Hesselink M. Uncoupling protein 3 and physical activity: the role of uncoupling protein 3 in energy metabolism revisited. *Proc Nutr Soc.* 62:635-43, 2003.

Soares DD, Lima NRV, Coimbra CC, Marubayashi U. Evidence that tryptophan reduces mechanical efficiency and running performance in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 74:357-362, 2003.

Sonne B, Galbo H. Simultaneous determinations of metabolic and hormonal responses, heart rate, temperature, and oxygen uptake in running rats. *Acta Physiol Scand.* 109:201-209, 1980.

Steiner AA, Antunes-Rodrigues J, McCANN SM, Branco LGS. Antipyretic role of the NO-cGMP pathway in the anteroventral preoptic region of the rat brain. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol.* 282:584-593, 2002.

Steiner AA, Branco LGS. Nitric oxide in the regulation of body temperature and fever. *J Thermal Biol.* 26:325-330, 2001.

Steiner AA & Branco LGS. Hypoxia-induced anapirexia: implications and putative mediators. *Annu Rev Physiol.* 64:263-88, 2002.

Steiner AA, Carnio EC, Antunes-Rodrigues J, Branco LGS. Role of nitric oxide in systemic vasopressin-induced hypothermia. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol.* 275:937-941, 1998.

Traystman RJ, Moore LE, Helfaer MA, Davis S, Banasiak K. Nitro-L-arginine analogues: dose- and time- related nitric oxide synthase inhibition in brain. *Stroke.* 26:864-869, 1995.

Walters TJ, Ryan KL, Tate LM, Mason PA. Exercise in the heat is limited by a critical internal temperature. *J Appl Physiol.* 89:799-806, 2000.

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

Werner J. The concept of regulation for human body temperature. *J Therm Biol.* 5:75-82, 1980.