Carolina da Silveira Scarpellini

Efeito da associação entre a hipóxia e a fase do dia
sobre a temperatura corporal em ratos

Effect of the association between hypoxia and
phase of day on body temperature in rats

São Paulo

2011

Carolina da Silveira Scarpellini

Efeito da associação entre a hipóxia e a fase do dia
sobre a temperatura corporal em ratos

Effect of the association between hypoxia and
phase of day on body temperature in rats

Dissertação apresentada ao Instituto
de Biociências da Universidade de
São Paulo, para a obtenção de Título
de Mestre em Ciências, na Área de
Fisiologia Geral.

Orientadora: Kênia Cardoso Bicego

São Paulo

2011

Ficha Catalográfica

Scarpellini, Carolina da Silveira
Efeito da associação entre a hipóxia e a fase
do dia sobre a temperatura corporal em ratos
74 p.

Dissertação (Mestrado) - Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo.
Departamento de Fisiologia.

1. Temperatura corporal 2. Hipóxia 3. Fase
do dia I. Universidade de São Paulo.
Instituto de Biociências. Departamento de
Fisiologia.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr Luiz Silveira Menna-Barreto

Prof(a). Dr(a). Maria Camila Almeida

Profa. Dra Kênia Cardoso Bicego
Orientadora

*Aos meus pais, Maria Aparecida e João Carlos,
aos meus irmãos, Ennio e Eduardo
e ao meu sobrinho, Antônio.*

*“...E eu poderia suportar, embora não sem dor, que tivessem
morrido todos os meus amores, mas enlouqueceria
se morressem todos os meus amigos!...”*

(Vinicius de Moraes)

Agradecimentos

Aos meus pais e irmãos por todo o apoio e incentivo desde o início da vida acadêmica.

À Roseli Silva Santos, secretária do Departamento de Fisiologia deste Instituto, pela atenção, paciência, eficiência e solicitude nestes dois anos e meio.

À Prof^a Gisele Akemi Oda, pela sugestão inicial deste trabalho, pela disponibilidade em nos ajudar com as mais diversas dúvidas cronobiológicas e por ter permitido que eu assistisse às aulas de sua disciplina. Por este último motivo, agradeço também à professora Mirian David Marques.

Ao Prof. Gilberto Xavier, pela atenção e disponibilidade durante a orientação acadêmica no início do mestrado.

A todos que me ajudaram com as discussões dos resultados via Skype ou com indicações de artigos científicos: Aline Dal'Olio Gomes, Cristiële Ribeiro, Patrícia Tachinardi e Carlos Eduardo Tolussi.

À minha orientadora, Kênia Cardoso Bícego, pela amizade construída ao longo destes anos, incentivo com os experimentos, insistência com a respirometria e paciência com o meu imediatismo.

À Luciane Gargaglioni Batalhão, por todos os “votos de minerva” nos momentos em que a minha opinião e a da Kênia eram discordantes e por permitir que sua casa se transformasse na sede das festas oficiais do laboratório.

A todos os amigos de laboratório, Débora, Luana, Camila, Vivian, Lucas, Danuzia, Elisa, Mariane, Luis Gustavo, Aretuza, Lívia, Paula, Ana Gabriela, Valter, Thaís e Euclides, pelo apoio nos momentos de tensão, pela ajuda com a respirometria, por todas as vezes que receberam gelo-seco por mim ou que reservaram o termógrafo quando eu não estava presente, pelos almoços comunitários, pela companhia em todas as festinhas promovidas pelo “Lab de Fisiologia” e por todas as gargalhadas nos mais diversos momentos. Sem vocês, a vivência no laboratório não teria a mínima graça.

À Flávia e ao Luiz Gustavo, pela presença e companhia em tantos anos de amizade. À Roberta, Vanessa e ao Matheus por terem se tornado tão próximos nos últimos tempos e pela insistência em me tirar de casa no meio da dissertação.

À Ana Carla, Camila, Lívia, Patrícia e Marita, por todos os momentos compartilhados nestes anos de convivência em Jaboticabal. Vocês são minha família por opção. Que Deus nos mantenha sempre unidas.

À Marta, Silvania, Samara, Jamile, Lilian e Leila, por terem contribuído tanto para a “arrumação do jardim”. Vocês são co-autoras da “nova” Carol.

Ao Felipe, pelo apoio técnico e por levar às últimas consequências o significado da palavra “amizade”, independente da fase do dia.

À FAPESP, pela bolsa concedida.

E, por fim, a Deus por ter permitido que eu encontrasse todas estas pessoas durante minha vida. Sem elas, certamente, eu não teria chegado até aqui.

SUMÁRIO

I. Introdução.....	9
1 – Princípios básicos da termorregulação em Vertebrados.....	9
2 - Ritmicidade da Temperatura corporal	16
3 – Estados térmicos	17
4 – Anapirexia hipóxica.....	20
II. Objetivos.....	25
III. Material e métodos.....	26
1 – Animais	26
2 – Cirurgia	26
3 – Medidas de temperatura corporal (Tc) e temperatura da pele (Tp)	27
4 – Medidas de consumo de oxigênio	28
5 – Protocolos Experimentais	28
<i>Parte A.....</i>	<i>29</i>
1 – Efeito da associação entre a hipóxia e a fase do dia sobre a Tc de ratos expostos a 26°C	29
2 – Efeito da associação entre a hipóxia e a fase do dia sobre a Tc de ratos expostos a 19°C	29
<i>Parte B.....</i>	<i>30</i>
1 – Associação entre a produção/conservação de calor e a amplitude da anapirexia hipóxica em ratos expostos a 26°C em diferentes fases do dia	30
2 - Associação entre a produção/conservação de calor e a amplitude da anapirexia hipóxica em ratos expostos a 19°C em diferentes fases do dia	31
6 – Análise dos Resultados	31
IV. Resultados.....	33
<i>Parte A.....</i>	<i>33</i>
1 – Variação diária da Tc.....	33
2 – Efeito da associação entre a hipóxia e a fase do dia sobre a Tc de ratos expostos a 26°C	34
3 – Efeito da associação entre a hipóxia e a fase do dia sobre a Tc de ratos expostos a 19°C	35

4 – Efeito da temperatura ambiente sobre a queda da Tc frente a hipóxia em diferentes fases do dia	36
<i>Parte B</i>	37
1 – Variação diária da Tc.....	37
2 – Associação entre a produção/conservação de calor e a amplitude da anapirexia hipóxica em ratos expostos a 26°C em diferentes fases do dia	38
3 – Associação entre a produção/conservação de calor e a amplitude da anapirexia hipóxica em ratos expostos a 19°C em diferentes fases do dia	42
V. Discussão	48
<i>Parte A</i>	48
<i>Parte B</i>	53
1) Associação entre a produção/conservação de calor e a amplitude da anapirexia hipóxica em ratos expostos a 26°C em diferentes fases do dia	53
2) Associação entre a produção/conservação de calor e a amplitude da anapirexia hipóxica em ratos expostos a 19°C em diferentes fases do dia	59
<i>Perspectivas</i>	61
VI. Conclusões	63
VII. Resumo	64
VIII. Abstract.....	66
IX. Referências bibliográficas.....	67

I. Introdução

1 – Princípios básicos da termorregulação em Vertebrados

A temperatura corporal (T_c) é um dos principais fatores que afetam os processos fisiológicos e bioquímicos dos animais, pois influencia diretamente a velocidade das reações químicas que os mantêm vivos. Com base nisso, fica evidente que a manutenção da T_c dentro de certos limites é imprescindível para a sobrevivência dos organismos.

A forma como a manutenção da T_c acontece nos vertebrados pode diferir entre as espécies. Alguns regulam suas T_c s principalmente por meio de uma fonte externa de energia térmica, geralmente o sol, e são chamados de ectotermos. Outros, os endotermos, dependem especialmente de uma fonte interna de calor, o próprio metabolismo. Os ectotermos (peixes, anfíbios e répteis) possuem baixa taxa metabólica – o que implica em reduzida produção de calor endógeno – e isolante térmico pouco eficiente, o que contribui para que suas T_c s sejam semelhantes à temperatura ambiente (T_a). Por outro lado, os endotermos (aves e mamíferos), além de apresentarem alta taxa metabólica – logo, alta produção de calor endógeno – possuem um eficiente isolante térmico facilitando a conservação do calor gerado internamente e permitindo maior independência das flutuações da T_a (WILLMER e col., 2005).

Dentre os mecanismos termorreguladores usados pelos ectotermos, o comportamental é o mais comum (BÍCEGO e col., 2007). Este modo de regular a T_c , considerado o mais antigo na escala filogenética, pode envolver a busca por um ambiente mais quente ou mais frio ou a adoção de posturas corporais que propiciem ou evitem a troca de calor com o ambiente. Os endotermos, além de apresentarem

termorregulação comportamental, contam com mecanismos autonômicos de ganho (produção e conservação) e perda de energia térmica para a regulação da T_c . É importante mencionar que, segundo o mais recente Glossário de termos para Fisiologia Termal da *Commission for Thermal Physiology of the International Union of Physiological Sciences* (GLOSSARY OF TERMS FOR THERMAL PHYSIOLOGY, 2001), esta definição de mecanismo “autonômico” tem uma implicação mais geral, que significa “involuntário” e não necessariamente que os efetores termorreguladores sejam controlados pelo sistema nervoso autônomo. O termo “autonômico” veio substituir o termo “fisiológico”, usado há alguns anos, pois fisiológico inclui autonômico e comportamental.

Nos mamíferos, a exposição a uma T_a baixa ativa a conservação de energia térmica, que ocorre principalmente por meio de vasoconstrição periférica e piloereção. A vasoconstrição periférica implica em um menor fluxo sanguíneo para a pele causando uma queda na temperatura deste órgão e, dessa forma, a diferença térmica entre a pele e o ambiente é reduzida, diminuindo a perda de calor do animal. A respeito da piloereção, a camada de ar aprisionada entre os pelos apresenta uma temperatura intermediária entre a temperatura da pele e a T_a formando um gradiente entre a pele, o ar aprisionado e o ambiente. A formação deste gradiente também contribui para que menos energia térmica seja transferida do animal para o meio, e dessa forma, mais energia seja conservada no organismo. Além disso, a presença de gordura subcutânea, especialmente em mamíferos, colabora para a conservação da energia térmica endógena por ser um bom isolante térmico e um tecido pouco vascularizado (WILLMER e col., 2005).

Além destes meios, alguns animais que vivem em ambientes frios, como golfinhos, baleias e algumas aves, possuem na extremidade dos membros um

mecanismo extra de conservação da energia térmica corpórea, chamado “mecanismo de contracorrente”. Nestes animais, as artérias (sangue aquecido) que se direcionam para as extremidades são rodeadas por muitas veias (sangue resfriado), proporcionando assim troca de calor entre os vasos sanguíneos antes que eles cheguem ao seu curso final. Desse modo, o sangue arterial chega à extremidade mais resfriado - o que garante um menor gradiente térmico entre a superfície corporal e o meio, implicando em menor perda de calor do animal - enquanto o sangue venoso chega ao centro do corpo mais aquecido, contribuindo para a conservação do calor dentro do animal (WILLMER e col., 2005).

Quanto à produção de energia térmica, esta pode ser classificada em obrigatória e facultativa. Todos os processos metabólicos de um organismo resultam na liberação de calor. Assim, termogênese obrigatória é a produção de calor decorrente dos processos metabólicos basais durante o repouso e em condições de conforto térmico para o animal. Qualquer aumento na taxa metabólica (incluindo digestão, atividade física ou desafio térmico) implica em maior liberação de energia térmica e constitui a chamada termogênese facultativa. Esta última pode ser ativada via mecanismos de produção de energia térmica dependentes de tremor ou independentes deste. A termogênese independente de tremor mais estudada é a produzida pelo tecido adiposo marrom dos mamíferos. Este tecido, localizado próximo às escápulas, ao esterno e aos rins, é bastante vascularizado e apresenta alta densidade de mitocôndrias, sendo de especial importância para os animais de pequeno tamanho, recém-nascidos ou aclimatados ao frio (MACKOWIAK, 1998; BRANCO e col., 2005),

Nas mitocôndrias das células em geral, a oxidação dos substratos resulta em um gradiente de concentração de prótons no espaço intermembrana em relação

à matriz mitocondrial, que faz com que esses prótons retornem para a matriz principalmente através da enzima ATP sintase. Parte da energia armazenada no gradiente é utilizada na formação de ATP e parte é dissipada na forma de calor. No tecido adiposo marrom uma proteína desacopladora de prótons (UCP1), anteriormente chamada de termogenina, é encontrada na membrana interna das mitocôndrias e funciona como uma via alternativa para o fluxo de prótons independente da ATP sintase. Desse modo, uma maior parte da energia armazenada no gradiente é dissipada como calor ao passar pela UCP1 (já que não há produção de ATP), o que contribui para o aquecimento dos animais (BRANCO e col., 2005; NELSON e col., 2004).

Outras UCPs foram encontradas em diferentes tecidos de várias espécies, mas suas funções ainda não estão totalmente esclarecidas. Alguns estudos demonstraram a existência de uma proteína homóloga à UCP1 no músculo esquelético de aves, indicando que tal musculatura também pode ser capaz de produzir energia térmica independente de tremor (BICUDO e col., 2002; NELSON e col., 2004; BRANCO e col., 2005).

E por fim, o tremor consiste em movimentos involuntários da musculatura esquelética sem que haja realização de trabalho mecânico, resultando no aumento da taxa de produção de calor (GLOSSARY OF TERMS FOR THERMAL PHYSIOLOGY, 2001).

A respeito dos mecanismos autonômicos de perda de energia térmica comumente ativados quando a T_a é alta, os principais são os evaporativos (sudorese e ofego dentre outros) e os não evaporativos (vasodilatação periférica). Na vasodilatação periférica ocorre o contrário do que acontece na vasoconstrição: o fluxo sanguíneo é aumentado na periferia, elevando a temperatura da pele,

contribuindo para um aumento na diferença térmica entre os meios e, conseqüentemente, facilitando a perda de calor do animal para o ambiente. Este mecanismo é muito importante para a perda de energia térmica em ratos, especialmente nos vasos da cauda (LITTLE e STONER, 1968). Nos animais que possuem mecanismo de contracorrente e nadam em águas aquecidas, a dilatação da artéria, que é rodeada por veias, acaba comprimindo tais veias e diminuindo o fluxo sanguíneo por estas vias. Esta queda no fluxo sanguíneo reduz a troca de calor entre a artéria e a veia e, desta forma, o sangue arterial chega à extremidade aquecida - e perde calor para a água - e o sangue venoso, que retorna ao centro do corpo por veias alternativas, chega ao seu curso final resfriado. Assim, menos calor é conservado e os organismos evitam o superaquecimento (SCHMIDT-NIELSEN, 1997).

A perda de calor pela evaporação consiste na passagem da água do estado líquido para o gasoso a partir da energia térmica fornecida pelo próprio organismo, contribuindo para a redução desta energia no animal. A evaporação da água é o único meio de perder energia térmica quando a T_a é maior que a T_c dos animais. Em relação ao ofego (importante para cães, gatos, ovelhas e aves), o padrão mais comum é inspiração pelo nariz e expiração pela abertura oral. Durante a expiração pelo nariz, a energia térmica contida no ar é passada para a mucosa nasal por meio de um sistema de contracorrente e, então ela é conservada, ao passo que, a expiração pela boca evita que o calor do ar seja retido nas vias nasais, contribuindo para a sua dissipação de forma mais eficiente. Além disso, a exposição da língua ao ar, no caso dos cães, por exemplo, favorece a evaporação da água da saliva e todos estes mecanismos cooperam para a redução da energia corpórea (SCHMIDT-NIELSEN e col., 1970; RANDALL, 1997). No caso do rato, modelo experimental

deste estudo, a perda evaporativa de calor é realizada pela associação de um mecanismo autonômico, que é a produção de saliva, e um comportamental, que é o espalhamento dessa saliva sobre os pelos quando são expostos a ambientes quentes (HAINSWORTH e STRICKER, 1969). A evaporação dessa saliva espalhada sobre a superfície corporal facilita a perda de calor para o ambiente.

Ainda, alguns animais que vivem em ambientes muito quentes, como por exemplo, as gazelas dos desertos, também conhecida por Gazela de Thomson, possuem um mecanismo extra de regulação da temperatura. Semelhante ao que ocorre nas nadadeiras dos golfinhos, esses animais têm algumas veias que rodeiam a carótida, sendo que neste caso, parte da energia térmica presente no sangue arterial que se direciona ao encéfalo do animal é transferida para o sangue venoso que retorna das veias nasais em direção ao centro do corpo e, assim, o sangue arterial chega ao sistema nervoso central (SNC) mais resfriado e evita o superaquecimento do encéfalo. Foi observado que após a gazela de Thomson correr por 5 minutos a 40 km/h, o sangue arterial aumentou de 39 para 44°C, mas a temperatura do encéfalo não ultrapassou 41°C (SCHMIDT-NIELSEN, 1997).

Cabe comentar que alguns ectotermos, o que é mais evidente em répteis, também apresentam mecanismos autonômicos de termorregulação, como variações de fluxo sanguíneo periférico dependentes da T_a , ofegação em alguns lagartos de deserto e termogênese por tremor em pítons durante a incubação de seus ovos (revisão de BÍCEGO e col. 2007).

Há várias décadas, estudos em diversas espécies de vertebrados, especialmente em mamíferos, sugeriram a participação hierarquicamente importante de uma região encefálica denominada área pré-óptica do hipotálamo anterior (APO) no controle dos mecanismos efetores de termorregulação (LEPKOVSKY e col 1968;

LILLYWHITE, 1971; MILLS e HEATH, 1972; BERK e HEATH, 1975; NELSON e PROSSER, 1979; para revisão veja BICEGO e col., 2007). A APO situa-se na transição entre o diencéfalo e o telencéfalo dos vertebrados e é considerada nos mamíferos como uma região termointegradora, pois recebe informações térmicas de várias partes do organismo, além de termossensível, pois detecta as alterações térmicas locais. Há neurônios sensíveis ao aumento de temperatura na APO que, segundo o modelo proposto por Hammel (1965) e modificado posteriormente por Boulant (2006), quando ativados pelos termorreceptores cutâneos – via interneurônios espinhais – ou pela alteração local da temperatura, estimulam a perda e inibem a produção de energia térmica levando à manutenção da Tc. Por outro lado, quando a taxa de disparos destes neurônios diminui devido à queda na temperatura ambiente e/ou na local, ocorre uma redução na perda e um aumento na produção de energia térmica com consequente manutenção da Tc. Existem algumas controvérsias sobre a participação da APO na termorregulação comportamental, mas provavelmente tais diferenças encontradas sejam devidas às diferentes regiões da APO que foram lesadas nestes estudos (SATINOFF e RUTSTEIN, 1970; BERK e HEATH, 1975; NELSON e PROSSER, 1979; BICEGO e BRANCO, 2002; ALMEIDA e col., 2006). Atualmente, há evidências de que cada termoefetor dos mamíferos (vasodilatação/vasoconstrição, termogênese por tremor ou no tecido adiposo marrom, sudorese, comportamento, etc) possui um circuito neural específico, que pode depender da participação de diferentes regiões do tronco encefálico, diencéfalo e área pré-óptica, de acordo com a situação térmica (ALMEIDA e col., 2004, 2006; MORRISON e col., 2008; NAKAMURA e MORRISON, 2010).

2- Ritmicidade da Temperatura corporal

Ritmo, por definição, é uma sequência de eventos que se repete periodicamente. Dentre outros, o ciclo estral ou menstrual, as frequências cardíaca e respiratória, a liberação de hormônios, a produção de óxido nítrico nos núcleos supraquiasmáticos (NSQ: região hipotalâmica considerada de extrema importância para a manutenção dos ritmos circadianos) e de dinorfina no hipotálamo, a taxa de disparos de um neurônio, o nível de atividade, a percepção de dor, e a Tc, são exemplos de ritmos encontrados nos animais (MITOME e col., 2001; SPESSERT e RAPP, 2001; PRZEWLOCKI e col., 1983; REFINETTI, 2003). Quanto ao intervalo de tempo em que esses eventos se repetem podemos observar principalmente 3 tipos de ritmos: i) ultradianos (*ultra*= rápido), em que as repetições ocorrem em um intervalo de tempo inferior a 20 horas, como nos ciclos cardíacos, respiratórios e de secreção de hormônios hipotalâmicos e adenohipofisários; ii) infradianos (*infra*= lento), com intervalos de repetição superiores a 28 horas, como nos ciclos estrais e menstruais; e iii) circadianos (*circa*= cerca de; *dies*= dia), em que as repetições ocorrem aproximadamente a cada 24 horas. (REFINETTI, 2006, MARQUES e MENNA-BARRETO, 2003).

O ritmo circadiano de variação da Tc apresenta sua acrofase (o tempo no qual o pico de um ritmo acontece) durante a fase de atividade do animal, ou seja, durante o dia para animais diurnos e durante a noite para animais noturnos. No entanto, o ritmo da Tc não é apenas resultado do aumento na produção de calor associado à locomoção durante a fase de atividade, mas parece ser gerado por um balanço entre os ritmos de produção e perda de calor. Ao menos em ratos (Fig. 1) e em humanos, sabe-se que a acrofase da produção de calor precede a da Tc que, por sua vez, antecede a acrofase da perda de calor (REFINETTI 2003, 2006).

Fig. 1. Temperatura corporal, produção e perda de calor de um rato durante 24h. As linhas contínuas finas representam os registros brutos e as linhas contínuas espessas representam a onda coseno usada para calcular a acrofase do ritmo. As linhas verticais tracejadas indicam as acrofases (Modificado de REFINETTI, 2003)

3 – Estados térmicos

Os endotermos podem apresentar cinco estados térmicos: eutermia, hipertermia, hipotermia, febre e anapirexia (GORDON, 2001). Abordaremos brevemente os quatro primeiros estados térmicos nesse item enquanto que a anapirexia (foco deste trabalho) será melhor explicada em item separado abaixo. Quando um animal apresenta uma T_c considerada típica para sua espécie, diz-se que ele está em eutermia. Existe uma faixa de T_a na qual a eutermia é mantida apenas com um custo energético mínimo. A essa faixa de T_a , dá-se o nome de “zona termoneutra” (ZTN) ou “zona de conforto térmico”. Por exemplo, a T_c em eutermia para humanos é cerca de 37°C (com variação de aproximadamente $0,5^{\circ}\text{C}$ ao longo do dia) e, geralmente, a ZTN para humanos adultos nus, encontra-se entre 28 e 30°C (BLATTEIS, 1998). Assim, quando a T_a ultrapassa pouco os limites

críticos inferior ou superior da ZTN, energia extra é empregada na manutenção da eutermia, ou seja, quando a T_a está acima ou abaixo dos limites da ZTN, a T_c praticamente não se altera com a variação da T_a porque os mecanismos termorreguladores autonômicos são ativados. Entretanto, se a T_a aumenta ou reduz extremamente, nem mesmo a ativação dos mecanismos de perda ou de produção de energia térmica é suficiente para a manutenção da eutermia e a T_c acaba acompanhando tais alterações, resultando nos estados de hiper ou hipotermia, respectivamente. Esses estados são consequência de alta carga de ganho ou perda de energia térmica, que está acima da capacidade dos mecanismos termorreguladores em manterem a eutermia (Fig. 2).

Fig 2. Esquema de três estados térmicos que podem ocorrer em endotérmicos: eutermia, hipotermia e hipertermia. A linha tracejada representa as variações de consumo de oxigênio ($\dot{V}O_2$) em relação à T_a . A linha contínua representa as variações da temperatura corporal (T_c) em relação à T_a . TCI: temperatura crítica inferior; TCS: temperatura crítica superior.

Na hipertermia moderada, a vasodilatação cutânea não compromete a oferta de sangue para outros tecidos porque há uma elevação e/ou uma redistribuição do

débito cardíaco. Essa redistribuição se dá pela redução da perfusão para os tecidos não vitais ou para aqueles que recebem mais sangue que o necessário considerando o metabolismo local. Porém, na hipertermia severa, a vasodilatação periférica pode ser tão intensa que conflita com os mecanismos de regulação da pressão arterial e pode causar edema nos membros inferiores, tontura, exaustão, dor de cabeça, vômito e diarreia (BRANCO e col., 2005).

Por outro lado, a hipotermia pode causar redução na velocidade de condução dos impulsos nervosos culminando em comprometimento da coordenação motora, confusão na fala, amnésia, alucinação, decréscimo da frequência respiratória, dentre outros efeitos, podendo levar o indivíduo ao coma caso a T_c atinja 28-30°C (BRANCO e col., 2005).

Por fim, a febre e a anapirexia referem-se a alterações *reguladas* da T_c . Na febre, mecanismos de ganho de energia térmica são ativados induzindo aumento da T_c (KLUGER, 1991) e durante a anapirexia mecanismos de perda de energia térmica são ativados reduzindo a T_c (GORDON, 2001; STEINER e BRANCO, 2002). Pode ser notado que os mecanismos ativados para induzir febre (produção e conservação de calor) são opostos àqueles ativados na hipertermia (perda de calor). O mesmo raciocínio vale para os mecanismos que levam à anapirexia (perda de calor) e aqueles que evitam a hipotermia (produção e conservação de calor).

A resposta febril é uma reação complexa, geralmente resultante do contato com agentes inflamatórios ou infecciosos e tem sido descrita em todos os grupos de vertebrados, além de alguns invertebrados (revisado por BÍCEGO e col, 2007).

Febre e anapirexia não são fenômenos exclusivos de endotermos. Como em ectotermos a T_c é muito semelhante à T_a e a termorregulação se dá essencialmente por mecanismos comportamentais, uma forma de inferir a T_c dos animais é

mensurar a T_a selecionada por eles. Dessa forma, quando os ectotermos infectados são colocados em um gradiente térmico que possibilite a “escolha” da T_a mais confortável, tais animais direcionam-se e permanecem no lado mais quente do gradiente, desenvolvendo a chamada febre comportamental. Isso também acontece quando endotermos infectados são colocados em um gradiente, evidenciando que a febre é um mecanismo regulado de aumento de T_c (revisado por BÍCEGO e col., 2007).

A ampla ocorrência da febre sugere que ela surgiu há muito tempo na escala filogenética e que, por ter sido conservada ao longo de tantas gerações, deve conferir benefícios aos organismos (KLUGER, 1991; KLUGER e col., 1998). De fato, muitos estudos apontam o aumento da efetividade do sistema imune do organismo infectado e a redução dos agentes patogênicos, como alguns dos benefícios da elevação regulada da T_c , com consequente melhora na taxa de sobrevivência (KLUGER, 1991; MARNILA e col., 1995; KLUGER e col., 1998).

4 – Anapirexia hipóxica

O estímulo mais estudado que induz anapirexia é a hipóxia (baixa pressão parcial de O_2) (BÍCEGO e col., 2007). O oxigênio é crucial para o metabolismo oxidativo e, consequentemente, para a produção de energia na forma de ATP. Sendo assim, é evidente que um aporte adequado de O_2 é essencial para a sobrevivência dos animais e que um déficit, mesmo que localizado e passageiro, pode causar prejuízos irreversíveis (LÓPEZ-BARNEO e col., 2001). No entanto, muitos animais enfrentam condições de hipóxia ao longo da vida, sejam essas condições ambientais – como dentro de tocas ou em altas altitudes – ou clínicas – como insuficiências cardíacas, respiratórias e/ou metabólicas, traumatismos

cranianos, acidentes vasculares encefálicos, dentre outros (BAO e col., 1997; REISSMANN e col., 2000; GORDON, 2001).

A anapirexia constitui uma das respostas adaptativas à hipóxia e é definida segundo o “Glossário de termos para Fisiologia Térmica” (GLOSSARY OF TERMS FOR THERMAL PHYSIOLOGY, 2001), como uma condição em que há um decréscimo regulado da T_c devido à ativação de mecanismos de perda de energia térmica. Vários estudos demonstraram que a anapirexia também resulta da inibição da produção de calor (GAUTIER e col., 1987; BARROS e col., 2001; TATTERSALL e MILSOM, 2003). Ainda, quando diversas espécies de animais (ecto e endotermos) são submetidas à hipóxia e colocadas em um gradiente de temperatura, estas selecionam regiões mais frias do que selecionariam em situações de normóxia (HICKS e WOOD, 1985; GORDON e FOGELSON, 1991; MALVIN e WOOD, 1992). Tais evidências indicam que a queda da T_c induzida pela hipóxia não é resultado de um descontrole devido à baixa disponibilidade de oxigênio, ou seja, não é uma hipotermia, mas sim um mecanismo regulado e por isso também foi chamado de hipotermia regulada (GORDON, 2001; STEINER e BRANCO, 2002; BARROS e col., 2001). Além disso, este fenômeno é observado ao longo de toda a escala filogenética dos vertebrados (BRYAN e col., 1984; HICKS e WOOD, 1985; BARNAS e RAUTENBERG, 1990; WOOD e MALVIN, 1991; GORDON e FOGELSON, 1991; CLARK e FEWELL, 1996; BARROS e col., 2001; 2004a) e até mesmo em organismos unicelulares, como é o caso do *Paramecium caudatum* (MALVIN e WOOD, 1992). Esta vasta ocorrência da anapirexia ao longo da filogênese sugere que ela confere algum benefício aos organismos hipóxicos. De fato, durante a hipóxia ocorrem ajustes fisiológicos como a hiperventilação e o aumento do débito cardíaco, que são respostas de alto custo energético. Entretanto, a anapirexia

atenua tais respostas, além de inibir a termogênese e aumentar a afinidade do O₂ pela hemoglobina (WOOD, 1995; GAUTIER, e col., 1987; BARROS e col., 2001). Dessa forma, um aumento na sobrevivência de ratos, camundongos, lagartos e do *Paramecium* é observado quando tais organismos são expostos à hipóxia e têm suas Tcs reduzidas (ARTRU e MICHENFELDER, 1981; HICKS e WOOD, 1985; MALVIN e WOOD, 1992; WOOD e STABENAU, 1998).

Além do valor adaptativo, a anapirexia também apresenta um apelo clínico. A redução da Tc é usada como terapêutica em muitos casos de pacientes que enfrentam situações nas quais o O₂ constitui um fator limitante, como hemorragia, anemia, isquemia, envenenamento, cirurgias cardíacas e traumas cranianos (SCHWAB e col., 1997; GORDON, 2001; KLINE e col., 2004). Entretanto, a forma usada para diminuir a Tc do indivíduo é a hipotermia forçada que, ao lado dos benefícios proporcionados, apresenta uma desvantagem em relação à anapirexia que é o aumento da taxa metabólica do paciente devido à ativação dos mecanismos de ganho de energia térmica frente ao frio. Estes mecanismos são altamente custosos e desvantajosos em situações hipóxicas (GORDON, 2001).

Apesar das importâncias adaptativa e clínica da anapirexia, os mecanismos envolvidos nesta resposta ainda são pouco conhecidos e apenas nas últimas décadas alguns de seus mediadores/moduladores foram descritos (Fig. 3). Dentre estes estão o óxido nítrico (STEINER e col., 2002), a dopamina (BARROS e col., 2004b), a serotonina (GARGAGLIONI e col., 2005) e agonistas endógenos de receptores opióides kappa (SCARPELLINI e col., 2009). Estes mediadores atuam especificamente na APO e induzem queda da Tc durante a hipóxia. Por outro lado, os receptores opióides μ e δ , também na APO, estão envolvidos no retorno da Tc ao estado eutérmico após o estímulo hipóxico (SCARPELLINI e col., 2009).

Ainda, a adenosina e o monóxido de carbono (BARROS e BRANCO, 2000; PARO e col., 2001) parecem atuar em alguma outra região no SNC para induzir e inibir, respectivamente, a anapirexia. Como pode ser notado, a anapirexia parece ser resultado de um balanço entre agentes indutores e inibidores da queda da Tc.

Steiner e colaboradores (2002) propuseram um modelo para a indução da anapirexia dependente dos sistemas intracelulares de segundos mensageiros, GMP cíclico (GMPc) e AMP cíclico (AMPc). O modelo sugere que alguns dos agentes indutores da anapirexia (óxido nítrico, serotonina, dopamina) atuem nos neurônios pré-ópticos sensíveis ao calor e aumentem as concentrações intracelulares de GMPc e AMPc, induzindo menor produção e maior perda de energia térmica, levando à queda da Tc. Ainda não há nenhum dado sobre a ativação destes segundos mensageiros pelos receptores opióides kappa.

É necessário destacar que na maioria dos estudos citados acima, especialmente aqueles relativos aos mecanismos envolvidos na indução de anapirexia em ratos, os animais foram expostos à hipóxia aguda (30-60 minutos) durante a fase de claro do dia, ou seja, durante a fase de repouso do animal. Não há nenhum dado a respeito da queda de Tc induzida por hipóxia aguda em diferentes fases do dia. Pelo que encontramos na literatura, somente há informações relativas à influência da hipóxia crônica sobre o ritmo circadiano da Tc. Apesar desse ritmo apresentar um padrão robusto (MORTOLA, 2007), foi observado em roedores (BISHOP e col., 2000) e até mesmo em humanos (BOSCO e col., 2003) submetidos à hipóxia prolongada (mais de 24h), que seus ciclos de Tc tornaram-se arrítmicos ou tiveram a amplitude diminuída, respectivamente. Ainda, Mortola e Seifert (2000) observaram redução na amplitude do ritmo circadiano da Tc quando expuseram ratos à hipóxia contínua por 7 dias.

Com base no exposto acima e sabendo que a Ta influencia a amplitude da anapirexia hipóxica (BISHOP e col., 2001), no presente estudo, a Tc, bem como o índice de perda de calor e o consumo de oxigênio foram investigados em ratos submetidos à hipóxia aguda em diferentes fases do dia e sob duas Tas diferentes.

II. Objetivos

Os objetivos do presente estudo foram:

- 1 - Verificar a possível variação da resposta anapirética de acordo com a fase do dia em que os animais são submetidos à hipóxia aguda a 26°C e a 19°C;
- 2 - Verificar o efeito da temperatura ambiente (T_a) sobre a amplitude da anapirexia hipóxica em diferentes fases do dia;
- 3 - Verificar a participação dos mecanismos de produção/conservação de calor em diferentes fases do dia na amplitude da anapirexia hipóxica em animais submetidos a 26°C e a 19°C;
- 4 - Verificar a participação dos mecanismos de produção/conservação de calor durante a exposição ao frio em diferentes fases do dia.

III. Material e métodos

1 – Animais

Os experimentos foram realizados com ratos Wistar machos (*Ratus norvegicus*) de massa corpórea entre 260 e 310g, provenientes do Biotério central do campus da UNESP de Botucatu. No Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), campus da UNESP de Jaboticabal, os animais foram acondicionados em câmaras climatizadas (Alesco, ALE 9902001, Monte Mor, SP), à temperatura ambiente (T_a) controlada de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, submetidos a um ciclo claro:escuro de 12:12 e tiveram livre acesso a água e ração. Todos os protocolos experimentais estavam de acordo com as regras da SBCAL (Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório) e foram aprovados pelo comitê de ética local da FCAV- Jaboticabal (CEBEA; protocolo 000962/10), onde os experimentos foram conduzidos.

2 – Cirurgia

Os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de 100 mg/kg de ketamina + 10mg/kg de xilasina e submetidos a uma laparotomia paramediana para inserção de um sensor armazenador de temperatura (SubCue Dataloggers, Calgary, Canadá) na cavidade abdominal. Depois da cirurgia, os animais receberam uma injeção intramuscular de antibiótico (enrofloxacina; 10mg/kg, Schering-Plough) e uma injeção subcutânea de anti-hiperalgésico (flunixinina meglumina; 2,5mg/kg, Schering-Plough) e tiveram um tempo de recuperação de, no mínimo, 3 dias antes dos experimentos.

3 – Medidas de temperatura corporal (Tc) e temperatura da pele (Tp)

Os sensores armazenadores integrados de temperatura (“dataloggers”, SubCue, Calgary, AT, CA) foram acoplados a um computador, via uma conexão óptica, e programados para a coleta de dados ao longo do experimento com leituras de temperatura a cada 5 minutos utilizando-se o programa “SubCue temperature datalogger”. Ao final dos experimentos, os *loggers* foram mais uma vez conectados a um computador para a leitura das temperaturas medidas e essas, por sua vez, foram corrigidas de acordo com as especificações contidas no manual do fabricante.

A Tp da cauda foi medida, por meio de uma câmera sensível à radiação infra-vermelho (Flir i50, Suíça), para a determinação do índice de perda de calor (IPC) que infere o grau de vasodilatação/vasoconstrição da região em questão. A técnica de termografia infra-vermelho detecta a radiação eletromagnética de comprimentos de onda do infra-vermelho emitida por um corpo e a converte em uma imagem colorida de acordo com a sua intensidade. Essa técnica tem sido comumente usada na fisiologia termal (TATTERSALL e MILSOM, 2003; TATTERSALL e col., 2004, 2009; SCOTT e col., 2008) e baseado nestes estudos, a emissividade assumida foi de 0,95 que é o valor estimado para tecidos biológicos. As tampas das câmaras experimentais que continham os animais foram deslocadas o mínimo possível para que as fotos fossem tiradas. Todas foram tiradas a uma distância de aproximadamente 20 cm do animal. Depois de determinar a Tp, o IPC foi calculado de acordo com a seguinte fórmula: $IPC = (Tp - Ta) / (Tc - Ta)$ (ROMANOSVSKY e col., 2002), sendo Tp = temperatura da pele, Ta = temperatura ambiente e Tc = temperatura corporal. Quanto mais próximo o valor do IPC for de 1 (um), maior é a dilatação do vaso e, ao contrário, quanto mais próximo de 0 (zero), maior é a constrição do vaso. Um software, Flir QuickReport, foi utilizado para a

determinação da T_p aproximadamente no mesmo ponto da cauda (final do primeiro terço; veja Figs. 11 e 16) para todos os animais e da T_a ao redor desta região.

4 – Medidas de consumo de oxigênio

As medidas de consumo de oxigênio (VO_2), para a inferência da taxa metabólica, foram realizadas por meio de respirometria fechada. A técnica consiste em registrar a alteração da porcentagem de oxigênio (O_2) dentro da câmara do animal vedada e conectada a um analisador de O_2 . O ar de dentro da câmara foi direcionado para o analisador por meio de uma bomba de sucção contida no próprio analisador, o qual estava acoplado a um sistema de aquisição de dados (Power Lab 16/30, ADInstruments, Austrália), sendo registrada a porcentagem de O_2 continuamente ao longo de 5 minutos. Em seguida, o coeficiente angular da relação entre tempo e porcentagem de O_2 foi obtido a partir do software LabChart (ADInstruments, Austrália). Este valor, corrigido pelo volume da câmara e pela massa corporal do animal, resultou no VO_2 que foi ajustado para as condições padrão de temperatura, pressão barométrica e umidade (STPD). Antes dos registros, o analisador foi calibrado com duas misturas gasosas contendo frações conhecidas de O_2 . Durante os 5 minutos em que a câmara permaneceu fechada a redução da porcentagem interna de O_2 foi de no máximo 0,5%.

5 – Protocolos Experimentais

Os animais foram aclimatados a 24-26°C antes de todos os experimentos. Para todos os protocolos, a T_c basal considerada foi a média dos 15 minutos anteriores à exposição à hipóxia. Todos os experimentos foram realizados com

animais não anestesiados e a mistura gasosa utilizada para gerar hipóxia continha 7% de O₂ e N₂ balanço (White Martins; Sertãozinho, SP).

Parte A

1 – Efeito da associação entre a hipóxia e a fase do dia sobre a Tc de ratos expostos a 26°C

Os animais foram divididos em 4 grupos: o primeiro grupo foi submetido à hipóxia 1h após o início da fase de claro (G1A); o segundo, 7h após o início da fase de claro (G2A); o terceiro, 1h após o início da fase de escuro (G3A) e o quarto, 7h após o início da fase de escuro (G4A). De quatro a seis dias após a cirurgia, cada animal do seu respectivo grupo experimental foi colocado em uma câmara (volume aproximado de 5L) ventilada com ar atmosférico umedecido (21% O₂) por uma hora e, em seguida, foi submetido à hipóxia (7% O₂) por 60 minutos, retornando à normóxia (21% O₂) por mais 60 minutos. Em seguida, cada rato foi eutanaziado com dose letal do anestésico hidrato de cloral a 10% (250mg/kg) e o sensor de temperatura retirado para a obtenção das Tcs.

2 – Efeito da associação entre a hipóxia e a fase do dia sobre a Tc de ratos expostos a 19°C

Este protocolo foi idêntico ao apresentado no item acima, exceto que os animais foram submetidos à Ta de aproximadamente 19°C cerca de uma hora antes da exposição à hipóxia, até o final do experimento. Neste caso, os grupos experimentais foram identificados como G1'A, G2'A, G3'A e G4'A em referência aos grupos G1A, G2A, G3A e G4A do protocolo anterior.

Na figura 4 dos Resultados, há uma representação do momento em que cada grupo experimental do protocolo A foi exposto à hipóxia.

Parte B

Esta segunda seção de experimentos foi realizada devido aos resultados que foram encontrados na parte A. As diferenças mais significativas foram vistas entre os grupos G1A e G3A bem como entre os G1'A e G3'A e, por isso, apenas os protocolos referentes a estes grupos foram repetidos, adicionando as medidas de consumo de oxigênio e do índice de perda de calor.

1 – Associação entre a produção/conservação de calor e a amplitude da anapirexia hipóxica em ratos expostos a 26°C em diferentes fases do dia

Os animais foram divididos em dois grupos (G1B e G3B), colocados em uma câmara experimental ventilada com ar atmosférico umedecido (21% O₂) por uma hora e em seguida, submetidos à hipóxia (7% O₂) por 60 minutos. Aqueles que foram expostos à hipóxia 1h após o início da fase de claro foram denominados G1B, e os que foram expostos à hipóxia 1h após o início da fase de escuro foram denominados G3B. Imediatamente após a hipóxia, os animais foram decaptados e os sensores de temperatura retirados para obtenção das Tcs.

O consumo de O₂ foi medido e as fotos termográficas foram tiradas imediatamente antes da exposição à hipóxia e no final do intervalo hipóxico.

2- Associação entre a produção/conservação de calor e a amplitude da anapirexia hipóxica em ratos expostos a 19°C em diferentes fases do dia

Este protocolo foi idêntico ao apresentado no item acima, exceto que os animais foram submetidos à Ta de aproximadamente 19°C cerca de uma hora antes da exposição à hipóxia, até o final do experimento. Neste caso, os grupos experimentais foram identificados como G1'B e G3'B em referência aos grupos G1B e G3B do protocolo anterior.

Na figura 8 dos Resultados, há uma representação do momento em que cada grupo experimental do protocolo B foi exposto à hipóxia.

6 – Análise dos Resultados

Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM. O efeito sobre a Tc da associação entre a hipóxia e a fase do dia em que o animal foi submetido a esta condição em ambas as Tas, foi avaliado por análise de variância de duas vias (*two-way ANOVA*; fatores: Tempo e Fase do dia) para medidas repetidas. O efeito da Ta sobre a amplitude da anapirexia hipóxica em diferentes fases do dia também foi avaliado por *two-way ANOVA* para medidas repetidas (fatores: Tempo e Temperatura ambiente). As diferenças entre as médias foram acessadas pelo teste *post-hoc* Bonferroni. O intervalo hipóxico (0-60 min) e o retorno à normóxia (65-120 min) foram analisados separadamente.

A comparação entre os valores de VO_2 , Tc e IPC entre os grupos normóxicos (G1B_{nor} vs G3B_{nor}; G1'B_{nor} vs G3'B_{nor}; G1B_{nor} vs G1'B_{nor} e G3B_{nor} vs G3'B_{nor}), bem como entre os grupos hipóxicos (G1B_{hip} vs G3B_{hip} e G1'B_{hip} vs G3'B_{hip}) e entre os pares (G1B_{nor} vs G1B_{hip}; G3B_{nor} vs G3B_{hip}; G1'B_{nor} vs G1'B_{hip} e G3'B_{nor} vs G3'B_{hip}) foi realizada por teste *t-student*.

As análises foram feitas usando o programa Graphpad Prism® 5.0 e foram consideradas diferenças significativas entre as médias para $p \leq 0,05$.

IV. Resultados

Parte A

1 – Variação diária da Tc

Na Fig. 4 é apresentada a variação da Tc ao longo de 24h, dos animais utilizados nos protocolos da Parte A do presente estudo. As Tcs plotadas nesta curva são as do dia anterior ao respectivo experimento.

Durante a maior parte da fase de claro, a Tc permaneceu sem muita alteração, aumentando gradualmente a partir das últimas horas desta fase e atingindo seu pico nas primeiras horas do escuro, quando se iniciou uma redução gradual da Tc que perdurou até o final desta fase, atingindo novamente a constância e reiniciando o ciclo.

Fig 4. Curva da variação diária da Tc dos animais utilizados nos protocolos da Parte A (1 e 2) do presente estudo. Esta curva refere-se à variação da Tc no dia anterior ao experimento. No dia do experimento, 1 hora antes da exposição à hipóxia os ratos foram expostos à temperatura relativa ao seu protocolo: G1, G2, G3 e G4 a 26 °C e G1', G2', G3' e G4' a 19°C. As setas indicam os momentos de exposição à hipóxia. As barras branca e preta indicam a duração das fases de claro e de escuro, respectivamente.

2 – Efeito da associação entre a hipóxia e a fase do dia sobre a Tc de ratos expostos a 26°C

Na figura 5 são apresentadas as respostas anapiréticas dos 4 grupos de animais que foram submetidos à hipóxia a 26°C. Exposição a 7% O₂ causou redução significativa na Tc dos animais de todos os grupos (efeito do Tempo: $p < 0,0001$). Entretanto, os animais do grupo G3A apresentaram maior queda na Tc em relação a G1A e G4A (efeito da Fase do dia: $p < 0,05$; interação entre Fase do dia e Tempo: $p < 0,0001$). Foram encontradas diferenças significativas entre G1A e G3A aos 40, 45, 50, 60 ($p < 0,05$) e 55min ($p < 0,01$) e entre G3A e G4A aos 50, 55 e 60min ($p < 0,05$).

O retorno à normóxia causou aumento significativo na Tc dos animais de todos os grupos (efeito do Tempo: $P < 0,0001$) de forma semelhante.

Fig. 5. Efeito da exposição à hipóxia (7%O₂) em diferentes fases do dia (grupos experimentais: G1A, G2A, G3A e G4A) sobre a Tc de ratos mantidos em temperatura ambiente (Ta) de 26°C. Números entre parênteses: número de animais. O traço horizontal na parte inferior do gráfico indica o tempo em que os animais permaneceram sob hipóxia.

3 – Efeito da associação entre a hipóxia e a fase do dia sobre a Tc de ratos expostos a 19°C

A hipóxia reduziu significativamente a Tc de todos os animais (efeito do Tempo: $p < 0,0001$) expostos a 19°C (Fig. 6). Contudo, houve diferença na intensidade da resposta entre os grupos experimentais (efeito da Fase do dia: $p < 0,05$; interação entre Fase do dia e Tempo: $p < 0,005$). Os animais do grupo G1'A tiveram suas Tcs menos reduzidas que os do grupo G2'A nos tempos 35 e 40min ($p < 0,05$) e menos que aqueles do grupo G3'A nos tempos 20, 25, 30, 35 ($p < 0,01$) e 40min ($p < 0,05$). E, por fim, houve diferença na redução da Tc entre os animais dos grupos G3'A e G4'A aos 25 min ($p < 0,05$).

No retorno à normóxia, houve aumento significativo da Tc (efeito do Tempo: $p < 0,0001$) de forma semelhante entre os grupos.

Fig. 6. Efeito da exposição à hipóxia (7%O₂) em diferentes fases do dia (grupos experimentais: G1'A, G2'A, G3'A e G4'A) sobre a Tc de ratos mantidos em temperatura ambiente (Ta) de 19°C. Números entre parênteses: número de animais. O traço horizontal na parte inferior do gráfico indica o tempo em que os animais permaneceram sob hipóxia.

4 – Efeito da temperatura ambiente sobre a queda da Tc frente a hipóxia em diferentes fases do dia

Na figura 7 está apresentada a comparação das respostas anapiréticas dos ratos nas diferentes temperaturas ambientes (19 e 26°C; Tas) a que foram expostos durante os experimentos. A queda da Tc foi significativamente mais acentuada nos ratos expostos a 19°C que nos expostos a 26°C em todos os grupos (efeito do Tempo: $p < 0,0001$; efeito da Ta: $p < 0,01$). O aumento de Tc durante o retorno à normóxia, após exposição à hipóxia, apresentou um perfil variável dependendo da fase do dia. Entre os grupos G1A e G1'A e G3A e G3'A não há diferença significativa nas Tcs no final do retorno à normóxia (para ambas as comparações: efeito do Tempo: $p < 0,0001$; efeito da Ta: $p > 0,05$). Já nos grupos G2A e G4A, as Tcs dos ratos foram menores no retorno à normóxia quando expostos a 19°C do que a 26°C (para ambas as comparações: efeito do tempo: $p < 0,0001$; efeito da Ta: $p < 0,01$).

Pode-se notar que G1'A teve uma redução na Tc da ordem de 3,9°C e sua Tc final foi aproximadamente 36°C, enquanto que para os G1A, a redução foi de 2,3°C e a Tc final também foi próxima de 36°C. Os animais do G2'A apresentaram queda média de 4,5°C e não ultrapassaram 35,4°C ao final da normóxia, ao passo que os G2A tiveram reduções de apenas 2,4°C e atingiram 36,3°C ao final do experimento. Da mesma forma, a Tc dos G3'A foi reduzida em média 4,7°C e apresentaram Tc final de 35,5°C, entretanto os animais do G3A apresentaram as maiores reduções nas Tcs quando comparadas aos outros grupos mantidos a 26°C (3,26°C vs 2,36°C em média) e atingiram 36°C ao final do retorno a 21% de O₂, semelhantemente àquela apresentada pelos G3'A. Quanto aos animais do G4'A, suas Tcs também foram reduzidas em média 4,5°C e, de forma parecida aos G2'A e

G3'A, apresentaram Tc final de 35,1°C, mas nos animais do G4A a redução foi de 2,3°C e a Tc final apresentada por este grupo foi em média 36°C.

Fig. 7. Efeito da temperatura ambiente (19 e 26°C) sobre a queda da Tc de ratos submetidos à hipóxia em diferentes fases do dia. Números entre parênteses: número de animais. O traço horizontal na parte inferior do gráfico indica o tempo em que os animais permaneceram sob hipóxia. Os valores plotados são os mesmos das figuras 5 e 6.

Parte B

1 – Variação diária da Tc

Na figura 8 está representada a variação da Tc ao longo de 24h, dos animais utilizados na parte B do presente estudo. As Tcs plotadas nesta curva são as do dia anterior ao respectivo experimento. Pode se observar que houve um aumento gradual na Tc no final da fase de claro até que o pico fosse atingido durante a fase de escuro. Em seguida, houve uma redução gradual da Tc até o início da fase de claro, quando foram encontrados os menores valores de Tc.

Fig 8. Curva da variação diária da Tc dos animais utilizados nos protocolos da Parte B (1 e 2) do presente estudo. Esta curva refere-se à variação da Tc no dia anterior ao experimento. No dia do experimento, 1 hora antes da exposição à hipóxia os ratos foram expostos à temperatura relativa ao seu protocolo: G1 e G3 a 26°C e G1' e G3' a 19°C. As setas indicam os momentos de exposição à hipóxia. As barras branca e preta indicam a duração das fases de claro e de escuro, respectivamente.

2 – Associação entre a produção/conservação de calor e a amplitude da anapirexia hipóxica em ratos expostos a 26°C em diferentes fases do dia

Na figura 9, é possível notar que o consumo basal de O_2 ($\text{mL kg}^{-1} \text{min}^{-1}$ STPD) dos animais do G3B ($22,4 \pm 0,9$) é significativamente maior que o do G1B ($18,7 \pm 0,8$; $p < 0,05$). Apesar desta diferença na taxa metabólica, a Tc é muito semelhante entre os grupos ($p > 0,05$; Fig. 9) e o IPC, apesar de parecer menor (indicando maior vasoconstrição) no G1B também não difere entre os animais (Fig. 9 e 10; $p > 0,05$).

A hipóxia causou uma redução significativa tanto no VO_2 (Figs. 9 e 10; $p < 0,01$ para $G1_{\text{nor}}$ vs $G1_{\text{hip}}$ e $p < 0,0001$ para $G3_{\text{nor}}$ vs $G3_{\text{hip}}$) quanto na Tc ($^{\circ}\text{C}$; Fig. 9 e 10; $p < 0,0001$ para $G1_{\text{nor}}$ vs $G1_{\text{hip}}$ e $G3_{\text{nor}}$ vs $G3_{\text{hip}}$) dos dois grupos. Entretanto houve apenas uma tendência destas reduções serem maiores no G3B que no G1B

(Fig. 10; G3B: $-11,76 \pm 1,78$ para VO_2 e $-3,2 \pm 0,2$ para Tc; G1B: $-10,0 \pm 2,37$ para VO_2 e $-2,7 \pm 0,2$ para Tc).

Embora, os animais após submissão à hipóxia pareçam estar vasodilatados, o IPC, em ambos os grupos, não foi alterado significativamente pela exposição à baixa pressão parcial de O_2 (Fig. 9, 10 e 11; $p > 0,05$ para G1B_{nor} vs G1B_{hip} e G3B_{nor} vs G3B_{hip}).

Como pode ser notado pelas Figs 9, 10 e 12i, a hipóxia causou alteração da Tc nos animais de G1B e G3B, mas esta alteração não foi estatisticamente diferente entre os grupos (Fig. 12i; efeito do Tempo: $p < 0,0001$; efeito da Fase do dia: $p > 0,05$).

Comparando as amplitudes das respostas anapiréticas dos animais dos experimentos da Parte A (G1A e G3A) com seus respectivos grupos da Parte B (G1B e G3B), foi verificado que os animais G1B apresentaram queda na Tc levemente maior que os animais do G1A (Fig. 12ii; efeito do Tempo: $p < 0,0001$), enquanto as quedas de Tc dos G3A e G3B foram muito semelhantes (Fig 12iii). Além disso, os animais do G1B apresentam, em média, Tc basal aproximadamente $0,4^\circ\text{C}$ menor que aqueles do G1A.

□ G1B - 1h após o início da fase de claro, Parte B (5) □ G1B - 1h após o início da fase de claro, Parte B (5)
 ■ G3B - 1h após o início da fase de escuro, Parte B (10) ■ G3B - 1h após o início da fase de escuro, Parte B (10)

Fig. 9. Consumo de O₂ (VO₂), temperatura corporal (T_c) e índice de perda de calor (IPC) no início das fases de claro (G1B) e de escuro (G3B). Normóxia: valores pré-exposição à hipóxia. Hipóxia: valores ao final da exposição a 7% de O₂. Todos os animais foram mantidos a 26°C durante os experimentos. Número de animais entre parênteses. Efeito da fase do dia: *p< 0,05; Efeito da hipóxia: #p< 0,01 e ##p< 0,0001.

Fig 10. Variação do consumo de O₂ (ΔVO₂), da temperatura corporal (ΔT_c) e do índice de perda de calor (ΔIPC) de animais expostos à hipóxia a 26°C no início das fases de claro (G1B) e de escuro (G3B). Valores entre parênteses: número de animais.

Fig 11. Figuras termográficas representativas dos grupos mantidos a 26°C. As imagens foram adquiridas logo antes da exposição à hipóxia e no final do intervalo hipóxico. As setas indicam o local da cauda cuja temperatura foi considerada para o cálculo do índice de perda de calor.

Fig. 12. i) Efeito da exposição à hipóxia (7%O₂) em diferentes fases do dia (grupos experimentais: G1B e G3B) sobre a Tc de ratos mantidos em temperatura ambiente (Ta) de 26°C. ii) Comparação das repostas anapiréticas entre os ratos G1A e G1B. iii) Comparação das repostas anapiréticas entre os ratos G3A e G3B. Os dados de G1A e G3A são os mesmos plotados na figura 5. Números entre parênteses: número de animais. O traço horizontal na parte inferior do gráfico indica o tempo em que os animais permaneceram sob hipóxia.

3 – Associação entre a produção/conservação de calor e a amplitude da anapirexia hipóxica em ratos expostos a 19°C em diferentes fases do dia

O consumo de oxigênio basal, embora não tenha sido estatisticamente diferente, tende a ser maior nos animais submetidos ao frio quando comparado ao daqueles animais mantidos a 26°C. Esse aumento parece ser maior nos ratos G1'B em relação aos G1B. A Tc não foi alterada pelo frio e o IPC parece ser menor nos

animais mantidos a 19°C e, de fato é ($p < 0,05$) quando se observa os G3'B em relação aos G3B (Fig. 13).

Quando se compara apenas os animais expostos ao frio, o VO_2 normóxico não difere entre os grupos (Fig. 14; $p > 0,05$; G1': $21,8 \pm 1,73$; G3': $23,16 \pm 0,64$) assim como a T_c e o IPC (Fig. 14; $p > 0,05$). A exposição à hipóxia reduziu o VO_2 ($\text{mL kg}^{-1} \text{ min}^{-1} \text{ STPD}$) e a T_c ($^{\circ}\text{C}$) nos dois grupos (Fig. 14 e 15; $p < 0,0001$ para G1'B_{nor} vs G1'B_{hip} e G3'B_{nor} vs G3'B_{hip}) de maneira semelhante ($p > 0,05$, Fig. 14 e 15), ao passo que a T_c dos animais do G3'B foi mais reduzida que a dos G1'B ($p < 0,05$; Fig. 15; G3'B: $-4,86 \pm 0,17$; G1'B: $-4,10 \pm 0,1$). Em relação ao ICP, este não foi alterado pela hipóxia em nenhum grupo (Fig 14, 15 e 16; $p > 0,05$ para G1'B_{nor} vs G1'B_{hip} e G3'B_{nor} vs G3'B_{hip}).

Na figura 17i é possível observar que a diferença na queda da T_c (aproximadamente $0,9^{\circ}\text{C}$), no final da exposição à hipóxia, entre os animais do G1'B e G3'B é semelhante àquela encontrada entre G1'A e G3'A (aproximadamente 1°C ; Fig 6). As amplitudes das respostas anapiréticas entre G1'A e G1'B são muito parecidas e entre G3'A e G3'B são praticamente idênticas (Fig. 17ii e 17iii).

Fig 13. Efeito da exposição a 19°C sobre consumo de O₂ (VO₂), temperatura corporal (T_c) e índice de perda de calor (IPC) dos animais no início das fases de claro (G1B e G1'B) e de escuro (G3B e G3'B). Todos os dados plotados são referentes ao intervalo normóxico, ou seja, são os valores basais. Os dados de G1B e G3B são os mesmos da figura 9 e os de G1'B e G3'B são os mesmos da figura 14. Valores entre parênteses: número de animais. Efeito da temperatura ambiente (Ta): † = p < 0,05 para G3B_{nor} vs G3'B_{nor}.

□ G1'B - 1h após início da fase de claro, Parte B (8)
 ■ G3'B - 1h após o início da fase de escuro, Parte B (8)

Fig. 14. Consumo de O₂ (VO₂), temperatura corporal (Tc) e índice de perda de calor (IPC) no início das fases de claro (G1'B) e de escuro (G3'B). Normóxia: valores pré-exposição à hipóxia. Hipóxia: valores ao final da exposição a 7% de O₂. Todos os animais foram mantidos a 19°C durante os experimentos. Número de animais entre parênteses. Efeito da fase do dia: *p= 0,05. Efeito da hipóxia: ##p< 0,0001.

□ G1' - 1h após início da fase de claro, Parte B (8)
 ■ G3' - 1h após o início da fase de escuro, Parte B (8)

Fig 15. Variação do consumo de O₂ (ΔVO₂), da temperatura corporal (ΔTc) e do índice de perda de calor (ΔIPC) de animais expostos à hipóxia a 19°C no início das fases de claro (G1'B) e de escuro (G3'B). Valores entre parênteses: número de animais. Efeito da fase do dia: *p= 0,05.

Fig 16. Figuras termográficas representativas dos grupos mantidos a 19°C. As imagens foram adquiridas logo antes da exposição à hipóxia e no final do intervalo hipóxico. As setas indicam o local da cauda cuja temperatura foi considerada para o cálculo do índice de perda de calor.

Fig. 17. i) Efeito da exposição à hipóxia (7%O₂) em diferentes fases do dia (grupos experimentais: G1'B e G3'B) sobre a Tc de ratos mantidos em temperatura ambiente (Ta) de 19°C. ii) Comparação das repostas anapiréticas entre os ratos G1'A e G1'B. iii) Comparação das repostas anapiréticas entre os ratos G3'A e G3'B. Os dados de G1'A e G3'A são os mesmos plotados na figura 6. Números entre parênteses: número de animais. O traço horizontal na parte inferior do gráfico indica o tempo em que os animais permaneceram sob hipóxia.

V. Discussão

Parte A

Efeito da associação entre a hipóxia e a fase do dia sobre a Tc de ratos expostos a 26°C e a 19°C

O presente estudo mostrou que dependendo da fase do dia (Fig. 5 e 6) e da temperatura ambiente (Ta; Fig. 7) na qual o animal é exposto à hipóxia, a reposta anapirética pode ter intensidade diferente.

Animais de hábitos noturnos, como os ratos, apresentam valores mais altos de temperatura corporal (Tc) durante a fase de escuro e mais baixos durante a fase de claro ou durante a noite e o dia subjetivos, respectivamente, se estiverem em livre-curso (MORTOLA e SEIFERT, 2000). Desta forma, a variação de Tc ao longo de 24h registrada nos animais utilizados neste estudo (Fig. 4 e 8) está de acordo com a literatura.

A Tc é uma das variáveis fisiológicas que tem ritmo diário ou circadiano com padrão robusto e influencia muitas outras variáveis. Além disso, o ritmo pode ser também influenciado por vários fatores como a hipóxia crônica. Mortola e Seifert (2000) demonstraram que a amplitude do ritmo de Tc de ratos, sincronizados ou em livre-curso, é alterada pela exposição à hipóxia (10,5% O₂) por 7 dias. Neste caso, logo que os animais são expostos à baixa pressão parcial de O₂, a Tc é reduzida e alcança os menores valores por volta da 12^a hora, aumentando gradualmente em seguida até atingir os maiores valores por volta da 24^a hora. Estes maiores valores durante a hipóxia crônica são similares aos menores observados durante a normóxia. Nos dias seguintes (3^o-7^o dia), o ritmo reaparece, mas com uma amplitude menor (Mortola e Seifert, 2000). Outro estudo relatou resultado semelhante em

humanos adultos, em que a exposição a 13% de O₂ por aproximadamente 24h reduziu as amplitudes dos ritmos das temperaturas timpânica e abdominal (BOSCO e col., 2003). Diferentemente de Mortola e Seifert (2000), Bishop e colaboradores (2000) relataram arritmicidade da Tc em ratos expostos à hipóxia (10% O₂) por 63h. Por outro lado, nenhuma evidência existia a respeito do efeito da hipóxia sobre a Tc associado à fase do dia em que o animal é submetido a esta condição.

No presente estudo, verificamos que ratos mantidos a 26°C e expostos à hipóxia por uma hora no início da fase de escuro (G3A; Fig.5) apresentaram maior redução em suas Tcs em relação aos animais dos outros três grupos mantidos sob a mesma Ta. Um perfil parecido foi observado também nos animais submetidos à hipóxia sob 19°C (Fig. 6). Entretanto, o perfil das respostas de G2A e G4A foi diferente do apresentado por G2'A e G4'A. Os primeiros apresentaram amplitudes anapiréticas semelhantes ao G1A (Fig. 5), enquanto aqueles mantidos sob Tas subtermoneutras apresentaram amplitudes próximas à do G3'A (Fig. 6). As razões de todas estas diferenças parecem ser os mecanismos termorreguladores predominantes em cada fase do dia em que o animal é submetido à baixa pressão parcial de O₂. Segundo Refinetti (2003; Fig. 1), os ritmos de produção de calor, Tc e perda de calor em ratos são deslocados, sendo que o pico da termogênese precede o pico da Tc que, por sua vez, é seguido pelo pico da perda de calor. Observando a figura 4, é possível assumir que o pico da Tc dos animais utilizados neste estudo, ocorre logo nas primeiras horas da fase de escuro. Então, a produção de calor dos animais expostos à hipóxia no início desta fase e mantidos a 26°C, provavelmente, era muito próxima do valor máximo diário e, a perda de calor possivelmente ainda não era máxima, mas tendia a este ponto. Dessa forma, a inibição da termogênese (MORTOLA e GAUTIER, 1995; MORTOLA e FEHER, 1998; FENELON e col., 2000;

BARROS e col., 2001) associada à ativação da perda de calor (TATTERSALL e MILSOM, 2003) promovidas pela hipóxia teriam um efeito mais pronunciado no início da fase de escuro em comparação aos outros grupos em que a termogênese não está tão ativada e a perda de calor já tende a ser menor (REFINETTI, 2003).

É interessante notar que há evidências de ritmicidade do óxido nítrico na glândula pineal e nos núcleos supraquiasmáticos (NSQ) de ratos (SPESSERT e RAPP, 2001; MITOME e col., 2001). Mitome e colaboradores (2001) encontraram as maiores concentrações de nitrito extracelular (NO_2^- ; produto oxidado do óxido nítrico) nos NSQ durante as primeiras horas de escuro. Outro estudo sugeriu ritmicidade na produção de dinorfina, um agonista endógeno de receptor opióide kappa. Przewlocki e colaboradores (1983) encontraram um pico noturno na imunorreatividade à dinorfina na região hipotalâmica em ratos. Considerando que o óxido nítrico e os agonistas endógenos de receptores opióides kappa atuam na área pré-óptica do hipotálamo (APO) como indutores da anapirexia hipóxica (STEINER e col., 2002; SCARPELLINI e col., 2009) e que os NSQ são localizados muito próximos à APO, além de haver conexões neurais entre estas duas regiões (WATTS e col., 1987), é possível que a maior concentração de tais mediadores químicos durante a noite contribua para a maior queda na Tc frente à hipóxia no início da fase de escuro (G3A).

Ainda considerando a figura 4 e os experimentos de Refinetti (2003), os menores valores de Tc observados nos animais do presente estudo são encontrados nas primeiras horas da fase de claro. Então, os animais que foram submetidos à hipóxia no início desta fase, provavelmente apresentavam mecanismos de produção e de perda de calor pouco ativados e, assim, a inibição da termogênese pela hipóxia não teria um efeito tão pronunciado sobre a queda da Tc, bem como a vasodilação,

também induzida pela hipóxia, deve ter sido menor que aquela ocorrida nos animais do G3A, nos quais a dilatação deve ter sido facilitada pela fase do ritmo diário de perda de calor (início da noite).

Sabe-se que a atividade do tecido adiposo marrom (TAM) apresenta ritmo ultradiano e que esta ativação é maior durante a fase de escuro (CLOSA e col. apud OOTSUKA e col., 2009), provavelmente contribuindo para o aumento da T_c característico desta fase (OOTSUKA e col, 2009). Além disso, este tecido, apesar de constituir apenas 1% da massa corpórea, pode aumentar substancialmente a taxa metabólica do animal todo (CANNON e NEDERGAARD, 1998). Desta forma, é razoável pensar que este tecido deveria estar mais ativo nos animais no início da noite (G3A), quando tiveram resposta anapirética mais acentuada. Em relação aos animais do G2A, estes poderiam estar numa fase de preparação para o aumento da capacidade termogênica (início do aumento das atividades simpática, enzimática e mitocondrial) no TAM, mas ainda apresentavam taxa metabólica semelhante aos do G1A (início da manhã) e, por isso, suas amplitudes anapiréticas foram parecidas (Fig. 5). A respeito do G4A, sugerimos que a capacidade termogênica tendia ao mínimo nestes animais e a taxa metabólica também deveria ser mais parecida com as do G1A que com as do G3A e, portanto, as amplitudes das quedas de Tcs foram próximas (Fig. 5).

Em relação aos animais expostos à hipóxia durante o frio (Fig. 6), foi observado que as primeiras horas das fases de claro e de escuro também são críticas para a amplitude da resposta anapirética, assim como encontrado nos animais submetidos a 26°C (Fig. 5). A explicação para esta diferença novamente parece ser o efeito da hipóxia sobre a termogênese que já deve estar próxima dos valores máximos no início da fase de escuro além do TAM também ter sido

estimulado pelo frio, via termorreceptores cutâneos, contribuindo para o aumento da taxa metabólica (NAKAMURA e MORRISON, 2007). Os animais submetidos ao frio no início da noite (G3'A) provavelmente apresentavam um índice de perda de calor menor em relação àqueles a 26°C (G3A) devido à vasoconstrição induzida pelo frio. Entretanto, por esta ser uma fase do dia cuja tendência é aumentar a perda de calor, os mecanismos envolvidos nesta perda devem ter facilitado tal resposta quando ela foi induzida pela hipóxia e, dessa forma, possivelmente contribuiu pra uma maior queda na Tc nos G3'A. Além disso, ainda há a possibilidade do óxido nítrico e de agonistas endógenos de receptores opióides kappa atuarem na APO colaborando para a maior queda da Tc vista nos animais G3'A, uma vez que já foi demonstrado que maiores concentrações destes modulares da anapirexia (STEINER e col., 2002; SCARPELLINI e col., 2009) são encontradas durante a fase de escuro nos NSQ e na APO, respectivamente (PRZEWLOCKI e col., 1983; MITOME e col., 2001).

Diferentemente do que acontece com os G2A e G4A, os G2'A e G4'A apresentam amplitudes semelhantes àquela do G3'A (Fig. 6). Talvez estas diferenças sejam devido à capacidade termogênica intermediária nestes animais, associada a um efeito estimulador do frio sobre o TAM (CANNON e NEDERGAARD, 1998).

Nossos resultados ainda demonstram que os animais submetidos a 7% de O₂ a 19°C tiveram uma maior amplitude na queda da Tc em comparação àqueles expostos à hipóxia a 26°C, independente da fase do dia (Fig 7), ou seja, a Ta interfere na amplitude da resposta anapirética em qualquer momento do dia. Esta influência da Ta pode ser explicada pela inibição, induzida por hipóxia, da termogênese que já deve ser mais alta nestes animais devido à ativação do TAM pelo frio. Além disso, o gradiente para troca de calor entre o animal e um ambiente

com temperaturas subtermoneutras é maior do que entre o animal e um ambiente termoneutro. Desta forma, a redução da T_c induzida pela hipóxia, via inibição da produção de calor (mesmo durante o frio; MORTOLA e GAUTIER, 1995; MORTOLA e FEHER, 1998; BARROS e col., 2001) e ativação da perda de calor (TATTERSALL e MILSOM, 2003), é facilitada em ambientes com baixas T_a s.

Em relação ao retorno à normóxia, observou-se que a T_c dos grupos G2' e G4' (expostos a 19°C) não voltou aos mesmos valores que os animais expostos a 26°C, o que não ocorreu com os grupos G1 e G1' e G3 e G3' (Fig. 7). Parece que quanto maior a redução da T_c durante a hipóxia, maior é o tempo necessário até que ela retorne aos valores basais após o final da exposição a 7% de O_2 . Os animais que tiveram quedas na T_c da ordem de 4°C (G1, G2, G3, G4 e G1') atingiram T_c s de, no mínimo, 36°C aos 60 minutos de retorno à normóxia, enquanto que os animais que apresentaram reduções da ordem de 4,5°C (G2', G3' e G4') tiveram T_c s menores do que 36°C ao final do experimento.

Parte B

Nesta segunda parte do estudo foi testada a hipótese de que a maior amplitude da anapirexia hipóxica no início da fase de escuro (Fig. 5 e 6) deveria ser resultado da inibição da termogênese mais elevada durante esta fase, bem como, da facilitação da vasodilatação, também característica deste momento do dia.

1) Associação entre a produção/conservação de calor e a amplitude da anapirexia hipóxica em ratos expostos a 26°C em diferentes fases do dia

Os protocolos relativos à Ta de 26°C foram repetidos para os grupos G1 (1 h após o início da fase de claro) e G3 (1 h após o início da fase de escuro) e estes foram denominados G1B e G3B a fim de evitar confusão com os grupos G1A e G3A referentes aos experimentos da Parte A.

Na figura 8, observa-se que a variação da Tc, ao longo de 24h, dos animais da parte B também estão de acordo com o esperado para animais de hábito noturno (MORTOLA e SEIFERT, 2000). Quanto à figura 9, é possível verificar que o VO₂ basal dos animais no início da noite (G3B) é maior que daqueles do início da manhã (G1B), apesar da Tc ser igual nos dois grupos. A hipóxia reduziu a taxa metabólica dos animais de ambos os grupos e houve uma tendência desta redução ser maior no G3B. Esta tendência parece se refletir na aparente maior queda da Tc neste mesmo grupo (Fig. 10) indicando que quanto maior a termogênese, maior a queda no VO₂ induzido pela hipóxia e, portanto, maior a queda na Tc.

Observamos que a queda na Tc durante a hipóxia não diferiu estatisticamente entre os grupos, ao contrário do verificado na *Parte A* dos experimentos (Fig. 5, 9, 10 e 12i). Na figura 12iii é possível perceber que a redução da Tc de G3B foi idêntica à de G3A, enquanto que G1B apresentou Tcs mais reduzidas que G1A (Fig. 12ii). Desse modo, o fato da amplitude da resposta anapirética de G1B ter sido maior, proporcionou uma aproximação com a resposta encontrada no G3B. Uma das razões para esta maior redução nas Tcs dos ratos G1A seria a possível diferença entre a massa corpórea dos animais. Mortola e colaboradores (1994) observaram que a Tc é menos reduzida durante a hipóxia em ratos de maior massa corpórea (400g) em comparação àqueles de menor massa (50g). Entretanto, este não parece ser o caso do presente estudo, pois os animais tinham massa corpórea semelhante (260-310g).

Outra possibilidade seria uma modificação na composição da ração oferecida aos animais. Sabe-se que a metabolização de uma ração com grande porcentagem de proteína consome mais O_2 (e, portanto resulta em maior liberação de calor, alterando a termogênese) que uma ração cuja predominância seja de gordura ou de carboidrato (RANDALL e col., 1997). Desta forma, se os animais do G1B tivessem sido alimentados com uma ração mais proteica que os G1A seria justificável a diferença na queda das Tcs, mas os animais foram alimentados no biotério da UNESP de Jaboticabal com a mesma ração durante todos os protocolos experimentais.

Há ainda outras possíveis razões para as diferenças nas respostas anapiréticas entre G1A e G1B, como a variação diária da Tc ter sido diferente entre estes grupos experimentais ou o número de animais mantidos dentro de uma mesma caixa no biotério. A primeira ideia parece pouco provável, pois a variação diária da Tc entre os grupos experimentais foi semelhante (Fig. 4 e 8). Em relação à segunda sugestão, Fournier e colaboradores (2011) reportaram que quando ratos são mantidos em trio dentro das caixas, eles apresentam menor queda na Tc quando expostos à hipóxia em comparação aos animais que são mantidos em dupla. Nossas caixas continham entre 4 e 6 animais, dependendo da idade, em todos os protocolos. Desta forma, é pouco provável que o número de animais nas caixas seja a razão das diferenças encontradas entre G1A e G1B.

Além das possibilidades de influência nos nossos resultados mencionadas acima, apresentamos uma hipótese que é a que parece mais provável até o momento: o transporte dos animais entre Botucatu e Jaboticabal deve ter afetado provisoriamente os efetores de termorregulação frente à hipóxia. Esta sugestão parece plausível, pois foi encontrada uma tendência da queda da Tc ser menor

quando o intervalo de tempo decorrido entre a chegada dos animais a Jaboticabal e a cirurgia para implantação dos sensores armazenadores de Tc (tempo de aclimação) era inferior a uma semana. Os ratos do G1A passaram por tal procedimento após 6 ou 12 dias de aclimação ao biotério de Jaboticabal, e suas Tcs caíram $2,0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ e $2,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$, respectivamente. Já os animais do G1B passaram pela cirurgia no 14° ou no 28° dias após terem chegado a Jaboticabal e suas Tcs foram reduzidas em média $2,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$. Por outro lado, tanto os animais G3A quanto os G3B foram operados aleatoriamente entre 6 e 15 dias de aclimação não sendo possível detectar diferenças na amplitude das reduções das Tcs entre estes dois grupos (Fig. 12iii).

Estudos demonstram que mesmo a exposição aguda a agentes estressores, físicos ou psicológicos, é capaz de alterar as respostas fisiológicas nos animais, durante, imediatamente após ou depois de um longo tempo da exposição ao agente estressor (DAMON e col., 1986; ENDO e SHIRAKI, 2000; VALLE'S e col, 2000). Os estressores podem ser os mais diversos possíveis: temperatura, umidade, luz, barulho, água, ração, manipuladores/bioteristas ou o transporte (ROSE apud TULI e col., 1995). Especificamente sobre o transporte, foi encontrado por Sanhoury e colaboradores (1989) um aumento gradual de cortisol em cabras após 15 minutos dentro de carros não motorizados silenciosos, não motorizados barulhentos ou de vans motorizadas, indicando que tanto o transporte quanto o barulho são agentes estressores. Damon e colaboradores (1986) sugeriram que são necessários entre 3 e 5 dias para que ratos retornem ao consumo normal de água e ração após serem transferidos para diferentes tipos de caixas. Além disso, Tuli e colaboradores (1995) reportaram que o transporte de camundongos de uma sala para outra também pode ser considerado um agente estressor e, pelas observações comportamentais,

sugeriram que nem mesmo 4 dias são suficientes para completa aclimação destes animais ao novo ambiente.

Baseado no exposto acima, em relação aos nossos resultados, parece que o transporte entre os campi de Botucatu e Jaboticabal e a exposição a um novo ambiente (biotério de Jaboticabal) influenciaram temporariamente os mecanismos moduladores da anapirexia hipóxica impedindo que sua amplitude durante os primeiros dias de aclimação tivesse magnitude semelhante à que acontece a partir da segunda semana. Uma possível razão para estas diferenças encontradas é que poderia existir um tempo mínimo para aclimação, talvez uma semana, a partir do qual não há mais diferenças nas respostas.

Adicionalmente, Sato e colaboradores (1996) relataram que ratos submetidos a estresse psicológico prolongado – por serem mantidos 1h por dia durante 10 semanas junto a ratos que recebiam choque nas patas, *communication box* – tiveram suas concentrações de catecolaminas na APO medial diminuídas. Sendo a noradrenalina (NA) um mediador na APO rostromedial da vasodilatação periférica durante a anapirexia induzida por hipóxia (Osaka, 2011), talvez, nossos animais também tenham apresentado uma modulação alterada da NA nos primeiros dias de aclimação e isso tenha contribuído para que a amplitude da queda da Tc nos G1A fosse menor que nos G1B. Ainda, sabe-se que um agente estressor pode aumentar a concentração plasmática de hormônios, citocinas (TNF- α) e prostaglandinas (ELSASSER e col., 2000) e que citocinas induzem a síntese e a liberação de prostaglandinas que, por sua vez, podem atuar na APO inibindo os neurônios sensíveis ao calor com consequente elevação da Tc (revisado por BÍCEGO e col., 2007). Desta forma, um aumento na concentração de citocinas e prostaglandinas, após o transporte até Jaboticabal, poderia ser outro fator que contribuiu para a

menor amplitude da queda da Tc observada nos animais com menos tempo de aclimação.

Ainda assim, não é possível descartar a hipótese de que a diferença nas amplitudes entre G1A e G1B seja devida a uma grande variação individual entre os animais.

Vale comentar, no entanto, que embora as amplitudes da anapirexia tenham sido diferentes de acordo com o tempo de aclimação dos animais, o perfil de variação das respostas anapiréticas entre o início da manhã e o início da noite permanece o mesmo, ou seja, se os grupos forem subdivididos pela quantidade de dias em que ficaram no novo ambiente antes de passarem pela cirurgia, G3A continua apresentando maior amplitude na queda da Tc durante a hipóxia que G1A (com 6 dias de aclimação a diferença nas amplitudes foi de 1°C e com 12 dias foi de 1,24°C).

A respeito do índice de perda de calor (IPC) há uma tendência deste ser maior nos G3B (Fig. 9), confirmando nossa sugestão de que estes animais estariam numa fase do dia (início da noite) em que o ritmo da perda de calor era próximo do seu valor máximo. A hipóxia causou vasodilatação nos animais de ambos os grupos, mas não foi significativa (Fig. 9 e 10). Uma das possíveis razões para não encontrarmos diferença significativa entre a vasodilatação pré e pós-hipóxia nos animais do início da manhã (G1B) e aqueles do início da noite (G3B) é que o IPC foi mensurado no final da exposição à baixa pressão parcial de O₂, e há evidências de que a perda de calor deve ser mais importante na indução da anapirexia, no início da hipóxia (TATTERSALL e MILSOM, 2003). Provavelmente no início da exposição à hipóxia, a vasodilatação era maior em ambos os grupos, mas diferente entre eles (possivelmente maior em G3B que em G1B, já que durante a noite, a perda de calor

deve ser facilitada) e diminuiu ao final do experimento de forma a não ser encontrada diferença entre os grupos.

2 – Associação entre a produção/conservação de calor e a amplitude da anapirexia hipóxica em ratos expostos a 19°C em diferentes fases do dia

Os protocolos relativos à Ta de 19°C também foram repetidos para os animais testados no início das fases de claro e de escuro e, desta vez, eles foram denominados G1'B e G3'B, respectivamente, para diferenciá-los dos primeiros experimentos feitos sob baixa Ta (G1'A e G3'A).

Como já era esperado, o VO₂ basal destes animais é um pouco mais alto que o daqueles mantidos a 26°C e essa relação é notada, especialmente, quando os animais da fase de claro são comparados entre si (Fig. 13). Tokizawa e colaboradores (2009) encontraram resultado semelhante quando mantiveram camundongos a 20°C. Esses pesquisadores relataram que o VO₂ destes animais a 20°C foi maior que o daqueles mantidos a 27°C apenas durante a fase de claro, ou seja, durante a fase de escuro o VO₂ dos animais submetidos ao frio era praticamente o mesmo que o daqueles animais mantidos dentro da zona de conforto térmico.

O frio não alterou a Tc basal em nenhuma fase do dia, entretanto, causou vasoconstrição significativa nos animais do G3'B (Fig. 13). Assim, é interessante notar que parece haver um balanço entre os mecanismos ativados durante o frio de acordo com a fase do dia, ou seja, nos animais G1'B houve um aumento aparentemente maior na produção de calor, ao passo que a conservação (inferida pelo IPC) não foi significativamente maior. Por outro lado, nos animais G3'B, a termogênese praticamente não foi alterada (já estava mais alta), mas a conservação

de calor parece ter compensado o pouco aumento na taxa metabólica (Fig. 13). Talvez a conservação de calor por vasoconstrição já esteja próxima ao seu máximo diário no início da manhã e, por isso, o frio não foi tão efetivo sobre este mecanismo, sendo a termogênese a principal via efetora para manutenção da T_c nesta fase do dia. Em contrapartida, a vasodilatação, no início da noite, tende ao seu nível máximo e o frio, provavelmente, causou uma conservação de calor, por meio de vasoconstrição, mais eficiente, de modo que a produção de calor (altamente custosa) fosse menos ativada.

Ainda sobre o VO_2 , embora o aumento causado pelo frio não tenha sido significativo, foi suficiente para eliminar a diferença entre a taxa metabólica basal da manhã e do início da noite, observada nos animais mantidos a 26°C (Fig. 14 e 15). Desta forma, considerando que a taxa metabólica e o IPC dos animais do presente estudo eram semelhantes, esperava-se que a queda na T_c induzida pela hipóxia também fosse, mas os resultados não mostram isso (Figs 14 e 15). A partir da figura 15, observa-se que G3'B apresentou apenas uma tendência a maior queda no VO_2 , mas a redução na T_c realmente foi de maior magnitude, cerca de $0,75^\circ\text{C}$ e, os IPCs de ambos os grupos foram idênticos ao final do experimento.

Como já mencionado, a vasodilatação parece ser mais importante para a queda da T_c no início da exposição à hipóxia. Baseado nesta informação e considerando que, no início da fase de escuro, a perda de calor é quase máxima (REFINETTI, 2003, Fig. 1), tal resposta deve ter sido facilitada no início da submissão a 7% de O_2 , nos animais do G3'B, contribuindo para a maior troca de calor com o ambiente e, assim, para a maior queda de T_c neste grupo. Além disso, ainda há a possibilidade do óxido nítrico (MITOME e col., 2001) e da dinorfina

(PRZEWLOCKI e col., 1983) atuarem na APO estimulando ainda mais os mecanismos de perda de calor durante a noite.

A tendência da menor amplitude da queda da Tc nos animais que tinham menos tempo de aclimação ao biotério, vista nos animais do grupo G1B (expostos à hipóxia 1h após o início da fase de claro, a 26°C) foi menor entre os animais submetidos à hipóxia e expostos a uma Ta menor. Uma possível explicação é que tanto G1'A e G1'B quanto G3'A e, a maioria dos animais de G3'B tiveram mais de 15 dias de aclimação ao biotério antes de passarem pela cirurgia e, talvez o efeito do estresse causado pelo transporte e pela exposição a um novo ambiente sobre os mecanismos moduladores da anapirexia já fossem mais fracos (G1'A: 15 dias de aclimação, redução de $3,9 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$; G1'B: 22 ou 28 dias de aclimação, redução média de $4,2 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$; G3'A: 8 ou 15 dias de aclimação, redução de $4,8 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ e $4,7 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$, respectivamente; G3'B: 15, 23 ou 28 dias de aclimação, redução média de $4,9 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$). Adicionalmente, poderíamos sugerir que a exposição ao frio possa ser um fator de maior influência sobre o sistema termorregulador e tenha camuflado o dano causado pelo estresse do transporte e exposição ao novo ambiente.

Perspectivas:

Sabe-se que o óxido nítrico, na APO, participa da queda da Tc induzida por hipóxia (STEINER e col., 2002) e que o nitrito é encontrado em maior concentração nos NSQ durante a fase de escuro (MITOME e col., 2001). Possivelmente há uma maior concentração de óxido nítrico na APO durante a fase de escuro e isso contribui para a maior queda na Tc encontrada nos animais testados durante esta fase. Atualmente nós estamos testando esta hipótese por meio das dosagens de

nitrito e nitrato (produtos do óxido nítrico) antes, durante e após a hipóxia em diferentes fases do dia. Adicionalmente, são necessários estudos sobre a importância do ritmo da produção de dinorfina na APO para as diferentes amplitudes de respostas anapiréticas, bem como, estudos com mensurações do IPC ao longo de todo o intervalo hipóxico para testar a hipótese da maior vasodilatação, no início da exposição à hipóxia, na fase de escuro em relação à fase de claro. Ainda, são necessários experimentos que confirmem a influência do tempo de aclimação sobre a queda da Tc induzida por hipóxia.

VI. Conclusões

Com base no exposto acima, concluímos que:

1 – A magnitude da resposta anapirética frente à hipóxia aguda parece variar de acordo com a fase do dia em ratos mantidos a 26 ou a 19°C, tendendo a ser maior durante o início da fase de escuro quando o animal apresenta maior termogênese;

2 – A redução da temperatura ambiente aumenta a amplitude da anapirexia hipóxica independente da fase do dia;

3 – Os mecanismos efetores de produção e conservação de calor em normóxia são ativados diferentemente em resposta ao frio dependendo da fase do dia, sendo mais importante a termogênese durante o início da manhã e a conservação de calor durante o início da noite.

VII. Resumo

Muitos animais enfrentam situações de baixa pressão parcial de oxigênio (hipóxia) ao longo da vida, seja por condições ambientais (tocas, altas altitudes) ou clínicas (insuficiência cardíaca, respiratória ou metabólica). Sabe-se que a queda regulada da temperatura corporal (T_c), chamada anapirexia, induzida pela hipóxia tem tanto importância fisiológica quanto para a clínica, entretanto apenas nas últimas décadas alguns pesquisadores têm se dedicado mais intensamente ao estudo dos mecanismos envolvidos neste fenômeno. Estes estudos, em geral, não levaram em conta a fase do dia durante a realização dos experimentos nem durante a análise dos resultados. Considerando que a T_c apresenta um ritmo diário e circadiano com padrão robusto, é possível que a anapirexia seja alterada de acordo com o momento do dia em que o animal é exposto à hipóxia. Diante disso, tal hipótese foi testada no presente estudo e, para isso, os animais foram expostos à hipóxia em diferentes fases do dia e foi registrada a T_c , o consumo de oxigênio (VO_2) e o índice de perda de calor (IPC). Estes protocolos foram realizados sob duas temperaturas ambientes (T_a ; 26 e 19°C), pois se sabe que a anapirexia também pode ser alterada pela T_a . Em ambas T_a , foi visto que animais expostos à hipóxia no início da fase de escuro apresentam amplitude maior de queda de T_c em relação àqueles expostos no início da fase de claro e, tal diferença deve-se, ao menos em parte, à inibição induzida pela hipóxia da maior termogênese encontrada nestes animais durante a noite. O IPC mensurado no final do intervalo hipóxico parece não ter muita importância para as diferenças nas respostas anapiréticas. Além disso, todas as amplitudes anapiréticas foram maiores nos animais testados sob o frio, independente da fase do dia. Assim, os resultados indicam que a fase do dia

interfere na anapirexia induzida por hipóxia aguda e que essa resposta é maior em menores Tas em qualquer momento do dia.

VIII. Abstract

Several animals face reduced oxygen partial pressure (hypoxia) throughout their lives, due to environmental (burrows, high altitudes) or clinical conditions (cardiac, respiratory or metabolic failures). It's known that the hypoxia-induced decrease in body temperature (T_b), named anapyrexia, is a regulated process of adaptive importance. However only in the past few decades researchers have been studied the mechanisms involved in this phenomenon. These studies, in general, did not take the phase of the day into account during the experiments or during the analyses of their results. Considering that T_b shows circadian and diary rhythm with a robust pattern, it is possible that anapyrexia can be altered depending on to the moment of the day in which the animal is exposed to hypoxia. Thus, the present study tested this hypothesis exposing animals to hypoxia in different phases of day and T_b , oxygen consumption (VO_2) and heat loss index (HLI) were measured. These protocols were conducted in two ambient temperatures (T_a ; 26°C and 19°C), because it is known that anapyrexia can be altered by T_a . In both T_a s, it was observed that animals exposed to hypoxia during the beginning of the dark phase presented bigger anapyretic amplitude than those exposed during the beginning of the light phase. This difference may be due, at least in part, to the inhibition induced by hypoxia of the biggest thermogenesis found during dark phase. HLI measured at the end of the hypoxia exposure seems to have no influence in the different anapyretic responses. Moreover, the cold condition induced bigger anapyretic responses independent on the phase of day. Thus, the results indicate the phase of day influences the hypoxia-induced anapyrexia and this response is bigger in lower ambient temperatures at any moment of the light-dark cycle.

IX. Referências bibliográficas

- ALMEIDA, M. C.; STEINER, A. A.; COIMBRA, N. C.; BRANCO, L. G. S. Thermoeffector neural pathways in fever: a study in rats showing a new role of the locus coeruleus. *The Journal of Physiology*, v. 558, n. 1, p. 283-194, 2004.
- ALMEIDA, M. C.; STEINER, A. A.; BRANCO, L. G. S.; ROMANOVSKY, A. A. Neural Substrate of Cold-Seeking Behavior in Endotoxin Shock. *Plos one*, 1, e1, 2006.
- ARTRU, A. A.; MICHENFELDER, J. D. Influence of hypothermia or hyperthermia alone or in combination with pentobarbital and phenytoin on survival time in hypoxic mice. *Anesthesia and Analgesia*, v. 60, p. 867-870, 1981.
- BAO, G.; RANDHAWA, P. M.; FLETCHER, E. C. Acute blood pressure elevation during repetitive hypocapnic and eucapnic hypoxia in rats. *Journal of Applied Physiology*, v. 82, n. 4, p. 1071–1078, 1997.
- BARNAS, G. M.; RAUTENBERG, W. Shivering and cardiorespiratory responses during normocapnic hypoxia in the pigeon. *Journal of Applied Physiology*. v. 68, n.1, p. 84–87, 1990.
- .BARROS, R. C. H.; BRANCO, L. G. S. Role of central adenosine in the respiratory and thermoregulatory responses to hypoxia. *Neuroreport*, v. 11, p. 193-197, 2000.
- BARROS, R. C.; ZIMMER, M. E.; BRANCO, L. G. MILSOM, W. K. Hypoxic metabolic response of the golden-mantled ground squirrel. *Journal of Applied Physiology*, v. 91, n.2, p. 603-612, 2001.
- BARROS, R. C. H.; ABE, A. S.; CÁRNIO, E. C.; BRANCO, L. G. S. Regulation of breathing and body temperature of a burrowing rodent during hypoxic-hypercapnia. *Comparative Biochemistry Physiology A*, v. 138, p. 97–104, 2004a.
- BARROS, R. C. H.; BRANCO, L. G. S.; CÁRNIO, E. C. Evidence for thermoregulation by dopamine D1 and D2 receptors in the anteroventral preoptic region during normoxia and hypoxia. *Brain Research*, v. 1030, n.2, p.165–171, 2004b.
- BERK, M. L.; HEATH, J. E. Effects of preoptic, hypothalamic, and telencephalic lesions on thermoregulation in the lizard, *Dipsosaurus dorsalis*. *Journal of Thermal Biology*, v. 1, p. 65-78, 1976.
- BÍCEGO, K. C.; BRANCO, L. G. Discrete electrolytic lesion of the preoptic area prevents LPS-induced behavioral fever in toads. *The Journal of Experimental Biology*, v. 205, p. 3513-3518, 2002.
- BÍCEGO, K. C.; BARROS, R. C. H.; BRANCO, L. G. S. Physiology of temperature regulation: Comparative aspects. *Comparative Biochemistry Physiology*, v.147, p. 616-639, 2007.

- BICUDO, J. E. P. W.; BIANCO, A. C.; VIANNA, C. R. Adaptive thermogenesis in hummingbirds. *Journal Experimental Biology*, v. 205, p. 2267–2273, 2002.
- BISHOP, B.; SILVA, G.; KRASNEY, J.; NAKANO, H.; ROBERTS, A.; FARKAS, G.; RIFKIN, D.; SHUCARD, D. Ambient temperature modulates hypoxic-induced changes in rat body temperature and activity differentially. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 280, p. 1190-1196, 2001.
- BLATTEIS, C. M. Body temperature. In: (Eds) BLATTEIS, C. *Physiology and Pathophysiology of Temperature Regulation*. Singapore: World Scientific, 1998. p.13-22.
- BOSCO, G.; IONADI, A.; PANICO, S.; FARALLI, F.; GAGLIARDI, R.; DATA, P.; MORTOLA, J. Effects of Hypoxia on the Circadian Patterns in Men. *High Altitude Medicine & Biology*, v. 4, n.3, p. 305-318, 2003.
- BOULANT, J. A. Neuronal basis of Hammel's model for set-point thermoregulation. *Journal of Applied Physiology*, v.100, p. 1347–1354, 2006.
- BRANCO, L. G. S.; STEINER, A. A.; BÍCEGO, K. C. Regulação Endócrina da Temperatura Corporal. In: (Eds) ANTUNES-RODRIGUES, J.; MOREIRA, A. C.; ELIAS, L. L. K.; Castro, M., *Neuroendocrinologia Básica e Aplicada*. São Paulo: Guanabara Koogan, 2005. p.64-80.
- BRYAN, J. D.; HILL, L. G.; NIELL, W. H. Interdependence of acute temperature preference and respiration in the plains minnow. *Transactions of the American Fisheries Society*, v. 113, p. 557–562, 1984.
- CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Nonshivering thermogenesis and brown adipose tissue. In: (Eds) BLATTEIS, C. *Physiology and Pathophysiology of Temperature Regulation*. Singapore: World Scientific, 1998. p.63-77
- CLARK, D. J.; FEWELL, J. E.; Decreased body-core temperature during acute hypoxemia in guinea pigs during postnatal maturation: a regulated thermoregulatory response. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, v. 74, n.3, p. 331–336, 1996.
- DAMON, E. G.; EIDSON, A. F.; HOBBS, C. H.; HAHN, F. F. Effect of acclimation to caging on nephrotoxic response of rats to uranium. *Laboratory Animal Science*, v. 36, p. 24-27, 1986.
- ELSASSER, T. H.; KLASING, K. C.; FILIPOV, N.; THOMPSON, F. The Metabolic Consequences of Stress: Targets for Stress and Priorities of Nutrient Use. In: (Eds). MOBERG, G.P.; MENCH, J. A. *The biology of animal stress: Basic Principles and Implications for Animal Welfare*. United Kingdom: CABI Publishing, 2000. p.77-110.
- ENDO, Y.; SHIRAKI, K. Behavior and body temperature in rats following chronic foot shock or psychological stress exposure. *Physiology & Behavior*, v. 71, p. 263-268, 2000.

- FENELON, K.; SEIFERT, E. S.; MORTOLA, J.P. Hypoxic depression of circadian oscillations in sino-aortic denervated rats. *Respiration Physiology*, v.122, p. 61–69, 2000.
- FOURNIER, S.; JOSEPH, V.; KINKEAD, R. Influence of juvenile housing conditions on the ventilatory, thermoregulatory, and endocrine responses to hypoxia of adult male rats. *The Journal of Applied Physiology*, v. 111, p. 516-523, 2011.
- GARGAGLIONI, L. H.; STEINER, A. A.; BRANCO, L. G. S. Involvement of serotonergic receptors in the anteroventral preoptic region on hypoxia-induced hypothermia. *Brain Research*, v. 1044, p. 16-24, 2005.
- GAUTIER, H.; BONORA, M.; SCHULTZ, S. A.; REMMERS, J. E.; Hypoxia-induced changes in shivering and body temperature. *Journal of Applied Physiology*. V. 62, p. 2477–2484, 1987.
- GLOSSARY OF TERMS FOR THERMAL PHYSIOLOGY. 3ªed. *The Japanese Journal of Physiology*, v.51, n.2, 2001.
- GORDON, C. J. The therapeutic potential of regulated hypothermia. *Emergency Medicine Journal*, v. 18, p. 81-89, 2001.
- GORDON, C. J.; FOGELSON, L. Comparative effects of hypoxia on behavioral thermoregulation in rats, hamsters, and a mice. *American Journal of Physiology*, v. 260, p. 120-125, 1991.
- HAINSWORTH, F. R.; STRICKER, E. Evaporative cooling in the rat: effects of partial desalivation. *American Journal of Physiology*, v. 217, n. 2, p. 494-497, 1969.
- HAMMEL H. T. Neurons and temperature regulation. In: (Eds) YAMAMOTO, W. S.; BROBECK, J. R. *Physiological Controls and Regulations*. Philadelphia: Saunders, 1965. p. 71–97.
- HICKS, J. W.; WOOD, S. C. Temperature regulation in lizards: effects of hypoxia. *American Journal of Physiology*, v. 248, p. 595-600, 1985.
- KLINE, A. E.; MASSUCCI, J. L.; DIXON, C. E.; ZAFONTE, R. D.; BOLINGER, B. D. The therapeutic efficacy conferred by the 5-HT(1A) receptor agonist 8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin (8-OH-DPAT) after experimental traumatic brain injury is not mediated by concomitant hypothermia. *Journal of Neurotrauma*, v.21, n.2, p. 175-85, 2004.
- KLUGER, M. J. Fever: role of pyrogens and cryogens. *Physiological Review*, v. 71, p. 93-127. 1991.
- KLUGER, M. J.; KOZAK, W.; CONN, C. A.; LEON, L. R.; SOSZYNSKI, D. Role of fever in disease. *Annals of the New York Academy Sciences*, v. 856, p. 224–233, 1998.

- LEPKOVSKYA, S.; SNAPIR, N.; FURUTA, F. Temperature regulation and appetitive behavior in chickens with hypothalamic lesions. *Physiology & Behavior*, v. 3, p. 911-915, 1968.
- LILLYWHITE, H. B. Temperature selection by the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, v. 40, p. 213-227, 1971.
- LITTLE, R. A.; STONER, H.B. The measurement of heat loss from the rat's tail. *Quarterly journal of experimental physiology and cognate medical sciences*, v.53, p. 76-83, 1968.
- LÓPEZ-BARNEO, J.; PARDAL, R.; ORTEGA-SÁENZ, P. Cellular mechanisms of oxygen sensing. *Annual Review of Physiology*, v. 63, p. 259-287, 2001.
- MACKOWIAK, P. A. Concepts of fever. *Archives of Internal Medicine*, v.158, n.17, p. 1870-1881, 1998.
- MALVIN; G. M.; WOOD, S. C. Behavioral hypothermia and survival of hypoxic protozoans *Paramecium caudatum*. *Science*, v.255, p. 1423-1425, 1992.
- MARQUES, N.; MENNA-BARRETO, L. *Cronobiologia: Princípios e Aplicações*. 3ª ed. São Paulo: Edusp, 2003. p.361-368.
- MARNILA, P.; TIISKA, A.; LAGERSPETZ, K.; LILIUS, E. M. Phagocyte activity in the frog *Rana temporaria*: whole blood chemiluminescence method and the effects of temperature and thermal acclimation. *Comparative Biochemistry Physiology*, v. 111A, p. 609–614, 1995.
- MILLS, S. H.; HEATH, J. E. Anterior hypothalamic/preoptic lesions impair normal thermoregulation in house sparrows. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, v. 43, p. 125-129, 1972.
- MITOME, M.; SHIRAKAWA, T.; OSHIMA, S.; NAKAMURA, W.; OGUCHI, H. Circadian rhythm of nitric oxide production in the dorsal region of the suprachiasmatic nucleus in rats. *Neuroscience Letters*, v. 303, p.161-164, 2001.
- MORRISON, S. F.; NAKAMURA, K.; MADDEN, C. J. Central control of thermogenesis in mammals. *Experimental Physiology*, v. 93, n. 7, p. 773-797, 2008.
- MORTOLA, J. P.; MATSUOKA, T.; SAIKIA, C.; NASO, L. Metabolism and ventilation in hypoxic rats: effect of body mass. *Respiration Physiology*, v. 97, p. 225-234, 1994.
- MORTOLA, J. P.; GAUTIER, H. Interaction between metabolism and ventilation: effects of respiratory gases and temperature. In: (Eds) DEMPSEY, J. A.; PACK, A. I. *Regulation of breathing*. Nova York: Marcel De&er, 1995. p. 1011-1064.
- MORTOLA, J.P.; FEHER, C. Hypoxia inhibits cold-induced huddling in rat pups. *Respiratory Physiology*, v. 113, p. 213-222, 1998.

- MORTOLA, P.; SEIFERT, E. L. Hypoxic depression of circadian rhythms in adult rats. *Journal of Applied Physiology*, v. 88, p. 365–368, 2000.
- MORTOLA, J.P.; Hypoxia and circadian patterns. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, v. 158, p.274–279, 2007.
- NAKAMURA, K.; MORRISON, S. F. Central efferent pathways mediating skin cooling-evoked sympathetic thermogenesis in brown adipose tissue. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 292, p. R127–R136, 2007.
- NAKAMURA, K.; MORRISON, S. F. A thermosensory pathway mediating heat-defense responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v. 107, n. 19, p. 8848-8853, 2010.
- NELSON, D. L.; COX, M. M.; *Principles of Biochemistry*. 4ª ed. New York: W. H. Freeman Company, 2004. 1100p.
- NELSON, D. O.; PROSSER, C. L. Effect of preoptic lesions on behavioral thermoregulation of Green Sunfish, *Lepomis cyanellus*, and of Goldfish, *Carassius auratus*. *Journal of comparative physiology A: neuroethology, sensory, neural, and behavioral physiology*, v. 129, n.3, p. 193-197, 1979.
- OOTSUKA, Y.; DE MENEZES, R. C.; ZARETSKY, D. V.; ALIMORADIAN, A.; HUNT, J.; STEFANIDIS, A.; OLDFIELD, B. J.; BLESSING, W. W. Brown adipose tissue thermogenesis heats brain and body as part of the brain-coordinated ultradian basic rest-activity cycle. *Neuroscience*, v. 164, p. 849–861, 2009.
- OSAKA, T. Hypoxia-induced hypothermia mediated by noradrenaline and nitric oxide in the rostromedial preoptic area. *Neuroscience*, v. 179, p. 170–178, 2011.
- PARO, F. M.; STEINER, A. A.; BRANCO, L. G. Thermoregulatory responses to hypoxia after inhibition of the central carbon monoxide-heme oxidase pathway. *Journal of Thermal Biology*, v. 26, p. 339-343, 2001.
- PRZEWLOCKI, R.; KONECA, A. M; HERZ, A.; GRAMSCH, C.; REID, L. D. The opioid peptide dynorphin, diurnal rhythms and starvation. *Science*, v. 219, p. 243–248, 1983.
- RANDALL, D.; BURGGREN, W.; FRENCH, K. *Eckert Animal Physiology: Mechanisms and Adaptations*. 4ª ed. New York: W. H. Freeman Company, 1997. p.665-723.
- REFINETTI, R. Metabolic heat production, heat loss and the circadian rhythm of body temperature in the rat. *Experimental Physiology*, v. 88, n.3, p.423-429, 2003.
- REFINETTI, R. *Circadian physiology*. 2ªed. Taylor & Francis Group. 2006. 689p.
- REISSMANN, H. K.; RANIERI, V. M.; GOLDBERG, P.; GOTTFRIED, S. B.; Continuous positive airway pressure facilitates spontaneous breathing in weaning chronic

- obstructive pulmonary disease patients by improving breathing pattern and gas exchange. *Journal of Intensive Care Medicine*, v. 26, p. 1764–1772, 2000.
- ROMANOVSKY, A. A.; IVANOV, A. I.; SHIMANSKY, Y. P. Molecular Biology of Thermoregulation: 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.
- SANHOURI, A. A.; JONES, R. S.; DOBSON, H. The effect of different types of transportation on plasma cortisol and testosterone concentrations in male goats. *British Veterinary Journal*, v. 145, n. 5, p. 446-450, 1989.
- SATINOFF, E.; RUTSTEIN, J. Behavioral thermoregulation in rats with anterior hypothalamic lesions. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, v. 71, p. 77-82, 1970.
- SATO, Y.; SUZUKI, N.; HORITA, H.; WADA, H.; SHIBUYA, A.; ADACHI, H.; TSUKAMOTO, T.; KUMAMOTO, Y.; YAMAMOTO, M. Effects of long-term psychological stress on sexual behavior and brain catecholamine levels. *Journal of Andrology*, v. 17, n. 2, p. 83-90, 1996.
- SCARPELLINI, C. S.; GARGAGLIONI, L. H.; BRANCO, L. G. S.; BÍCEGO, K. C. Role of preoptic opioid receptors in the body temperature reduction during hypoxia. *Brain Research*, v. 1286, p. 66-74, 2009.
- SCARPELLINI, C. S.; BÍCEGO, K. C. Regulação da temperatura corporal em diferentes estados térmicos: ênfase na anapirexia. *Revista da Biologia*, v. 5, p. 5-6, 2010.
- SCHMIDT-NIELSEN, K. *Animal Physiology: adaptation and environment*. 5ªed. Cambridge: Cambridge University Press, 1997. 617p.
- SCHMIDT-NIELSEN, K.; BRETZ, W. L.; TAYLOR, C. R. Panting in dogs: unidirectional air flow over evaporative surfaces. *Science*, v.169, n. 950, p.1102-1104, 1970.
- SCHWAB, M.; BAUER, R.; ZWIENER, U. Physiological effects and brain protection by hypothermia and cerebrolysin after moderate forebrain ischemia in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*, v. 49, p. 105-116, 1997.
- SCOTT, G. R.; CADENA, V.; TATTERSALL, G. J.; MILSON, W. Body temperature depression and peripheral heat loss accompany the metabolic and ventilatory responses to hypoxia in low and high altitude birds. *The Journal of Experimental Biology*. V. 211, p. 1326-1335, 2008.
- SPESSERT, R.; RAPP, M. Circadian rhythm in NO synthase I transcript expression and its photoperiodic regulation in the rat pineal gland. *NeuroReport*, v. 12, n. 426, p. 781-785, 2001.

- STEINER, A. A.; BRANCO, L. G. S. Hypoxia-induced anapyrexia: implications and putative mediators. *Annual Review of Physiology*, v. 64, p. 263-288, 2002.
- STEINER, A. A.; ROCHA, M. J. A.; BRANCO, L. G. S. A neurochemical mechanism for hypoxia-induced anapyrexia. *American Journal of Physiology*, v. 283, p. 1412-1422, 2002.
- TATTERSALL, G. J.; ANDRADE, D. V.; ABE, A. S. Heat Exchange from the Toucan Bill Reveals a Controllable Vascular Thermal Radiator. *Science*, v. 325, p. 468-470, 2009.
- TATTERSALL, G. J.; MILSOM, W. K. Transient peripheral warming accompanies the hypoxic metabolic response in the golden-mantled ground squirrel. *The Journal of Experimental Biology*, v. 206, p. 33-42, 2003.
- TATTERSALL, G.; MILSOM, W.K.; ABE, A.; BRITO, S.; ANDRADE, D. The thermogenesis of digestion in rattlesnakes. *The Journal of Experimental Biology*, v. 207, p.579-585, 2004.
- TOKIZAWA, K.; UCHIDA, Y.; NAGASHIMA, K. Thermoregulation in the cold changes depending on the time of day and feeding condition: physiological and anatomical analyses of involved circadian mechanisms. *Neuroscience*, v. 164, p.1377-1386, 2009.
- TULI, J. S.; SMITH, J. A.; MORTON, D. B. Stress measurements in mice after transportation. *Laboratory Animals*, v. 29, p. 132-138, 1995.
- VALLE'S, A.; MARTÍ, O.; GARCÍA, A.; ARMARIO, A. Single exposure to stressors causes long-lasting, stress-dependent reduction of food intake in rats. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 279, p. R1138-R1144, 2000.
- WATTS, A. G.; SWANSON, L. W.; SANCHEZ-WATTS, G. Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus: I. Studies using anterograde transport of Phaseolus vulgaris leucoagglutinin in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, v. 258, n. 2, p. 204-229, 1987.
- WILLMER, P; STONE, G.; JOHNSTON I. *Environmental Physiology of Animals*. 2ª ed. Malden: Blackwell Publishing, 2005. 779 p.
- WOOD, S. C.; MALVIN, G. M. Physiological significance of behavioral hypothermia in hypoxic toads (*Bufo marinus*). *The Journal of Experimental Biology*, v. 159, p. 203-215, 1991.
- WOOD, S.C., Oxygen as a modulator of body temperature. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. v. 28, p. 1249-1256, 1995.

WOOD, S. C.; STABENAU, E. K. Effect of gender on thermoregulation and survival of hypoxic rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, v.2, n.2, p. 155-158, 1998.