

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CAMPUS SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

VICTOR MARTINS

**PARTICIPAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO DA SUBSTÂNCIA
CINZENTA PERIAQUEDUCTAL DORSOLATERAL NA FEBRE
INDUZIDA POR ESTRESSE DE CONTENÇÃO FÍSICA EM RATOS**

São Carlos

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CAMPUS SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

VICTOR MARTINS

**PARTICIPAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO DA SUBSTÂNCIA
CINZENTA PERIAQUEDUTAL DORSOLATERAL NA FEBRE
INDUZIDA POR ESTRESSE DE CONTENÇÃO FÍSICA EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas – UFSCar/UNESP para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientação: Profa. Dra. Kênia Cardoso Bicego

São Carlos

2016

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M386p Martins , Victor
Participação do óxido nítrico da substância cinzenta periaqueducal dorsolateral na febre induzida por estresse de contenção física em ratos / Victor Martins . -- São Carlos : UFSCar, 2016.
55 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2016.

1. Temperatura. 2. L-NMMA . 3. ODQ. 4. Consumo de oxigênio. 5. Índice de perda de calor. I. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Victor Martins, realizada em 31/08/2016:

Profa. Dra. Kênia Cardoso Bicego
UNESP

Prof. Dr. Daniel Breseghello Zoccal
UNESP

Profa. Dra. Evelin Capellari Carnio
USP

DEDICATÓRIA

*Dedico primeiramente a Deus,
e a todos aqueles que de alguma forma estiveram e estão próximos de mim, fazendo esta
vida valer cada vez mais a pena.*

AGRADECIMENTO

Agradeço...

A Deus, de início, porque sei que sempre esteve comigo, nunca me desamparou. Por me ensinar, mesmo com lições difíceis a viver e ser uma pessoa melhor. E por todas as vezes que confiou em mim e me iluminou nos momentos difíceis.

À minha família, especialmente minha mãe Marinez, que sempre me incentivou a estudar e procurou entender todos os caminhos que tomei desde minha graduação. Sei que pra ela foi difícil muitos dos momentos em que passamos, mas é nela que eu me fortaleço e me espelho. Minha irmã Isabela, por mais que brigamos às vezes, ela confia em mim, fazendo de tudo por mim, sem pensar duas vezes. Ao meu pai Sérgio, *in memoriam*, que entre muitas lições, me ensinou a confiar mais na minha capacidade, a ser menos tímido, não ter medo de errar, ele me deu a coragem que nunca tive antes, fazendo de tudo por mim quando vivo, sem hesitar. Sei que não está mais presente fisicamente, porém, sinto ele em todos os momentos da minha vida desde então, sinto sua força e sei que sua felicidade nesse momento é grandiosa pelo fato do filho estar concluindo mais uma importante etapa, pois, foi o que mais me incentivou, a vitória não é somente minha, mas dele também! Dedico também aos meus tios e padrinhos de Araraquara Sônia e Marco, pois nos piores momentos da minha vida se tornaram anjos e formaram meu alicerce para que eu pudesse me reerguer novamente, não poderiam imaginar o quão grato sou por isso.

Aos meus amigos de escola e de vizinhança Rafael, Marcos e Lucas por sempre estarem presentes e me apoiarem, perguntando sobre os andamentos e confiando no que eu fazia, além de inúmeras festas e conversas. Sendo que nossa amizade sempre foi e continua sendo importante pra mim, pois é verdadeira.

A minha orientadora, professora Kênia por todos os ensinamentos que me proporcionou em todos estes anos. Sinto que ela não só me ensinou aspectos acadêmicos e sim, alguns que levarei como lição de vida. Além disso, agradeço pela paciência e pela sua confiança comigo, pois sempre fui muito ansioso com meus problemas e desafios, sendo ela responsável por extrair o melhor de mim e me mostrar que sou capaz de realizar fatos que nem eu mesmo acreditava.

A minha co-orientadora, professora Luciane, por todas nossas conversas e conselhos práticos que me dava e por toda a ajuda fornecida durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao programa de pós graduação em Ciências Fisiológicas UFSCar/UNESP pelo suporte que sempre forneceu durante minhas dúvidas, e aos professores competentes e atenciosos, em especial a um dos secretários do PIPGCF, Alexandre, pela sua impressionante eficiência em atender minhas solicitações.

Aos meus amigos de laboratório Baiana, Camila, Danuzia, Elisa, Gabi, Jolene, Kassia, Laka, Lango, Lara, Lucas, Migalha, Nikito, Sheila, pois sempre quando precisei de algo os mesmos estavam presentes e me ajudavam não importa o que estivessem fazendo, sou imensamente grato e admiro a amizade que tenho com vocês! Agradeço em especial às “Caróls” pelo imenso suporte durante o desenvolvimento e finalização do suporte. A Scarpellini sabe o quanto foi essencial no começo deste trabalho! Todas as suas orientações foram precisas e importantes, obrigado minha co-co-orientadora! À Silva, agradeço imensamente também, por nossa colaboração nos projetos, por sua paciência comigo e ajuda! Sou grato demais à ela! Nesse projeto sei que tem uma parte de cada um! Pois entre análises, ajudas, sugestões, animais, cada um destes entraram um uma parte! Obrigado.

Aos técnicos do laboratório Euclides, Damares, Poá, Renata, Sheila, Gabi pelo excelente trabalho desenvolvido, culminando na realização deste trabalho.

Às pessoas que fiz grandes e duradouras amizades durante todos esse tempo de trabalho, da pós, de Jaboticabal e outras cidades, sabem que são importantes pra minha vida!

Obrigado a cada animal, mesmo que involuntariamente cedeu sua vida para que este trabalho fosse realizado com sucesso, doando suas vidas para a ciência.

RESUMO

O óxido nítrico (NO) é um neurotransmissor gasoso que apresenta importante atuação, por via dependente de GMP cíclico, em regiões do encéfalo envolvidas com termorregulação em diferentes condições como a febre induzida por agentes inflamatórios. Sabe-se que o NO também atua no encéfalo para mediar resposta febril frente a estresse de contenção física, mas não são conhecidos os seus sítios de atuação. Nesse contexto, a substância cinzenta periaquedutal dorsolateral (PAGdl) é um sítio potencial de atuação do NO, pois está envolvida em respostas de estresse e comportamentos defensivos e também em termorregulação, além de expressar grande quantidade da enzima NO sintase, que é responsável pela síntese de NO. Diante dessas considerações, a hipótese do presente trabalho foi a que o NO da PAGdl exerce modulação dependente de GMPc da resposta febril a estresse de contenção física em ratos. Para testar essa hipótese, investigou-se o efeito das microinjeções do inibidor não seletivo de NOS, L-NMMA, e do inibidor da guanilato ciclase solúvel, ODQ, na PAGdl sobre a temperatura corporal (Tc) e o índice de perda de calor (IPC; expressa a ativação de mecanismo de conservação de calor durante a febre) de ratos submetidos ou não ao estresse de contenção física. Também se verificou o efeito do L-NMMA intra PAGdl sobre o consumo de oxigênio (índice de termogênese) de ratos submetidos ao estresse de contenção física. Em condições de eutermia (sem estresse), nenhum dos tratamentos afetou a Tc e o IPC dos ratos. A Tc aumentou e o IPC reduziu durante a contenção física, tendo um grande aumento do IPC logo após o final da contenção, coincidindo com o retorno da Tc aos valores iniciais. A inibição da síntese de NO na PAG durante a contenção física causou um aumento maior da Tc quando comparado ao veículo, sem afetar o IPC. Efeito similar na Tc e no IPC foi causado pelo ODQ. O consumo de oxigênio aumentou durante a contenção física, parecendo ser maior em animais tratados com L-NMMA. Os resultados indicam que o NO na PAGdl tem um efeito antipirético sobre a febre induzida por contenção física em ratos, por inibir o efator termogênico, mas sem afetar a conservação de calor. Tal efeito parece ser dependente da via NO-GMPc.

Palavras-chave: Temperatura. L-NMMA. ODQ. Consumo de oxigênio. Índice de perda de calor.

ABSTRACT

Nitric oxide (NO) is a gaseous neurotransmitter that has an important role for cyclic GMP-dependent pathway in brain regions involved in thermoregulation in different conditions as fever-induced inflammatory agents. It is known that NO also acts in the brain to mediate fever front response to stress physical restraint, but still are not known your action site. In this context, the dorsolateral periaqueductal gray (PAGdl) is a potential site of action of NO, it is involved in stress responses, defensive behaviors and thermoregulation, and express large amounts of the enzyme NO synthase, which is responsible for the synthesis NO. Given these considerations, the hypothesis of this study was that NO exerts a role in the PAGdl cGMP-dependent modulation of the febrile response to stress of physical restraint in rats. To test this hypothesis, we investigated the effect of microinjections of the non-selective NOS inhibitor, L-NMMA, and guanylate cyclase soluble selective inhibitor, ODQ, on PAGdl on body temperature (Tc) and heat loss index (IPC; expresses the activation of heat conservation mechanism during fever) submitted or not to the stress of physical restraint. There was also the effect of L-NMMA intra PAGdl on oxygen consumption (thermogenesis index) of rats subjected to stress from physical restraint. In conditions of eutermia (no stress), none of the treatments affected the Tc and the IPC of the mice. The Tc increased and the IPC reduced during physical restraint, with a large increase in the IPC shortly after the end of the contention, coinciding with the return of Tc to the initial values. The inhibition of NO synthesis in PAG during physical containment caused a greater increase in Tc when compared to the vehicle without affecting the IPC. Similar effect on Tc and the IPC was caused by ODQ. Oxygen consumption increased during physical restraint, which were higher in animals treated with L-NMMA. The results indicate that NO in PAGdl has an antipyretic effect on physical restraint induced fever in rats by inhibiting the thermogenic effector, but without affecting the conservation of heat. This effect seems to be dependent of the NO-cGMP pathway.

Keywords: Temperature. L-NMMA. ODQ. Oxygen consumption. Heat loss index

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquemas representativos de cortes coronais da PAG.....	20
Figura 2 - Via de síntese e ação do óxido nítrico.....	22
Figura 3 - Fotomicrografia demonstrando neurônios imunorreativos à NOSn localizados na PAGdl	24
Figura 4 - Tubo de metal em forma de tela	30
Figura 5A - Fotomicrografia do encéfalo de um animal mostrando o sítio de microinjeção na PAGdl	32
Figura 5B - Desenho esquemático de cortes da PAG	33
Figura 6 - Efeito da microinjeção de LNMMA ou ODQ na PAG sobre a Tc e IPC de ratos eutérmicos	34
Figura 7 - Efeito da microinjeção de LNMMA ou ODQ na PAG sobre a Tc e IPC de ratos submetidos ao estresse de contenção física	36
Figura 8 - Efeito da microinjeção de LNMMA sobre o consumo de oxigênio em ratos submetidos ao estresse de contenção física	37
Figura 9 - Esquema demonstrando a via monossináptica glutamatérgica DMH e rRPa e a atuação da PAGdl	40

Sumário

RESUMO	6
ABSTRACT	7
1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Regulação da Temperatura Corporal	11
1.2 Recepção da Informação	11
1.3 Integração da Informação Térmica	12
1.4 Efeitos Termorreguladores.....	13
1.6 Febre por Agentes Inflamatórios/antígenos vs Febre por Estresse Psicogênico.....	16
1.7 Substância Cinzenta Periaquedutal (PAG).....	19
1.8 Óxido Nítrico (NO).....	21
2 OBJETIVO	25
3 MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 Animais.....	25
3.2 Cirurgias.....	25
3.3 Medidas da Temperatura Corporal (Tc) e Temperatura da Pele da Cauda (Tp).....	26
3.4 Medidas de Consumo de Oxigênio	27
3.5 Microinjeção	27
3.6 Procedimento Histológico.....	28
3.7 Protocolos Experimentais	28
3.7.1 Efeito da microinjeção intra-PAG de inibidor não seletivo da NOS, L-NMMA ou do inibidor da guanilato ciclase solúvel, ODQ, sobre a Tc e o IPC de ratos não submetidos a estresse de contenção.....	29
3.7.2 Efeito da microinjeção intra-PAG de inibidor não seletivo da NOS, L-NMMA ou do inibidor da guanilato ciclase solúvel, ODQ, sobre a Tc e o IPC de ratos submetidos a estresse de contenção.....	29
3.7.3 Efeito da microinjeção intra-PAG do inibidor não seletivo da NOS, L-NMMA sobre o consumo de O ₂ de ratos submetidos a estresse de contenção.	31
3.8 Análise dos Resultados	31
4 RESULTADOS	32
4.1 Histologia.....	32

4.2 Efeito da microinjeção intra PAGdl de LNMMA ou ODQ em ratos não submetidos ao estresse de contenção.....	34
4.3 Efeito da microinjeção intra PAGdl de L-NMMA ou ODQ em ratos submetidos ao estresse de contenção física.	35
4.4 Efeito da microinjeção de L-NMMA ou salina na substância cinzenta periaquedutal (PAG) sobre o consumo de <i>O</i> 2 em ratos submetidos ao estresse de contenção.	36
5 DISCUSSÃO	37
6 CONCLUSÃO	41
7 REFERÊNCIAS	42

1 INTRODUÇÃO

1.1 Regulação da temperatura corporal

A temperatura é um dos principais fatores ambientais capaz de influenciar a fisiologia animal. Assim, a habilidade de manter a temperatura corporal (T_c) constante diante de uma faixa ampla de variação da temperatura ambiente, chamada de endotermia, é uma das alterações evolutivas mais significativas envolvendo a relação ambiente e animal (HAYES e GARLAND, 1995; HENSEL et al., 1973). Diferentes mecanismos são usados para regular a T_c nos mamíferos. Os mecanismos autonômicos de conservação de energia térmica incluem a vasoconstrição periférica (diminuição do fluxo sanguíneo periférico fazendo com que ocorra uma menor perda de calor entre a superfície corporal e o ambiente) e a piloereção (aumenta o isolamento por causa da camada de ar estático entre os pelos). Já entre os mecanismos de produção de calor, podem ser definidas a termogênese obrigatória, resultante da atividade metabólica basal, e a termogênese facultativa, como resultado de ativação de tremores da musculatura esquelética e dos mecanismos independentes de tremor que podem ocorrer no tecido adiposo marrom (BÍCEGO et al., 2007).

A regulação da T_c depende diretamente da habilidade do sistema nervoso central (SNC) em reconhecer os estímulos, tanto externos (variações da T_a) quanto internos (presença de estímulos inflamatórios, como endotoxinas bacterianas, variações da T_c e integrá-los. Assim, o sistema de termorregulação consiste em 3 componentes: recepção da informação (termorreceptores), integração da informação (SNC) e reposta térmica (termoefetores) (NAKAMURA, 2011).

1.2 Recepção da informação

Para manter a T_c sem alterações diante das variações da temperatura ambiente (T_a), o sistema de termorregulação é ativado antes que ocorra alguma alteração da T_c . Quando a T_a fica mais baixa, a temperatura da pele cai rapidamente, sem que ocorra alterações importantes na temperatura encefálica ou do reto (BRATINCSÁK e PALKOVITS, 2005;

LOMAX et al., 1964; FORSTER e FERGUSON, 1952; HELLSTROM e HAMMEL, 1967). E para que uma resposta termorreguladora seja ativada antes que a T_c mude com a T_a, a informação térmica de receptores presentes na pele é levada para neurônios da principal região encefálica envolvida em termorregulação, a área pré-óptica do hipotálamo (POA). Em mamíferos, receptores de frio e de calor estão presentes na pele e internamente (ZEISBERGER, 1998; BOULANT, 1998). Além disso, há neurônios termosensíveis dentro da POA, no tronco encefálico e na medula espinhal (BOULANT, 1998; BOULANT e DEAN, 1986; MERCER e SIMON, 1984; HELFMAN et al., 1981).

A termorrecepção cutânea parece estar relacionada a canais iônicos (receptores de potencial transitório – TRPs) presentes na pele (MORRISON e NAKAMURA, 2011). Os canais TRPs são expressos em uma grande variedade de organismos, entre vermes, moscas, peixes, aves e mamíferos (MONTELL, 2005). TRPs ativados termicamente pertencem às subfamílias TRPV, TRM e TRPA. TRPM8 e TRPA1, por exemplo, parecem ser receptores ao frio e são expressos em neurônios somatossensoriais (McKEMY et al., 2002; STORY et al., 2003; BAUTISTA et al., 2007; PEIER et al., 2002). TRPV3 e TRPV4 possuem limiares de ativação entre 33-39°C e 25-34°C respectivamente (GULER et al., 2006; XU et al., 2002) e estão localizados em grande escala nos queratinócitos da epiderme (GULER et al., 2002; PEIER et al., 2002; MANDADI et al., 2009).

Em relação à detecção da temperatura interna, mecanismos termorreceptivos estão presentes em diversos órgãos incluindo o encéfalo, medula e abdômen (MORRISON e NAKAMURA, 2011). Fibras aferentes dos nervos vago e esplâncnico levam informações térmicas de receptores ao calor e frio de órgãos abdominais (nos quais possuem repostas às mudanças de temperatura semelhantes àquelas de termorreceptores cutâneos) para o SNC (GUPTA et al., 1979; RIEDEL, 1976).

1.3 Integração da informação térmica

A informação térmica da pele principalmente é transmitida para diversas regiões do SNC, entre elas pelo núcleo parabraquial lateral (LPB). O subnúcleo lateral externo do LPB (LPBe) recebe informações térmicas de frio, pois exposição a 4°C promove uma ativação de seus neurônios e esta informação é levada diretamente para a POA, majoritariamente para o núcleo pré-óptico mediano (MnPO), cujas fibras são glutamatérgicas (NAKAMURA e MORRISON, 2008). Em contrapartida neurônios do

subnúcleo dorsal do núcleo parabraquial dorsal (LPBd) são ativados após o aquecimento da pele. Esses dados demonstram a participação do LPB como uma estação para as informações térmicas vindas da periferia, via fibras aferentes, com uma segregação de informações de frio e calor e levando-as para a POA (BRATINCSAK e PALKOVITS, 2004; NAKAMURA e MORRISON, 2010). A POA, além de outras áreas do SNC, contém neurônios cuja frequência de disparos é espontânea e é alterada por mudanças locais de temperatura, porém, estes da POA e do hipotálamo anterior foram os mais estudados devido ao fato de que é necessário a integridade destas duas regiões para que ocorra as respostas termorregulatórias (HELLSTROM, 1967).

Com todas estas áreas sensíveis à variação da T_a , uma hierarquia aparece entre as estruturas que estão presentes no hipotálamo, tronco encefálico e medula espinhal. Estes dois últimos possuem uma sensibilidade às variações T_c menor quando comparadas com a POA, porém, são capazes de iniciar respostas termorreguladoras. No entanto, o papel da POA na termorregulação demonstrou ser essencial, além de integrar informações térmicas locais e periféricas, seus neurônios possuem uma maior sensibilidade às variações e se comunicam com áreas efetoras específicas para promover respostas termorregulatórias mais apropriadas (BOULANT 1998, 2000). A POA além de possuir neurônios sensíveis à variação de temperatura local, coordena respostas termorreguladoras.

Um dos modelos propostos de integração das informações térmicas e respostas efetoras se baseia na POA e suas conexões. Na área pré-óptica medial (MPO) há projeções inibitórias tônicas de neurônios sensíveis ao calor para estruturas encefálicas mais caudais como o hipotálamo dorsomedial (DMH) e o núcleo rostral da rafe palidus (rRPA). Em resposta ao frio, os neurônios da MnPO são ativados via LPBel e enviam projeções inibitórias para a MPO, inibindo seus neurônios inibitórios tônicos e ativando, via DMH e rRPA, respostas termoeletoras ao frio como vasoconstrição periférica e termogênese independente e dependente de tremor via TAM e musculatura esquelética, respectivamente (MORRISON e NAKAMURA, 2011).

1.4 Efeitores termorreguladores

Os efetores termorreguladores são classificados em autonômicos e comportamentais. Comportamentos termorreguladores são os mecanismos mais conservados durante a evolução entre vertebrados e até invertebrados como visto em

caracóis, caranguejos e muitas espécies de insetos (KAVALIERS e HIRST, 1984; McGAW, 2003; KLUGER, 1991; OUEDRAOGO et al., 2004; PIRES et al., 2002; FORSMAN et al., 2002). São atos motores presentes em animais endotérmicos e ectotérmicos, com o objetivo de maximizar ou minimizar a troca de calor do corpo com o ambiente (MORRISON e NAKAMURA, 2011). Em roedores, tais comportamentos incluem mudanças posturais como se agrupar com indivíduos da mesma espécie ou diminuir a área de contato do corpo com o ambiente em temperaturas frias, ou expondo grande parte da superfície de seu corpo ao ambiente para que uma troca de calor seja mais eficaz em caso de temperaturas mais quentes (MORRISON e NAKAMURA, 2011). Em endotérmicos, o mecanismo comportamental para termorregulação é considerado o mais eficaz dentre todos por ter o menor gasto energético e por ser mantido por um longo tempo (CABANAC, 1998).

O fluxo sanguíneo periférico também pode ser controlado centralmente como um mecanismo de termorregulação em áreas desprovidas ou com pouco pêlo, como a orelha de elefantes e coelhos e a cauda de ratos, a qual será avaliada nesse estudo. Para controlar a perda de calor para o ambiente, o fluxo sanguíneo pode ser diminuído na periferia durante exposição ao frio ou aumentado durante o calor, contribuindo como um importante fator na manutenção da T_c além de ser ativado durante a febre (vasoconstrição) (MORRISON e NAKAMURA, 2011). No controle neural do fluxo sanguíneo, já foi demonstrado que neurônios sensíveis ao calor da POA possuem eferências excitatórias para neurônios vasodilatadores da formação reticular e substância cinzenta periaquedutal (PAG) e eferências inibitórias para células nervosas vasoconstritoras da área tegumentar ventral (NAGASHIMA et al., 2000).

Aumento da atividade simpática vasoconstritora promove uma diminuição do fluxo sanguíneo em um ambiente frio (WALLIN e CHARKOUDIAN, 2007) já com o aquecimento da pele, além da vasodilatação periférica doi visto uma vasoconstrição visceral (esplâncnica e renal) sendo dependente de angiotensina (ESCOURROU et al., 1982; MINSON et al., 1999). Em ratos, a ação termorreguladora na cauda desses animais é dependente da ativação simpática vasoconstritora (WALLIN e CHARKOUDIAN, 2007; KELLOGG et al., 2007; HOLOWATZ et al., 2005; ANDERSON et al., 2006; O'LEARY et al., 1985). Neurônios pré-motores simpáticos responsáveis pela atividade vasoconstritora cutânea da cauda de ratos estão presentes em núcleos do bulbo ventromedial – núcleo rostral da rafe palidus e área parapiamidal (NAKAMURA et al., 2004; SMITH et al., 1998; RATHNER e McALLEN, 1998; TOTH et al., 2006). Neurônios controlando a termogênese do tecido marrom estão co-

localizados com aqueles que controlam o fluxo sanguíneo periférico em ratos, demonstrando que o controle de efetores termorreguladores (fluxo sanguíneo periférico e termogênese) via neurônios pré-motores simpáticos, parece ser regulado pela rRPa (MORRISON, 2001). A ativação de neurônios da rRPa promove uma vasoconstrição mesmo quando neurônios da POA são expostos ao calor. Já inibição de aferências da rRPa ou do bulbo rostral ventrolateral (RVLM) impede que a vasoconstrição periférica seja ativada na cauda de ratos durante o frio (TANAKA et al., 2002; OOTSUKA e McALLEN, 2005). Populações de pré-neurônios simpáticos envolvidos na vasoconstrição cutânea estão localizadas primariamente na rRPa, RVLM e núcleo parapiroamidal (PPy) (MORRISON e NAKAMURA, 2011).

Outro mecanismo termofetor importante na manutenção da temperatura corporal em mamíferos em diferentes Tas é a termogênese facultativa, que pode englobar quatro fontes: i) indução de aumento da taxa metabólica basal cronicamente, ex., por indução de hormônios da tireóide; ii) atividade locomotora exercida pelo trabalho muscular produzindo calor; iii) produção de calor pela ação da proteína desacopladora de prótons 1 (UCP1) do tecido adiposo marrom (termogênese independente de tremor) e iv) termogênese dependente de tremor promovida pelo músculo esquelético (*cf.* BÍCEGO et al., 2007; BICUDO et al., 2002).

O tecido adiposo marrom é composto de adipócitos contendo muitas mitocôndrias com proteínas UCP1, o calor produzido por elas é dissipado por todo o corpo (CANNON e NEDERGAARD, 1998). A liberação de noradrenalina pela ativação simpática via receptor β 3-adrenérgico promove: i) aumento da atividade das lipases presentes nos adipócitos marrons, as quais controlam a quantidade citoplasmática de ácidos graxos livres para a oxidação mitocondrial; ii) aumento da quantidade de UCP1 e iii) vasodilatação do tecido local, conseqüentemente produzindo e distribuindo calor para o corpo (CANNON e NEDERGAARD, 1998). A inervação do tecido adiposo marrom interescapular (iTAM) é realizada por neurônios pré-motores simpáticos localizados no bulbo ventromedial rostral, mais centralmente na rRPA nas proximidades do núcleo da rafe magnus e na área parapiroamidal (YOSHIDA et al., 2003; CANO et al., 2003; BAMSHAD et al., 1999; OLDFIELD et al., 2002).

O DMH, compreendendo as regiões do núcleo hipotalâmico dorsomedial e área hipotalâmica dorsomedial, possui um papel na termorregulação, pois exposições ao frio, estresse e injeção sistêmica de LPS ativam seus neurônios (BRATINCÁSÁK e PALKOVITS,

2004; CANO et al., 2003). Além disso, a inibição de seus neurônios pelo muscimol é capaz de reverter a termogênese via TAM após a estimulação com resfriamento da pele ou injeção de prostaglandina E2 (PGE2) na POA (MADDEN e MORRISON, 2004; NAKAMURA et al., 2011; NAKAMURA e MORRISON, 2007; NAKAMURA et al., 2005; TANAKA et al., 2001; ZARETSKAIA et al., 2003), demonstrando a participação dos neurônios do DMH durante a febre e respostas de defesa ao frio. Ao antagonizar receptores GABA_A do DMH ocorre ativação do TAM, vasoconstrição cutânea e taquicardia (CAO et al., 2004; RATHNER et al., 2008; ZARETSKAIA et al., 2002). Esses dados corroboram o modelo no qual sinapses inibitórias tônicas da POA controlam os neurônios termorreguladores do DMH, sendo que essa inibição é reduzida pelo resfriamento da pele ou ação da PGE2 na POA para desinibir os neurônios do DMH (NAKAMURA, 2011).

A ligação do DMH com a rRPa já foi estudada e foi sugerido que projeções glutamatergicas do DMH com ação termorreguladora são enviadas para a ativação de neurônios pré-motores da rMR, podendo ser uma via monossináptica entre DMH e rMR responsável pelas respostas termogênicas e cardíacas (NAKAMURA, 2011).

1.6 Febre por agentes inflamatórios/antígenos vs febre por estresse psicogênico

Apesar de geralmente haver pouca variação na T_c dos endotermos, existem determinadas situações em que o próprio organismo induz um aumento regulado da T_c, fenômeno conhecido como febre (KLUGER, 1991). Em contraste, a hipertermia é um aumento da T_c devido à insuficiente dissipação do calor em um ambiente quente ou uma grande produção de calor pelos indivíduos proporcionado por atividades físicas ou hipertermia maligna. Nestas ocasiões, o sistema termorregulador ativa respostas para abaixar a T_c para sua faixa comum de variação, por mecanismos de dissipação de calor não evaporativos (vasodilatação cutânea) e evaporativos (ofegação em aves e alguns mamíferos, sudorese em alguns mamíferos e ações de lamber a superfície corporal, como no caso do rato). Além disso, no caso da hipertermia há ativação de mecanismos comportamentais em que o indivíduo procura ambientes com temperaturas mais frias (BRITT, 1991). Tais respostas são contrárias quando comparados a organismos febris, o que será descrito abaixo.

Numa visão clássica, a febre é uma das respostas fisiológicas à infecção que consiste na elevação da Tc acima da faixa normal de variação (BLATTEIS, 2007). O sistema imune possui algumas formas de lidar com infecções e lesões teciduais, porém, a principal forma é por meio da indução da inflamação aguda. Nesse caso, ocorre o acúmulo de leucócitos, proteínas plasmáticas e fluidos derivados do sangue no sítio da infecção ou da lesão no tecido extravascular. Uma das primeiras respostas do sistema imune é a secreção de citocinas, sendo extremamente importante nas respostas inflamatórias de fase aguda (ABBAS, 2012). A resposta local inflamatória inicia-se a partir da ativação de diversos tipos celulares, entre eles macrófagos, liberando mediadores solúveis, vasoativos e quimiotáticos (Substância P, histamina, prostaglandinas, serotonina, neurotensina, entre outros) e pirogênicos endógenos (BLATTEIS, 2006). Além da liberação dos pirogênicos endógenos, isto é, indutores de febre, antipiréticos também são liberados, pois irão atuar modulando esse aumento da Tc induzido pelos pirogênicos, prevenindo que tal aumento alcance temperaturas altas que afetem as funções vitais do hospedeiro (KLUGER et al., 1998). Assim, a resposta de fase aguda à infecção é uma resposta sistêmica estimulada pela presença de microorganismos patogênicos, mediada por citocinas atuando em vários sistemas, incluindo o SNC, e esta resposta inclui febre, alteração na secreção de hormônios das glândulas adrenais e hipófise, mudanças no ciclo do sono, náuseas, anorexia e vômitos (ELMQUIST et al., 1996).

A febre pode ser iniciada a partir de agentes infecciosos, entre eles, lipopolissacarídeos (LPS; endotoxina presente na parede celular de bactérias Gram-negativas), leveduras, vírus e bactérias Gram-positivas, os quais são chamados de pirogênicos exógenos. Agentes como o LPS irão induzir a produção e a liberação de citocinas, como as interleucinas (IL)-1 β , de interferons e também do fator de necrose tumoral (TNF), e a partir desta liberação, haverá a indução da produção de prostaglandinas E_2 (PGE_2) que atuam como principais mediadores da febre por endotoxina no hipotálamo (BLATTEIS, 2006). Tais mediadores da febre levam a uma ativação dos mecanismos de produção e conservação de calor, por inibição da atividade dos neurônios sensíveis ao calor da POA, ativando os mecanismos termogênicos (NAKAMURA e MORRISON, 2011). Sabe-se que há diferentes populações de neurônios na POA, os sensíveis ao calor (aumentam atividade com aumento da temperatura local) e os insensíveis à variação da temperatura (BOULANT, 1998).

Além dos mecanismos descritos acima, também é comum os animais febris exibirem comportamentos que reduzam a perda de calor, tais como a procura por um ambiente mais quente, mais termicamente isolado ou ainda adotarem posturas que favoreçam a conservação do calor corporal (cf. BÍCEGO et al., 2007). A febre possui um papel importante na resposta imunofisiológica do hospedeiro contra infecções e inflamações, aumentando a ativação de linfócitos e reduzindo a replicação de muitos microorganismos (HASDAY et al., 2000).

Alguns estudos têm revelado que não somente agentes pirogênicos inflamatórios podem induzir a febre, mas também o estresse psicológico pode afetar a Tc (FALCON-LESSES, 1930; OKA et al., 1998; 2001). Por exemplo, já foi relatado um aumento na Tc de humanos após assistirem filmes, torneios de boxe ou após algum tipo de avaliação. Porém, na maioria dos casos este aumento não é maior que 1°C (KLEITMAN, 1945; RENBOURN, 1960; BRIESE, 1995; FALCON-LESSES, 1930). Em animais, a exposição ao estresse aumenta a Tc em muitas espécies de mamíferos incluindo roedores, suínos, esquilos e chimpanzés (BOUWKNECHT et al., 2007; NAKAYAMA et al., 2005; PARR e HOPKINS, 2000; VINKERS et al., 2008). É interessante notar que neurônios termosensíveis da POA são capazes de responder a estímulos não térmicos como a osmolaridade, podendo a termorregulação ser regulada por outros parâmetros que não a temperatura (HORI e KATAFUCHI, 1998). Dentre estes estímulos, o emocional foi capaz de ativar uma população considerável de neurônios termosensíveis da POA em macacos após um teste de recompensa ou objetos aversivos (HORI et al., 1986). Outro exemplo de estresse psicológico é a contenção em locais que possibilitam pouca movimentação (LONG et al., 1991; TERLOUW et al., 1996).

Por muitos anos achava-se que este tipo de resposta térmica a estresse psicológico seria apenas um aumento não regulado da Tc (hipertermia), porém existem evidências que este estado térmico possui muitas similaridades com uma febre clássica, como a participação de citocinas pirogênicas e mediadores antipiréticos, como o óxido nítrico, atuando diretamente no SNC (LEMAY et al., 1990; MINAMI et al., 1991; DE PAULA et al., 2000; SANCHES et al., 2003). Sabe-se que as concentrações plasmáticas de IL-6 e IL-1 β aumentam durante a indução de estresse em ratos expostos ao campo aberto (LEMAY et al., 1990; MINAMI et al., 1991). Além disso, o uso de drogas antipiréticas inibidoras da enzima ciclooxigenase (enzima sintetizadora de prostaglandinas, que são mediadores de febre por endotoxina) atenua a febre decorrente da exposição ao campo aberto (SINGER et

al., 1986; KLUGER et al., 1995). Apesar destas similaridades entre febre de contenção (estresse) e febre induzida por LPS, nem todos os mecanismos que atuam na febre de contenção estão claros.

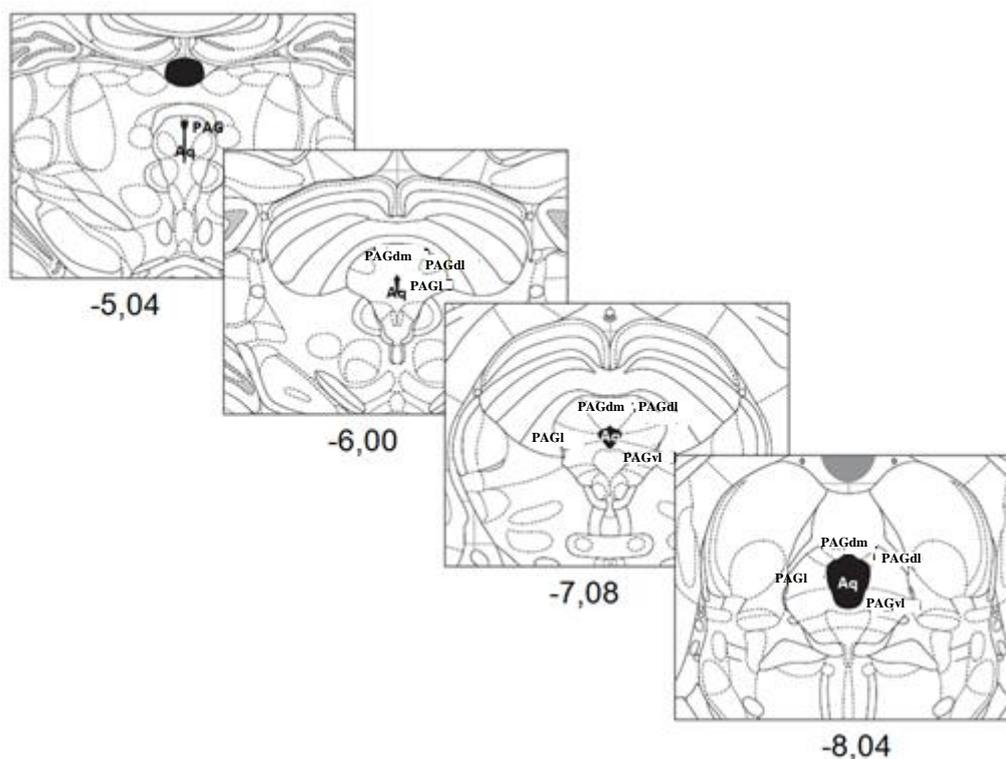
1.7 Substância cinzenta periaquedutal (PAG)

Uma das estruturas envolvidas em respostas ao estresse psicológico é a substância cinzenta periaquedutal (PAG), a qual é organizada em colunas que atuam em respostas relacionadas à sobrevivência durante uma ameaça ou estresse (BANDLER et al., 2000). A PAG é uma região localizada ventral à formação reticular, cuja margem inferior é delimitada pelo tegumento (parte posterior da ponte), pelo núcleo fastigial do cerebelo e área reticular da medula (HERRERA et al., 1987). A PAG é bastante conservada entre os vertebrados (peixes cartilagosos e ósseos, anfíbios, répteis, aves e mamíferos) (FIEBIG, 1988; KINGSBURY et al., 2011; KITTELBERGER et al., 2006; PEZALLA, 1983; STEPHENSON-JONES et al., 2011; TEN DONKELAAR e DE BOER-VAN HUIZEN, 1987).

A maioria das fibras nervosas aferentes e eferentes da PAG estão distribuídas em diferentes áreas sensoriais, motoras, autonômicas e límbicas (SAWCHENKO et al., 1983; BEITZ, 1990; BANDLER et al., 1991; CANTERAS e SWANSON, 1992; NOLAN e WALDROP, 1993; MORRISON, 2001; SEWARDS e SEWARDS, 2002; MCNAUGHTON e CORR, 2004), demonstrando que a PAG está conectada a vários circuitos neurais que são, por sua vez, responsáveis por controles fisiológicos importantes.

A PAG é composta por quatro colunas longitudinais (dorsomedial, dorsolateral, lateral e ventrolateral) em volta do aqueduto mesencefálico (Figura 1) e está envolvida em funções neurobiológicas que incluem modulação da nocicepção e de comportamentos sexuais e defensivos (CARVALHO-NETTO, 2009). Cada coluna possui diferentes receptores e conexões que estão relacionados com as respostas citadas acima (BANDLER, 1996; BANDLER 1994).

FIGURA 1 - Esquemas representativos de cortes coronais das colunas da substância cinzenta periaquedutal (PAG).



Fonte: Atlas de Paxinos e Watson, 2005. PAG= PAGdm dorsomedial; PAGdl= PAG dorsolateral; PAGl= PAG lateral; PAGvl= PAG ventrolateral; Aq= aqueduto. Os números abaixo das imagens indicam as distâncias em relação ao bregma rostral (em milímetros).

As distintas colunas da PAG possuem diferentes funções (BANDLER et al., 2000; BEHBEHANI, 1995; AN et al., 1998): i) a coluna lateral (PAGl) coordena comportamentos ativos de defesa, independente de opióide e também possui efeitos hipertensivos; ii) a coluna ventrolateral (PAGvl) parece coordenar comportamentos de defesa, analgesia por opióides, e efeitos hipotensivos; iii) a estimulação das colunas lateral e dorsolateral, induz a ocorrência de comportamentos de luta ou fuga, hipertensão, taquicardias, e analgesia mediada por não-opióides; iv) estimulações na coluna ventrolateral favorece comportamentos passivos como quietude, bradicardia, hipotensão e analgesia mediada por opióides. Além disso, uma porção intermediária da coluna lateral da PAG (PAGil) foi proposta (a partir de um estudo realizado em gatos) possuir um papel na modulação da função cardiovascular, incluindo pressão sanguínea arterial sistêmica e ritmo cardíaco (WANG et al., 2001).

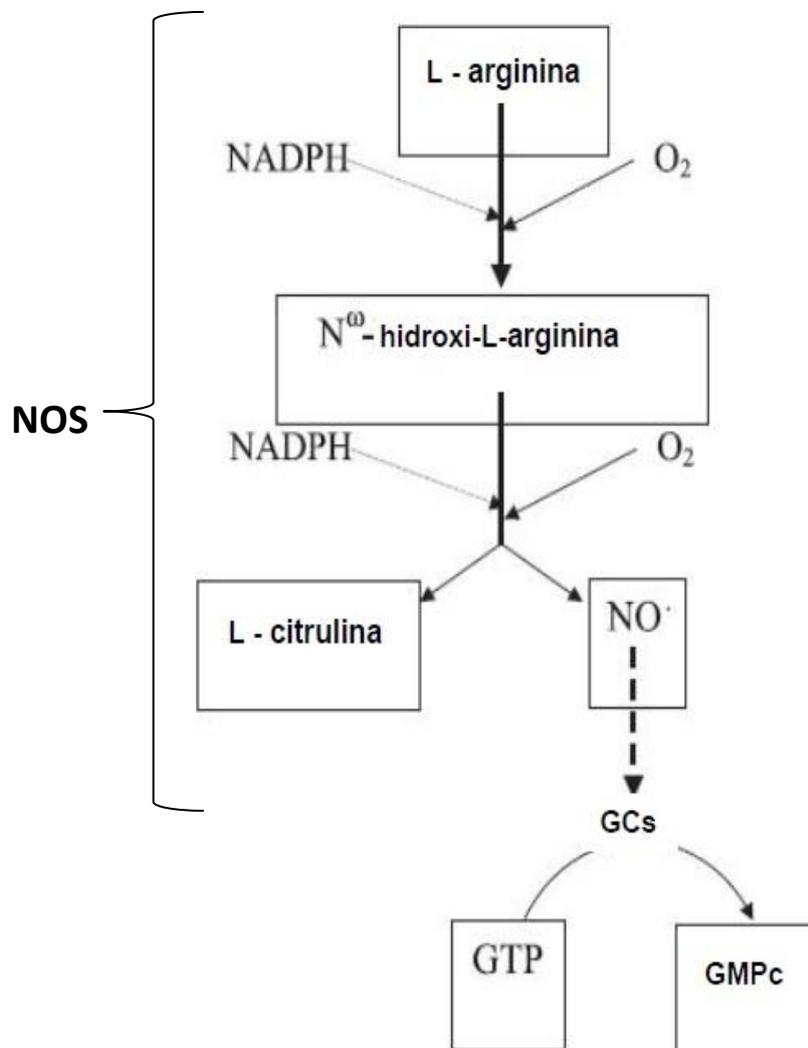
A PAG também está envolvida na regulação da Tc, já que sua estimulação induz aumento da Tc (TSENG et al., 1980). Verificou-se ainda que a estimulação química da porção rostral da PAG induz vasodilatação na cauda de ratos (ZHANG et al., 1997). Por outro lado, a estimulação química realizada na porção caudal da PAG, induz termogênese do TAM (YOSHIDA, 2005).

O DMH, além da ação termorreguladora, (MORRISON, 2004), também é importante na integração de respostas comportamentais e fisiológicas em ratos expostos a estresse psicológico (DIMICCO et al., 2002). Atualmente já foi demonstrado que existem projeções da DMH, o qual recebe aferências da POA (NAKAMURA e MORRISON, 2011), para a porção caudal da PAG (TER HORST e LUITEN, 1986; THOMPSON et al., 1996). Além disso, a região rostroventromedial da PAG também recebe sinais termogênicos, seja por microinjeção de PGE₂ na POA seja por desinibição do DMH (RATHNER e MORRISON, 2006).

1.8 Óxido Nítrico (NO)

A coluna dorsolateral da PAG (PAGdl), ao longo de toda sua extensão possui uma grande quantidade de neurônios positivos para óxido nítrico sintases (NOS) (ONSTOTT et al., 1993). O óxido nítrico (NO) é um radical livre diatômico e possui uma meia vida curta nos sistemas biológicos, aproximadamente 1 segundo quando está circulando no sangue (BRYAN e GRISHAM, 2007). Sua produção no organismo pelas enzimas NOS, possui um importante papel na homeostase vascular (vasodilatador), neurotransmissão e mecanismos de defesa do hospedeiro (MONCADA et al., 1991). A ação do NO é principalmente via ativação de guanilato ciclase solúvel e aumento de formação de GMP cíclico (GMPc) (BHAT et al., 1996) (FIG. 2). A principal via do catabolismo do NO é a oxidação gradual para nitrito (NO₂⁻) e nitrato (NO₃⁻) (YOSHIDA, 1983).

FIGURA 2 - Via de síntese e ação do óxido nítrico (NO)



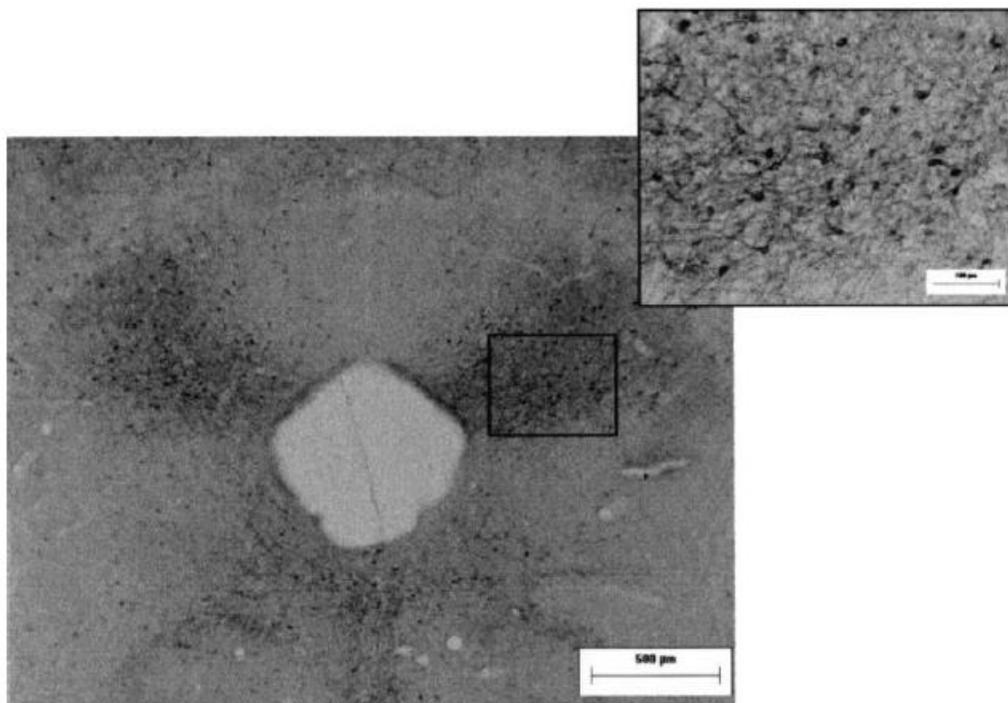
Síntese do NO a partir da óxido nítrico sintase (NOS), começando pela L-arginina (ver texto para detalhes). Guanilato ciclase solúvel (GCs), que catalisa a conversão de GTP para GMP cíclico (GMPc), representa o principal alvo da molécula de NO. FONTE: PAGLIARO, 2003.

São conhecidas três isoformas de NOS distribuídas por todo o organismo que catalisam a conversão de L-arginina em NO e L-citrulina, dentre elas a neuronal (NOSn) e a endotelial (NOSe), que são expressas constitutivamente, e a induzível (NOSi), cuja expressão pode ser induzida por vários fatores, incluindo inflamação (BONASSOLI, 2013; AGUIAR e GUIMARÃES, 2009). A atividade destas três enzimas é diferente. A NOSn e NOSe são dependentes de Ca^{2+} e são expressas em diversos tecidos. A NOSi não é dependente de Ca^{2+} e, como dito anteriormente, sua síntese é induzida, dentre outros

fatores, pela exposição de tecidos a citocinas inflamatórias ou estímulos isquêmicos. Estas três isoformas também podem ser denominadas na literatura como: a) NOS-I, que é a NOS_n, pois foi a primeira isoforma encontrada e localizada no sistema nervoso; b) NOS-II, que é a NOS_i, e; c) NOS-III, que é a NOS_e, primeiramente encontrada em células vasculares endoteliais (ALDERTON et al., 2001). Existem inibidores da atividade das NOS disponíveis comercialmente, sendo o L-NMMA (NG-Monomethyl-L-arginineacetate), o qual foi utilizado neste trabalho, um importante inibidor não seletivo das três isoformas de NOS.

O NO também é conhecido como um neurotransmissor atípico gasoso que apresenta importante efeito antipirético tanto na febre por infecção (STEINER et al., 2002) quanto por contenção (DE PAULA et al., 2000). Em relação à febre de contenção, De Paula e colaboradores (2000) verificaram intensificação da resposta febril em ratos após injeção intracerebroventricular (icv) do inibidor não-seletivo da NOS L-NAME, sugerindo o papel antipirético do NO no SNC. Verificou-se ainda que esse efeito envolve a NOS_n e a indução de GMPc, pois a febre de contenção é aumentada por injeção icv de SMTC, inibidor seletivo de NOS_n, ou por Rp-cGMPS, inibidor de atividade de GMPc (SANCHES et al., 2003). Entretanto, nenhum trabalho até o momento, determinou o local de ação do NO durante a febre de contenção. Assim, sendo o tema do presente estudo será testar a hipótese de que o NO/GMPc da PAG_{dl} modula atenuando a resposta febril por estresse de contenção em ratos. Nesse contexto, a presença de enzima NOS na PAG já foi identificada ao longo da coluna dorsolateral (Figura 3; OLIVEIRA et al., 2001; ONSTOTT et al., 1993), sendo que contenção por 2 horas em ratos aumenta o número de neurônios imunorreativos para NOS_n nessa região (OLIVEIRA et al., 2001). Além disso, já foi demonstrado que contenção de ratos por 3 horas promove aumento da síntese de NO e da transmissão sináptica e não sináptica (aumento da densidade de varicosidades) na PAG_{dl} (SMALLS e OKERE, 2012).

FIGURA 3 - Fotomicrografia demonstrando neurônios imunorreativos à NOSn localizados na PAGdl



Neurônios imunorreativos à NOSn localizados na substância cinzenta periaquedutal dorsolateral. No quadrado à direita, pode-se ver os neurônios imunorreativos em maior aumento. FONTE: OLIVEIRA, et al, 2001.

2 OBJETIVO

O objetivo do presente estudo foi investigar a participação da via NO-GMPc da PAGdl no aumento de Tc induzido por contenção física em ratos. Para isso foi verificado o efeito de microinjeções na PAGdl de inibidor não seletivo de NOS, L-NMMA e inibidor de guanilato ciclase solúvel, ODQ, sobre a Tc e o índice de perda de calor (índice do grau de vasoconstrição/vasodilatação cutânea pela cauda dos animais), além do efeito do L-NMMA sobre o consumo de oxigênio (índice de termogênese) em ratos submetidos ao estresse de contenção.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Todos os experimentos foram realizados em ratos adultos da linhagem Wistar, pesando entre 250-280g, mantidos em câmara ventilada com temperatura controlada entre 24-26°C (modelo: ALE 9902001; Alesco, Monte Mor, SP, Brasil), submetidos a um ciclo claro/escuro de 12h/12h e providos com água e ração à vontade. Os protocolos experimentais foram conduzidos com a aprovação do Comitê de Ética Local (CEUA-FCAV-UNESP; protocolo nº 008116/13).

3.2 Cirurgias

Antes da cirurgia os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de 100 mg/kg de quetamina + 10mg/kg de xilazina e fixados a um aparelho estereotáxico (David Kopf, modelo 900, Tujunga, CA, USA). Uma cânula guia de aço inoxidável (0,6 mm de diâmetro e 12 mm de comprimento) foi inserida 2 mm acima da PAG dorsolateral (coordenadas: 0,4 mm a partir do lambda; + 1,9 mm lateral e -4,2 mm dorsoventral a partir do crânio; barra do incisivo a -2,5 mm) de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (2005). As cânulas ficaram fixas e presas no crânio por meio de parafuso e cimento acrílico e

tiveram também um mandril introduzido em seu interior até o momento da microinjeção, para prevenir infecção e oclusão.

Após a cirurgia, cada animal foi retirado do estereotáxico e submetido a uma laparotomia paramediana para inserção de um sensor armazenador de temperatura (SubCueDataloggers, Calgary, Canadá). Após esses procedimentos os animais receberam injeção intramuscular de antibiótico (enrofloxacina; 10mg/kg, Schering-Plough) e injeção subcutânea de anti-inflamatório não esteroide (flunixinameglumina; 2,5mg/kg, Schering-Plough). Estes animais tiveram um tempo de recuperação de 6-8 dias antes dos experimentos.

3.3 Medidas da temperatura corporal (Tc) e temperatura da pele da cauda (Tp)

Os sensores armazenadores integrados de temperatura foram acoplados a um computador, via uma conexão óptica e programados para a coleta de dados ao longo do experimento com leituras de Tc a cada 5 min utilizando-se o programa “SubCuetemperaturedatalogger”. Ao final dos experimentos, os sensores foram mais uma vez conectados a um computador para a leitura das Tcs medidas e essas, por sua vez, foram corrigidas de acordo com as especificações contidas no manual do fabricante.

A Tp foi medida por meio de imagens utilizando-se uma câmera sensível a infravermelho (Flir SC660, Suíça). A técnica da termografia de infravermelho detecta a radiação eletromagnética emitida por um corpo e converte tal radiação em uma imagem colorida de acordo com a intensidade desta. Essa técnica tem sido comumente usada na fisiologia termal para mensurar a Tp e, assim, inferir o fluxo periférico em endotermos (ROMANOSVSKY et al., 2002; TATTERSALL e MILSON, 2003; ALMEIDA, et al., 2006; SCOTT et al., 2008). Foi escolhida a temperatura da cauda do rato para inferir mecanismo de perda de calor devido a essa região ser considerada uma janela térmica (TATTERSALL e MILSON, 2003; ALMEIDA et al., 2006), ou seja, uma superfície corporal em que a troca de calor com o ambiente pode ser facilitada ou dificultada, por apresentar grande relação superfície/volume e ser pouco isolada por pelos.

3.4 Medidas de consumo de oxigênio

Para inferência da taxa metabólica dos animais foram realizadas medidas de consumo de oxigênio ($\dot{V}O_2$) por respirometria aberta. O animal foi colocado em um respirômetro (6.8 L) dentro de uma sala com a temperatura controlada (25-27°C). Foi mantido um fluxo de gás constante no respirômetro (*pull mode*) e concentrações de O_2 dentro do respirômetro e do ar atmosférico foram monitoradas por um analisador de O_2 (Foxbox Respirometry System - Sable Systems International, Inc., Las Vegas, USA) conectado a um computador para registrar e salvar os dados obtidos. O consumo de oxigênio ($\dot{V}O_2$) foi determinado com base na taxa de fluxo e na diferença de concentração de gás na entrada e na saída da câmara. O ar foi puxado numa taxa de fluxo de 1700 mL.min⁻¹ (MFS, Mass Flow System, Sable Systems International, Inc., Las Vegas, USA), passando por um analisador de pressão de vapor de água (RH300, Sable Systems International, Inc., Las Vegas, USA) e uma subamostra desse ar foi para o analisador de O_2 a 185 mL.min⁻¹ (bomba de sucção do Foxbox). Um distribuidor do fluxo de gás (RM8 Intelligent Multiplexer; Sable Systems) foi utilizado para controlar qual amostra de gás (respirômetro ou baseline) iria para o analisador em cada momento. Para a coleta de dados a cada segundo, foi utilizado um software (EXPEDATA v. 1.4.5; Sable Systems). Antes da amostra de ar entrar no analisador, a mesma foi seca com drierite (W.A. Hammond Drierite Company, LTD, EUA). Cada 10 minutos de registro foi composto por 2 min de *baseline*, amostra de ar que entrava no respirômetro, e por 8 min de ar que saía do respirômetro. Como o CO_2 não foi medido e nem retirado da amostra de ar, o $\dot{V}O_2$ foi calculado utilizando-se a seguinte fórmula (Koteja, 1996): $\dot{V}O_2 = [FR_e (F_iO_2 - F_eO_2)] / [1 - F_iO_2 (1 - RQ)]$, onde FR_e = fluxo de ar que sai do respirômetro (mL/min); F_iO_2 = fração de O_2 no ar de entrada (*baseline*); F_eO_2 = fração de O_2 no ar de saída (*respirômetro*); RQ = quociente respiratório (considerado 0.85). Os dados são apresentados em STPD (condições padrões de temperatura, pressão e ar seco).

3.5 Microinjeção

As microinjeções foram realizadas utilizando-se uma seringa Hamilton de 1μL e uma agulha dental de injeção (Mizzy, 200 μm O.D.) conectadas por uma cânula PE-10. A

agulha tinha um comprimento de 2 mm a mais do que a cânula guia, permitindo o contato com a PAG apenas no momento da injeção, que foi feita utilizando-se um aparelho de microinjeção (modelo 310, Stoelting CO., IL, EUA). Um volume de 100 nL foi microinjetado em cada rato durante 30 seg., sendo a agulha removida da cânula guia 30 seg após o término da injeção para se evitar refluxo.

3.6 Procedimento Histológico

Ao final de cada experimento, foi injetado o volume de 100 nL de solução de 2% de azul de Evans para posterior confirmação do sítio da microinjeção em cortes histológicos do encéfalo.

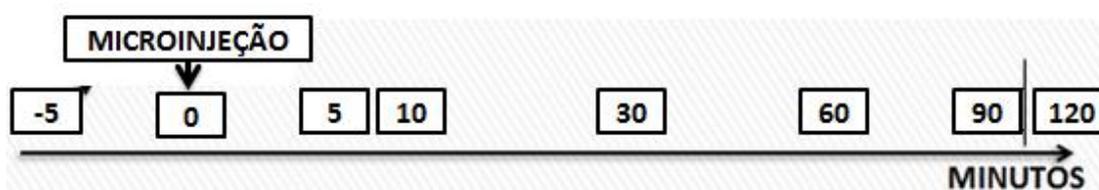
Para a realização do procedimento histológico, os animais foram anestesiados com 100 mg/kg de quetamina (ip), perfundidos com salina e depois formalina 10% e logo após, decapitados. Os encéfalos foram removidos e estocados em formalina 10% por pelo menos dois dias, sendo incluídos em parafina após esse tempo. Foram feitos cortes coronais de 15 μ m da região abrangendo a PAG que foram corados posteriormente pelo método de Nissl. Somente os animais em que foram confirmados o sítio correto da microinjeção na PAGdl foram considerados para análise dos dados. Os sítios fora da PAGdl foram considerados peri-PAGdl e foram contados como controle para indicar a especificidade da resposta dessa região.

3.7 Protocolos Experimentais

Os experimentos foram realizados com animais não anestesiados. Utilizou-se 0,5 μ mol/100 nL de L-NMMA (NG-Monomethyl-L-arginineacetate; Tocris, EUA), inibidor não seletivo de NOS, baseado em estudo prévio (STEINER et al., 2002). Além disso, 0,15 nmol/100 nL de ODQ (1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one), inibidor da guanilato ciclase solúvel (GCs), diluído em 1 % de dimetilsulfóxido e 10 % álcool etílico absoluto, foi usado com base em estudo prévio (SORIANO et al., 2010). Durante todos os experimentos a temperatura ambiente foi mantida em $26 \pm 1^\circ$ C, considerada no limite inferior da zona termoneutra dos nossos ratos (VIZIN et al., 2015).

3.7.1 Efeito da microinjeção intra-PAG de inibidor não seletivo da NOS, L-NMMA ou do inibidor da guanilato ciclase solúvel, ODQ, sobre a Tc e o IPC de ratos não submetidos a estresse de contenção.

Pelo menos 12 horas antes do experimento, os animais foram distribuídos em caixas individuais e colocados na sala de experimentação. No dia seguinte, pela manhã, os ratos receberam microinjeção intra-PAG de L-NMMA ou salina; ou ODQ ou DMSO 1% (veículo) e foram mantidos em suas caixas por aproximadamente 120 minutos. Enquanto os dataloggers coletavam e armazenavam os valores de Tc de 5 em 5 minutos, imagens termográficas da cauda foram adquiridas nos tempos (em minutos) de acordo com o esquema abaixo. As fotos foram tiradas 5 minutos antes da microinjeção do fármaco ou seu veículo. Após 55 minutos, tempo 5 abaixo, foi registrada a segunda imagem termográfica, sendo 5 minutos o intervalo para a próxima foto. Assim por diante, a quarta foto foi realizada no tempo 30, ou seja, 80 min após a microinjeção; no tempo 60, 110 minutos após e tempo 120, 170 minutos após o procedimento de microinjeção.



3.7.2 Efeito da microinjeção intra-PAG de inibidor não seletivo da NOS, L-NMMA ou do inibidor da guanilato ciclase solúvel, ODQ, sobre a Tc e o IPC de ratos submetidos a estresse de contenção

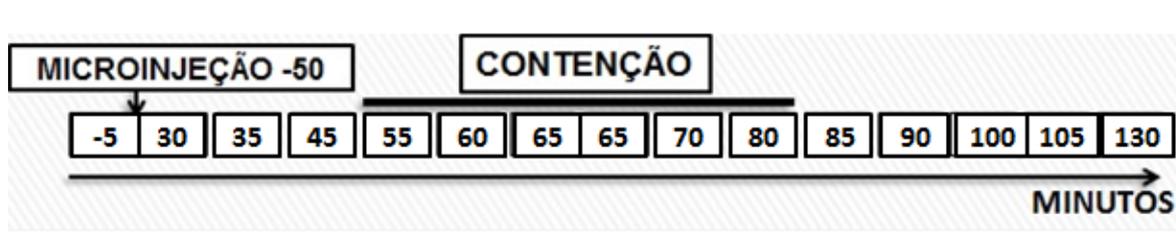
Os animais foram preparados da mesma maneira explicada acima, exceto que, na manhã do experimento receberam a microinjeção intra-PAG de L-NMMA

ou salina (veículo) ou ODQ ou DMSO 1% (veículo). Após 50 minutos da microinjeção foram submetidos ao estresse de contenção, sendo colocados em tubos de tela (60 mm de diâmetro; Figura 4) durante 40 minutos. Após este tempo em contenção, os animais tiveram mais 50 minutos de retorno à eutermia.

FIGURA 4 – Tubo de metal em forma de tela



Enquanto os dataloggers coletavam e armazenavam os valores de Tc de 5 em 5 minutos, imagens termográficas da cauda foram adquiridas nos tempos (em minutos) de acordo com o esquema abaixo. A primeira foto foi tirada cinco minutos antes da microinjeção do fármaco ou controle, e sucessivamente, 20 minutos antes da contenção dos animais, 15 e 5 min. O intervalo entre a microinjeção e a exposição ao estresse de contenção física foi de 50 minutos. Os animais foram submetidos a 40 minutos de contenção física, no qual as fotos foram tiradas nos minutos 5, 10, 15, 20, 30, 40 durante a contenção e 5, 10 15, 20 e 40 minutos após a contenção.



3.7.3 Efeito da microinjeção intra-PAG do inibidor não seletivo da NOS, L-NMMA sobre o consumo de O₂ de ratos submetidos a estresse de contenção.

A aclimatação dos animais foi realizada da mesma forma dos experimentos citados acima. No dia do experimento os animais foram colocados nos respirômetros e após uma hora receberam a microinjeção de LNMMA ou salina. Quarenta minutos depois da microinjeção eles foram submetidos ao estresse de contenção física por quarenta minutos e após esse tempo os animais foram retirados da contenção e permaneceram nos respirômetros por cinquenta minutos para retorno da Tc aos valores iniciais. O consumo de VO₂ foi medido com intervalo de 20 minutos para cada animal durante todo o experimento.

3.8 Análise dos Resultados

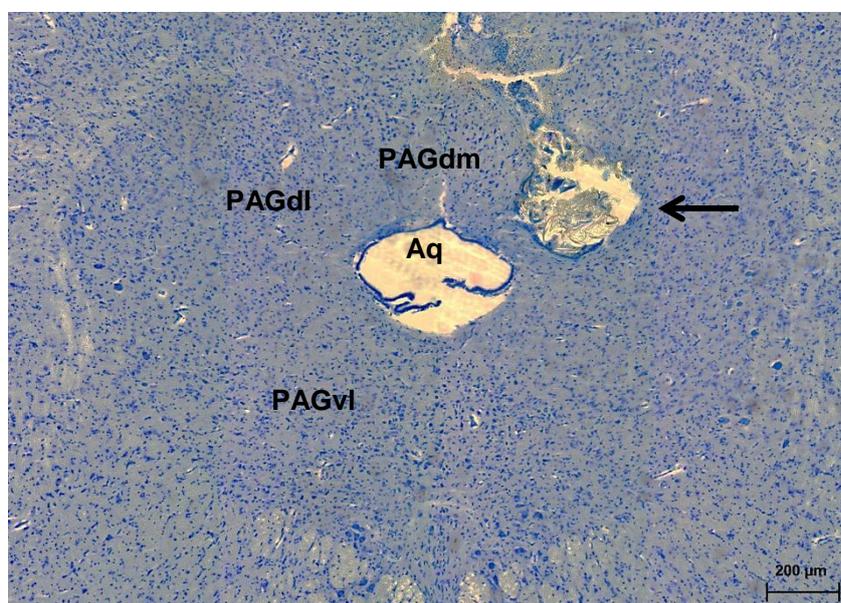
Os resultados são apresentados como média \pm EPM. A Tp e a Tc foram usadas para inferir o índice de perda de calor (IPC) do animal, isto é, o grau de vasodilatação/vasoconstrição cutânea como indicadores de mecanismos de perda e conservação de energia térmica, respectivamente. O IPC varia de 0 a 1, sendo que zero indica vasoconstrição máxima e 1 vasodilatação máxima, e foi calculado de acordo com a fórmula: $IPC = (Tp - Ta) / (Tc - Ta)$ (ROMANOSVSKY et al., 2002). Foi utilizada ANOVA de duas vias (fatores: tempo e tratamento) de medidas repetidas para verificar o efeito do L-NMMA e do ODQ sobre a Tc e o IPC em eutermia e contenção. As diferenças significativas entre as médias foram determinadas pelo pós-teste de Holm-Sidak. Foi considerado índice de significância de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Histologia

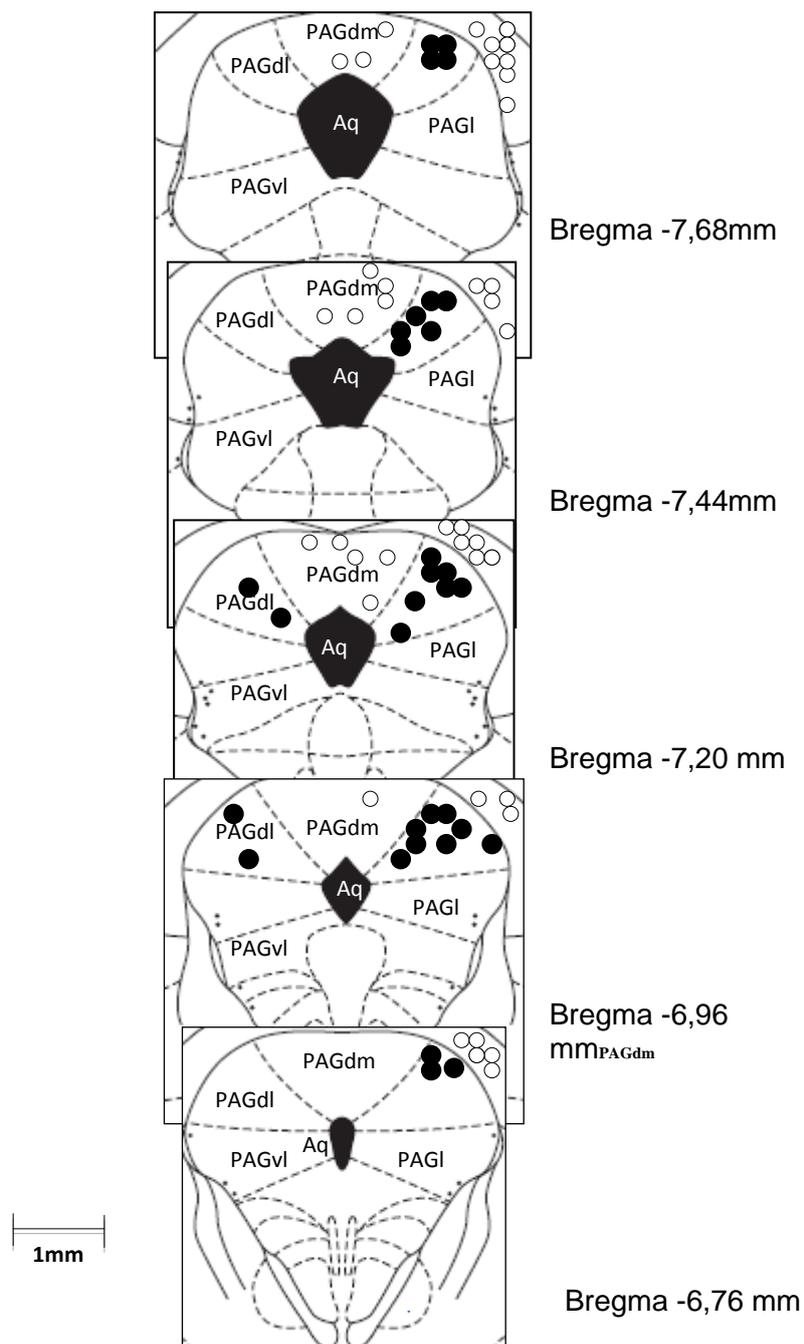
Na FIG. 5A está representada uma fotomicrografia contendo o sítio de microinjeção na PAG dorsolateral (PAGdl), região em que é demonstrada a presença de NOSn (OLIVEIRA et al., 2001).

FIGURA 5A - Fotomicrografia do encéfalo de um animal representativo mostrando o sítio típico de microinjeção.



Sítio típico de microinjeção indicado pela seta na substância cinzenta periaquedutal dorsolateral (PAGdl). PAGdm= PAG dorsomedial; PAGvl= PAG ventrolateral; Aq= aqueduto.

FIGURA 5B - Desenho esquemático de cortes da PAG



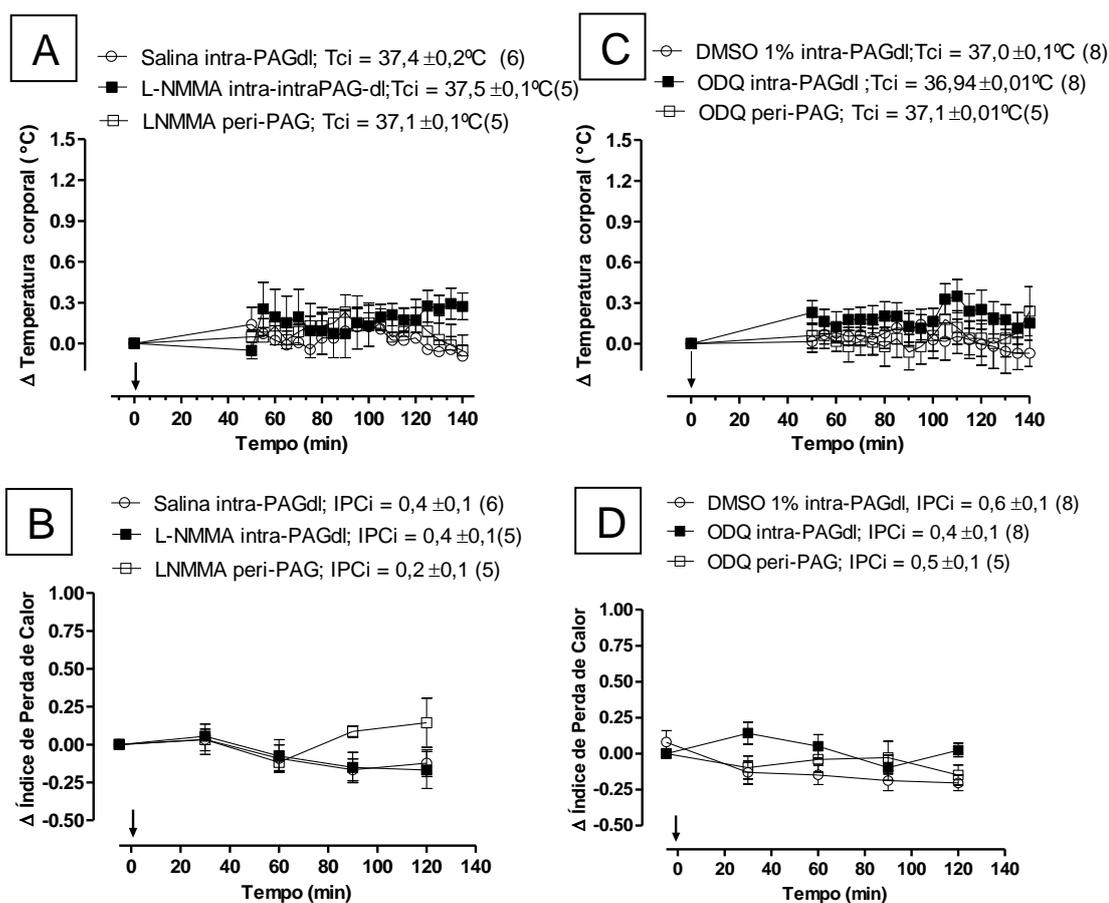
Desenho esquemático ilustrando a localização dos sítios da microinjeção ao longo da extensão rostro-caudal da PAG. Os círculos pretos representam as microinjeções intra-PAGdl e os círculos brancos representam microinjeções peri-PAGdl. PAGdm= PAGdorsomedial; PAGvl= PAG ventrolateral; Aq= aqueduto. FONTE: Paxinos e Watson (2005)

4.2 Efeito da microinjeção intra PAGdl de LNMMA ou ODQ em ratos não submetidos ao estresse de contenção.

Nas FIG 6 A e 6B são apresentados os resultados da Tc e do índice de perda de calor (IPC) respectivamente, de ratos que receberam a microinjeção de salina ou L-NMMA na PAG e não foram submetidos ao estresse de contenção. Os tratamentos com L-NMMA e veículo não causaram mudança significativa da Tc e do IPC dos ratos.

Nas FIG 6C e 6D estão apresentados os dados da Tc e do IPC de ratos eutérmicos que receberam a microinjeção de DMSO 1 % (veículo) ou ODQ na PAG. Os tratamentos com ODQ ou veículo não alteraram a Tc nem o IPC dos ratos não submetidos ao estresse de contenção.

FIGURA 6 - Efeito da microinjeção do L-NMMA (0,5 $\mu\text{mol}/100\text{ nl}$) (A e B) e do ODQ (0,15 $\text{nmol}/100\text{ nl}$) (C e D) na substância cinzenta periaquedutal sobre a variação (Δ) da temperatura corporal (Tc; A e C) e a variação (Δ) do índice de perda de calor (IPC; B e D) em animais que não foram submetidos ao estresse de contenção. A seta indica o momento da microinjeção. Número de animais entre parênteses. Tci representa a média das Tcs iniciais antes dos tratamentos. IPCi representa a média dos IPCs iniciais antes dos tratamentos.

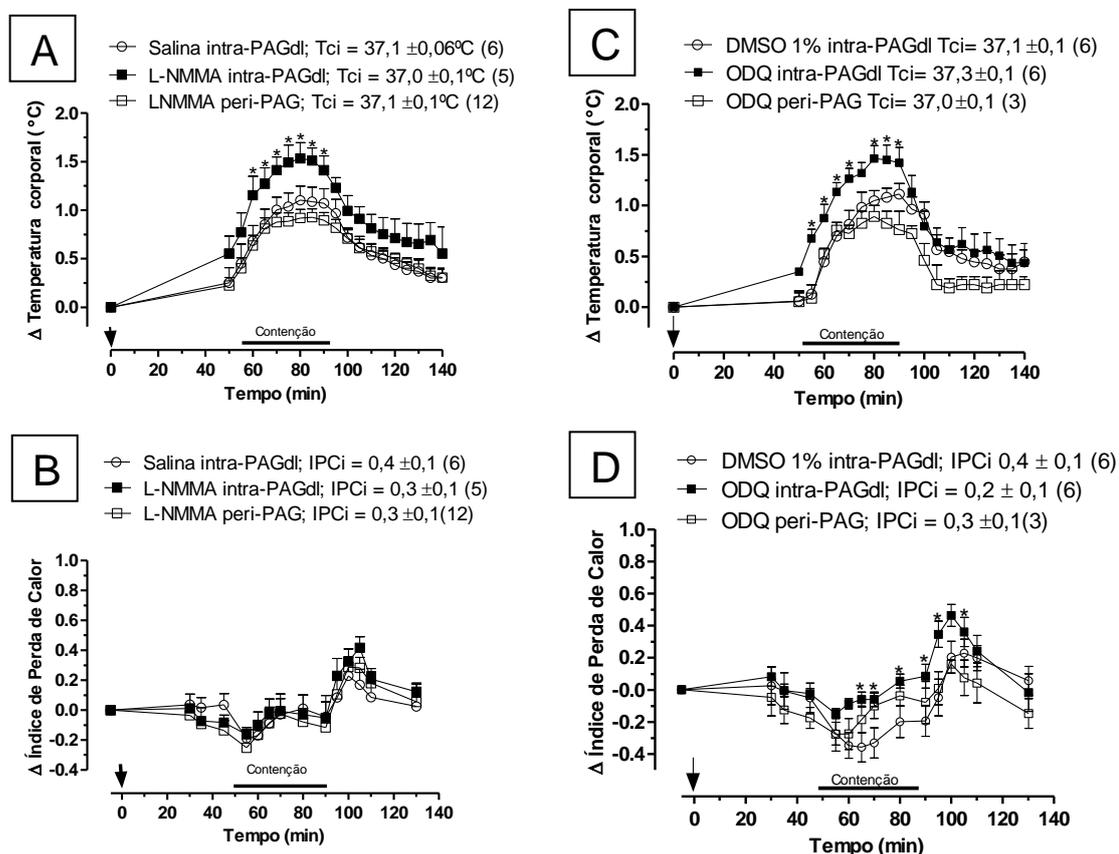


4.3 Efeito da microinjeção intra PAGdl de L-NMMA ou ODQ em ratos submetidos ao estresse de contenção física.

Nas FIG 7A e 7B são apresentados os resultados relativos ao efeito da microinjeção de salina ou L-NMMA na PAGdl sobre a Tc e o IPC de ratos submetidos ao estresse de contenção física. Houve aumento da Tc durante a contenção em todos os grupos (efeito do tempo: $p < 0,001$). No entanto, esse aumento foi maior nos animais que receberam tratamento com L-NMMA intra-PAGdl (efeito do tratamento: $p = 0,037$; sem interação entre fatores: $p = 0,119$). O IPC reduziu durante a contenção e aumentou logo após o seu término (efeito do tempo: $p < 0,001$) similarmente entre todos os tratamentos (sem efeito do tratamento: $p = 0,806$; sem interação entre fatores: $p = 0,972$). Nesses experimentos, alguns sítios de microinjeção fora da PAGdl foram localizados na PAGdm (Fig. 5B). Nesse caso, como não houve diferença estatística dos resultados de Tc ($p = 0,576$) e de IPC ($p = 0,994$) dos ratos que receberam microinjeção de L-NMMA tanto fora da PAG ($n = 7$) quanto na PAGdm ($n = 5$), esses dois subgrupos foram incluídos no grupo peri-PAGdl.

Os animais tratados com o inibidor de guanilato ciclase solúvel, ODQ, na PAGdl tiveram aumento maior da Tc durante a contenção comparado com o grupo veículo (efeito do tratamento: $p = 0,040$; efeito do tempo: $p < 0,001$; sem interação entre os fatores: $p = 0,141$). O IPC de todos os tratamentos foi similarmente reduzido durante a contenção e elevado logo após a retirada do animal do tubo (efeito do tempo: $p < 0,001$; sem efeito do tratamento: $p = 0,091$). Entretanto, houve interação dos fatores tempo e tratamento ($p = 0,015$) indicando diferença entre ODQ e DMSO (veículo) nos tempos 15, 20, e 40 min durante a contenção e 5 minutos após esta.

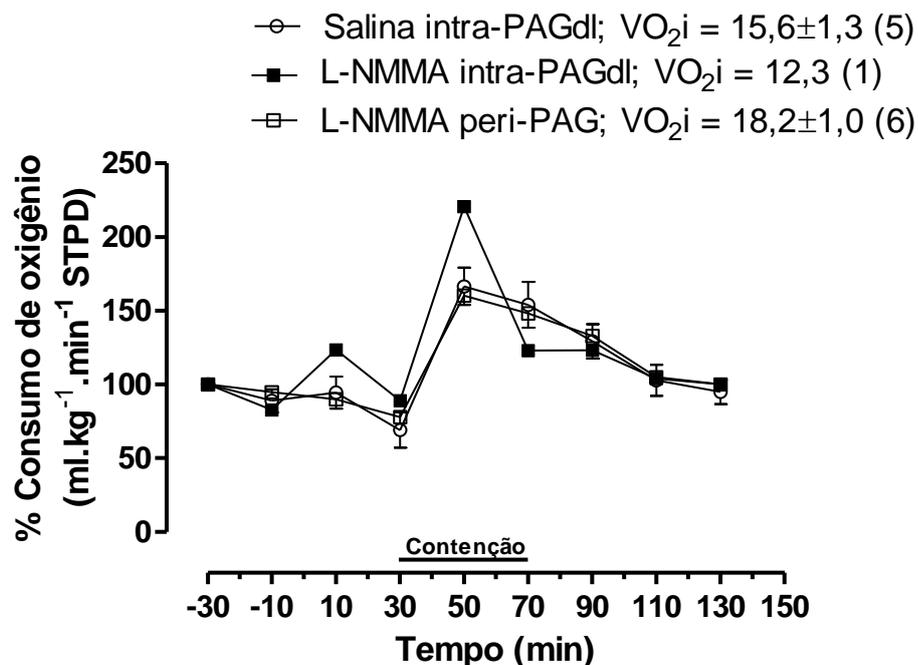
FIGURA 7 - Efeito da microinjeção do L-NMMA (0,5 $\mu\text{mol}/100\text{ nl}$) (A e B) e do ODQ (0,15 $\text{nmol}/100\text{ nl}$) (C e D) na substância cinzenta periaquedutal sobre a variação (Δ) da temperatura corporal (T_c ; A e C) e a variação (Δ) do índice de perda de calor (IPC; B e D) em animais que foram submetidos ao estresse de contenção. A seta indica o momento da microinjeção. Número de animais entre parênteses. T_{ci} representa a média das T_c s iniciais antes dos tratamentos. IPC_i representa a média dos IPCs iniciais antes dos tratamentos



4.4 Efeito da microinjeção de L-NMMA ou salina na substância cinzenta periaquedutal (PAG) sobre o consumo de O_2 em ratos submetidos ao estresse de contenção.

A FIG 8 mostra que durante o estresse de contenção houve aumento do consumo de oxigênio nos grupos salina e L-NMMA peri-PAGdl. Por enquanto, há apenas um animal com sítio de microinjeção de L-NMMA na PAGdl em que o consumo de O_2 foi maior, mas esse resultado será confirmado ao completar o número amostral (experimentos em andamento).

FIGURA 8 - Efeito da microinjeção do L-NMMA (0,5 $\mu\text{mol}/100\text{ nl}$) na substância cinzenta periaquedutal na variação em porcentagem do consumo de oxigênio em animais que foram submetidos ao estresse de contenção. A seta indica o momento da microinjeção. Número de animais entre parênteses. VO_{2i} representa a média do consumo de oxigênio antes dos tratamentos.



5 DISCUSSÃO

No presente estudo foram avaliados dois mecanismos termofetores para indução de febre por contenção física, a vasoconstrição cutânea da cauda do rato (considerada a janela térmica desse animal; Almeida et al., 2006) e o aumento da atividade metabólica (termogênese) (MORRISON e NAKAMURA, 2011). Observamos uma redução do IPC (vasoconstrição cutânea) e um aumento de VO_2 seguidos por aumento de T_c durante a contenção física e aumento do IPC (vasodilatação cutânea) e redução de VO_2 seguidos por queda da T_c após a retirada da contenção. Isso indica a ativação da conservação e da produção de calor na indução da febre de contenção e a ativação da perda de calor e queda de termogênese na fase de retorno à eutermia. Essa febre foi aumentada, mas o IPC não foi afetado pela inibição da síntese de NO na PAGdl, indicando que o NO atua nessa região

como modulador inibitório da febre por contenção afetando talvez o mecanismo termogênico em vez do de conservação de energia térmica. Como o efeito do ODQ foi similar ao do L-NMMA, isso indica uma possível participação de via dependente de GMPc ativada pelo NO durante a contenção.

Há evidências da participação da PAG na termogênese, já que a estimulação de sua coluna ventrolateral caudal ativa a termogênese pelo TAM interescapular, sendo o principal tecido de produção de energia térmica em ratos (CHEN et al., 2002). A PAG também modula o mecanismo de conservação/perda de calor não evaporativa em ratos, pois quando estimulada quimicamente a região ventrolateral rostral da PAG ocorre vasodilatação periférica (ZHANG et al., 1997). Quanto ao papel do NO na termorregulação, esse transmissor gasoso modula a termogênese independente de tremor e a vasoconstrição periférica por promover a redução do tônus simpático, atuando em algumas regiões do SNC como no núcleo paraventricular, hipotálamo e núcleo do trato solitário (KRUKOFF, 1999; BIATTEIS, 1998; STEINER e BRANCO, 2001). Também se pode mencionar que na POA, o NO tem papel antipirético para a febre por LPS (STEINER et al., 2001; FELEDER et al., 2007) enquanto que no *locus coeruleus*, o efeito do NO é pirogênico nessa febre induzida por LPS (SORIANO et al., 2010).

Mesmo diante dos dados acima, é interessante notar que esta é a primeira vez que o papel do NO na PAGdl é demonstrado na termorregulação. Inúmeros estudos anteriores já mostraram que este neurotransmissor atípico atua na intensificação de respostas emocionais condicionadas (ULIANA et al., 2016), na modulação e expressão de comportamentos semelhantes a ansiedade (*anxiety-like behaviors*) (BONASSOLI et al., 2013; LISBOA et al., 2013), e em comportamentos defensivos e inibição da dor (MIGUEL et al., 2012). Ou seja, até o presente estudo, dados envolvendo o papel do NO da PAGdl demonstravam sua atuação somente durante comportamentos relacionados a estresse sem levar em conta a Tc.

Ainda não se sabe exatamente quais as vias em que as regiões rostral e caudal da PAG projetam para o controle da vasodilatação e da termogênese, mas já se sabe que o núcleo bulbar da rafe (rRPa), que se conecta com a PAG caudal, possui neurônios pré-motores para estas respostas (MORRISON, 1999, 2001, 2004; RATHNER et al., 2001; TANAKA et al., 2002; NAKAMURA et al., 2002). FARKAS et. al (1998) demonstraram que projeções da PAG caudal para a rafe têm relação com o controle cardiovascular. Além disso, a injeção de um vírus marcador retrógrado no TAM de camundongos e ratos marcou

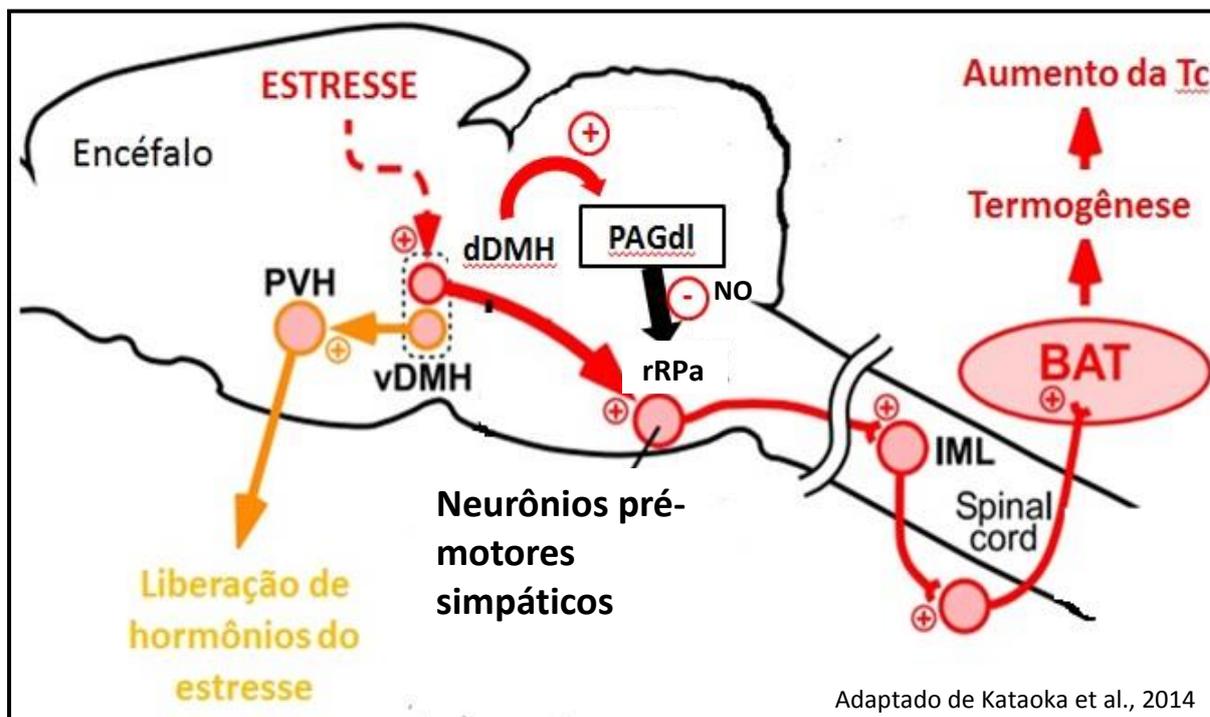
neurônios da rRPa e anteriormente da PAG (BAMSHAD et al., 1998; OLDFIELD et al., 2002; CANO et al., 2003; YOSHIDA et al., 2003). Sendo assim, há importantes conexões da PAG com regiões envolvidas na regulação da Tc, ativando ou inibindo mecanismos de produção ou perda de calor.

A exposição a agentes estressantes, como mudanças e ameaças do ambiente em que o animal está inserido, em geral ativa respostas fisiológicas como estimulação simpática cardíaca e de mecanismos de conservação e produção de calor, além de ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), possibilitando ao organismo enfrentar tais ameaças (KORTE et al., 2005; DIMICCO et al., 2006). Muitas vias neurais do estresse no SNC têm sido estudadas. A via hipotálamo dorsomedial (DMH) – rRPa, durante a derrota social (*social defeat*) já foi evidenciada em experimentos envolvendo marcadores retrógrados e manipulações farmacológicas. Esta é uma via monossináptica glutamatérgica excitatória, em que o DMH ativa neurônios pré-motores simpáticos da rRPa que, por sua vez, estimulam o tecido adiposo marrom via β 3-adrenoreceptores (KATAOKA et al., 2014). Além disso, o núcleo pré-óptico mediano, importante região hipotalâmica envolvida na termorregulação (MORRISON e NAKAMURA, 2011), envia projeções por toda a extensão rostro-caudal da PAG (CHIBA e MURATA, 1985; SIMERLY e SWANSON, 1988; RIZVI et al., 1992).

No esquema abaixo (FIG 9), está demonstrada a ativação de importantes áreas envolvidas no estresse e comportamento, como o hipotálamo e a PAG e as possíveis vias para os mecanismos termofetores do controle da Tc. O DMH envia projeções para a PAG e esta para o bulbo ventrolateral rostral (RVLM) e rRPa (THOMPSON et al., 1996; ter HORST e LUITEN, 1986; FARKAS et al., 1998; CARRIVE et al., 1988; HUDSON e LUMB, 1996). Foram demonstrados efeitos semelhantes de hipertensão, taquicardia e alteração do fluxo sanguíneo quando há estimulação da coluna dorsolateral da PAG ou do DMH (CARRIVE et al., 1987). Com o intuito de estudar a mediação da PAG em resposta ao estímulo do DMH, DA SILVA et al. (2003, 2006) demonstraram que os aumentos da pressão arterial e da frequência cardíaca em resposta à estimulação do DMH foram reduzidos após inibição de neurônios da PAG. Pelo fato da PAG não enviar projeções diretas para a coluna intermediolateral (IML) (FARKAS et al., 1998), estas são feitas via RVLM e núcleos da rafe (FARKAS et al., 1998; HUDSON e LUMB, 1996). Além disso, em uma situação de estresse, o hipotálamo envia projeções excitatórias, serotoninérgicas,

para a PAGdl a qual parece distribuir as informações sobre os componentes vasomotor e termogênico para o RVLm e para núcleos da rafe, respectivamente (FONTES et al., 2006).

FIGURA 9 - Esquema demonstrando a via monossináptica glutamatérgica DMH e rMR e a atuação da PAGdl.



Esquema demonstrando a via monossináptica glutamatérgica DMH e rRPa ativando a termogênese e a possível via envolvendo a participação da PAG e do óxido nítrico com efeito antipirético do NO durante o aumento da Tc no estresse de contenção física, via liberação GABA e inibição de centros bulbares responsáveis pela termogênese. BAT, tecido adiposo marrom, dDMH, hipotálamo dorsomedial dorsal, IML, coluna intermediolateral, PAGdl, substância cinzenta periaquedutal dorsolateral, PVH, hipotálamo paraventricular, rMR, rafe bulbar rostral, vDMH, hipotálamo dorsomedial ventral, 5-HT, serotonina.

Várias evidências indicam a relação entre o NO e a neurotransmissão gabaérgica na PAG: (1) aproximadamente cinquenta por cento dos neurônios da PAG são gabaérgicos (MUGNAINI e OERTEL, 1985; REICHLING, 1991); (2) a maioria desses neurônios gabaérgicos são interneurônios ativos tonicamente (BARBARESI, 2005), incluindo células que se projetam para o bulbo (BARBARO et al., 1986; BEHBEHANI et al., 1990; CHIENG e CHRISTIE, 1994); (3) populações de neurônios gabaérgicos contendo NO sintase apresentam um papel essencial na amplificação do sinal inibitório (LOVICK, 2000); (4) o NO provavelmente não possui papel tônico na liberação de GABA na PAG, mas potencializa a liberação pré-sináptica desse neurotransmissor que ativa receptores pré-

sinápticos GABA_A atenuando a liberação local de glutamato (XING et al., 2008); (5) pelo menos no hipotálamo, o efeito do NO na liberação de GABA ocorre por via dependente de GMPc (LI et al., 2003). De acordo com tais observações, o modelo que hipotetizamos no presente estudo é que o NO da PAGdl induziria o aumento da liberação GABA (por mecanismos pré e pós sinápticos) além da atenuação da liberação de glutamato, promovendo inibição pela PAGdl de neurônios da rRPa. Pelo menos na analgesia, há evidências de uma conexão excitatória entre PAG e Rafe magnus (BEHBEHANI e FIELDS, 1979). Uma inibição do NO na PAGdl produziria uma diminuição na atividade simpática para o tecido adiposo marrom e, conseqüentemente, uma redução na produção de energia térmica.

O DMH pode ser ativado durante estímulo emocional agudo, e apresenta conexões com estruturas classicamente envolvidas em reações de medo e estresse, como a amígdala. Observou-se que a ativação do núcleo basolateral da amígdala promove uma resposta semelhante à observada por um estressor agudo e que esta resposta é dependente de conexões sinápticas com o DMH (LEDOUX, 2000; LE DOUX 2003; SANDES e SHEKHAR, 1991; SOLTIS et al., 1998). Dessa forma, é possível sugerir que núcleos da amígdala possivelmente ativados durante a contenção (estresse agudo), ativam o DMH que envia projeções excitatórias para a PAG. Na PAGdl, o NO atuaria como molécula antipirética durante a febre de contenção por ativar uma via dependente de GMPc, estimulando a liberação gabaérgica local e, assim, potencializando a inibição da PAG para os neurônios da rRPa envolvidos na ativação da termogênese pelo TAM.

6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados do presente estudo, conclui-se que o NO da PAGdl modula a febre induzida por estresse de contenção, exercendo um papel antipirético por atuar possivelmente na inibição do mecanismo efetor termogênico. Essa ação parece ser dependente da ativação de guanilato ciclase solúvel e, portanto, aumento de GMPc.

7 REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*. **Editora Elsevier**, 2012.
- AGUIAR, D. C.; GUIMARÃES, F. S. Blockade of NMDA Receptors and Nitric Oxide Synthesis in the Dorsolateral Periaqueductal Gray Attenuates Behavioral and Cellular Responses of Rats Exposed To a Live predator. **Journal of Neuroscience Research**, v. 87, p. 2418-2429, 2009.
- ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochemical Journal**, v. 357, p. 593-615, 2001.
- ALMEIDA, M. C.; STEINER, A. A.; BRANCO, L. G. S.; ROMANOVSKY, A. A. Cold-seeking behavior as a thermoregulatory strategy in systemic inflammation. **European Journal of Neuroscience**, v. 23, p. 3359–3367, 2006.
- AN, X.; BANDLER, R.; ONGUR, D.; PRICE, J. L. Prefrontal cortical projections to longitudinal columns in the midbrain periaqueductal gray in macaque monkeys. **Journal of Comparative Neurology**, v. 401, p. 455-479, 1998.
- ANDERSON, C.R.; BERGNER, A.; MURPHY, S.M. How many types of cholinergic sympathetic neuron are there in the rat stellate ganglion? **Neuroscience**, p.140:567–76, 2006.
- BAMSHAD, M.; SONG, C.K.; BARTNESS, T.J. CNS origins of the sympathetic nervous system outflow to brown adipose tissue. **Am J Physiol**, 276, p.1569–78, 1999.
- BAMSHAD, M.; AOKI, W.T.; ADKISON, G. Central nervous system origins of the sympathetic nervous system outflow to white adipose tissue. *Ame Jour of Physi*, p.291–299, 1998.
- BANDLER R.; SHIPLEY, M.T. Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression? **Trends in Neuro**, v. 17, n.11, p. 379–389, 1994.
- BANDLER, R.; DEPAULIS, A. Midbrain periaqueductal gray control of defensive behavior in the cat and the rat. **The midbrain periaqueductal gray matter**, v. 213, p. 175-198, 1991.
- BANDLER, R.; KEAY, K.A. Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray and integration of emotional expression. **Progress in Brain Res.**, v. 107, p. 285–300, 1996.
- BARBARESI, P. GABA-immunoreactive neurons and terminals in the cat periaqueductal gray matter: a light and electron microscopic study. **J. Neurocytol.** 34, p.471-487, 2005.
- BARBARO, N.M.; HEINRICHER, M.M.; FIELDS, H.L.. Putative pain modulating neurons in the rostral ventral medulla. Reflex-related activity predicts effects of morphine, **Brain Res.**, 366, p.203–310, 1986.

BAUTISTA, D.M.; SIEMENS, J.; GLAZER, J.M.; TSURUDA, P.R.; BASBAUM, A.I.; STUCKY, C.L.; JORDT, S.E.; JULIUS, D. The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. **Nature**, 448, p.204–208, 2007.

BEHBEHANI, M. M. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. **Program Neurob**, v.46, p. 575-605, 1995.

BEHBEHANI, M. M.; FIELDS H. L. Evidence that an excitatory connection between the periaqueductal gray and nucleus raphe magnus mediates stimulation produced analgesia. **Brain Res**, vol. 170, no. 1, pp. 85–93, 1979.

BEITZ, A. J. Central gray. In: PAXINOS G. The human nervous system. **Academic Press**, p.307-320, 1990.

BHAT, G.; MAHESH, V. B.; AGUAN, K.; BRANN, D. W. Evidence that brain nitric oxide synthase is the major nitric oxide synthase isoform in the hypothalamus of the adult female rat and that nitric oxide potently regulates hypothalamic cGMP levels. **Neuroendocrinology**, v. 64, p. 93–102, 1996.

BÍCEGO, K.C.; BARROS, R.C.H.; BRANCO, L.G.S. Physiology of temperature regulation: comparative aspects. **Comp Bio and Physio**, v.147, p.616–663, 2007.

BICUDO, J.E.P.W.; BIANCO, A.C.; VIANNA, C.R. Adaptive thermogenesis in hummingbirds. **J Expe Bio** 205, p.2267–2273, 2002.

BLATTEIS, C. M. Endotoxic fever: New concepts of its regulation suggest new approaches to its management. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 111, p.194-231, 2006.

BLATTEIS, C. M. Endotoxic fever: New concepts of its regulation suggest new approaches to its management. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 111, p.194-231, 2006.

BLATTEIS, C. M. The onset of fever: new insights into its mechanism. **Progress in Brain Res**, v.162, p.3–14, 2007.

BONASSOLI, V. T.; CONTARD, E. B.; MILANI, H.; OLIVEIRA, R. M. W. Effects of nitric oxide synthase inhibition in the dorsolateral periaqueductal gray matter on ethanol withdrawal-induced anxiety-like behavior in rats. **Psychopharmacology**, v.228, p.487-498, 2013.

BOULANT, J. A. Hypothalamic neurons: mechanisms of sensitivity to temperature. **Annals of the New York Academy of Science**, v.856, p.108-115, 1998.

BOULANT, J.A., DEAN, J.B. Temperature receptors in the central nervous system. **Annu. Ver. Physiol.** 48, 639–654, 1986.

BOULANT, J.A.; GRIFFIN, J.D.; KAPLE, M.L. Cyclic AMP: a determinant of hypothalamic neuronal thermosensitivity. **FASEB Journal** 4, A720, 1990.

BOUWKNECHT JA, OLIVIER B, PAYLOR RE. The stress-induced hyperthermia paradigm as a physiological animal model for anxiety: a review of pharmacological and genetic studies in the mouse. **Neurosci Biobehav Rev** 31(1), p.41–59, 2007.

BRATINCSAK A, PALKOVITS M. Activation of brain areas in rat following warm and cold ambient exposure. **Neuroscience**, p.385–97, 2004.

BRATINCSÁK A, PALKOVITS M. Evidence that peripheral rather than intracranial thermal signals induce thermoregulation. **Neuroscience**, 135, p.525– 532, 2005.

BRIESE, E. Emotional hyperthermia and performance in humans. **Physiology & Behavior**, v.58, p.615-618, 1995.

BRITT, B. A. Malignant hyperthermia - a review. In: Schoenbaum E, Lomax P, editors. Thermoregulation: pathology, pharmacology, and therapy. **Pergamon Press**, p.179–292, 1991.

BRYAM, N.S.; GRISHAM, M.B. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. **Free Radical Biology and Medicine**, v.43, p.645-657, 2007.

CABANAC, M. Thermiatics and behavior. In: Blatteis, C. (Ed.), Physiology and Pathophysiology of Temperature Regulation. **World Scientific**, Singapore, p.108–124, 1998.

CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Nonshivering thermogenesis and brown adipose tissue. In: Blatteis, C. (Ed.), Physiology and Pathophysiology of Temperature Regulation. **World Scientific**, Singapore, p.60–77, 1998.

CANO, G.; PASSERIN, A.M.; SCHILTZ, J.C.; CARD, J.P.; MORRISON, S.F.; SVED, A.F. Anatomical substrates for the central control of sympathetic outflow to interscapular adipose tissue during cold exposure. **J Comp Neurol**, p.303–26, 2003.

CANTERAS, N. S.; SWANSON, L. W. The dorsal premammillary nucleus: an unusual component of the mammillary body. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.89, p.10089-10093, 1992.

CAO, W.H.; FAN, W.; MORRISON, S.F. Medullary pathways mediating specific sympathetic responses to activation of dorsomedial hypothalamus. **Neuroscience**, 126, p.229–240, 2004.

CARRIVE, P.; BANDLER, R.; DAMPNEY, R.A. Anatomical evidence that hypertension associated with the defence reaction in the cat is mediated by a direct projection from a restricted portion of the midbrain periaqueductal grey to the subretrofacial nucleus of the medulla. **Brain Res**, 460(2), p.339-45, 1988.

CARRIVE, P.; DAMPNEY, R.A.; BANDLER, R. Excitation of neurones in a restricted portion of the midbrain periaqueductal grey elicits both behavioural and cardiovascular components of the defence reaction in the unanaesthetised decerebrate cat. **Neurosci Lett**; 81(3), p.273-8, 1987.

CARVALHO-NETTO, E.F.; GOMES, K.S.; AMARAL, V.C.S.; NUNES-DE-SOUZA, R.L. Role of glutamate NMDA receptors and nitric oxide located within the periaqueductal gray on defensive behaviors in mice confronted by predator. **Psychopharmacology**, v.204, p.617-625, 2009.

CHEN, X-M.; NISHI, M.; NAGASHIMA, K.; SHIBATA, M.; KANOSUE, K. The caudal periaqueductal gray participates in the activation of brown adipose tissue in rats. **Neuroscience Letters**, 331, p.17–20, 2002.

CHIBA, T.; MURATA, Y. Afferent and efferent connections of the medial preoptic area in the rat: A WGA-HRP study. **Brain Research Bulletin**, 14, p.261–272, 1985.

CHIENG, B.; CHRISTIE, M.J. Inhibition by opioids acting on m-receptors of GABAergic and glutamatergic post synaptic potentials in single rat periaqueductal gray neurones in vitro, **Br. J. Pharmacol.** 113, p.303–309, 1994.

DA SILVA, L.G.; MENEZES, R.C.A.; VILLELA, D.C.; FONTES, M.A.P. Excitatory amino acid receptors in the periaqueductal gray mediate the cardiovascular response evoked by activation of the dorsomedial hypothalamic neurons. **Neuroscience.In: Press** 2006.

DAMPNEY, R.A.L.; COLEMAN, M.J.; FONTES, M.A.P.; HIROOKA, Y.; HORIUCHI, J.; WALLIN, B.G.; CHARKOUDIAN, N. Sympathetic neural control of integrated cardiovascular function: insights from measurement of human sympathetic nerve activity. **Muscle Nerve**; 36, p.595–614, 2007.

DE OLIVEIRA, R.M.W.; DEL BEL, E.A.; GUIMARÃES, F.S. Effects of excitatory amino acids and nitric oxide on flight behavior elicited from the dorsolateral periaqueductal gray. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v.25, p.679–685, 2001.

DE PAULA, D.; STEINER, A.A.; BRANCO, L.G.S. The nitric oxide pathway is an importante modulator of stress-induced fever in rats. **Physiology & Behavior**, v.70, p. 505-511, 2000.

DIMICCO, J.A.; SAMUELS, B.C.; ZARETSKAIA, M.V.; ZARETSKY, D.V. The dorsomedial hypothalamus and the response to stress: part renaissance, part revolution. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.71, p.469–480, 2002.

DIMICCO, J.A.; SARKAR, S.; ZARETSKAIA, M.V.; ZARETSKY, D.V. Stress-induced cardiac stimulation and fever: Common hypothalamic origins and brainstem mechanisms. **Auton Neurosci.**, 2006.

ELMQUIST, J.K.; SCAMMELL, T.E.; JACOBSON, C.D.; SAPER, C.B. Distribution of Fos-like immunoreactivity in the rat brain following intravenous lipopolysaccharide administration. **Journal of Comparative Neurology**, v.371, p.85–103, 1996.

FALCON-LESSES, M.; PROGER, S.H. Psychogenic fever. **The New England Journal of Medicine**, v.203, p.1034–6, 1930.

FARKAS, E.; JANSEN, A.S.; LOEWY, A.D. Periaqueductal gray matter input to cardiac-related sympathetic premotor neurons. **Brain Res**, 792(2), p.179-92, 1998.

FELEDER, C.; PERLIK, V.; CLARK, M. Preoptic nitric oxide attenuates endotoxic fever in guinea pigs by inhibiting the POA release of norepinephrine. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, p.1144–1151, 2007.

FIEBIG, E. Connections of the corpus cerebelli in the thornback guitarfish, *Platyrhinoidistriseriata* (Elasmobranchii): a study with WGA-HRP and extracellular granule cell recording. **Journal of Comparative Neurology**, v.268, p.567–583, 1988.

FONTES, M.A.P; TAGAWA, T.; POLSON, J.W.; CAVANAGH, S.J.; DAMPNEY, R.A.L. Descending pathways mediating cardiovascular response from dorsomedial hypothalamic nucleus, **Am. J. Physiol. Heart Circ Physiol**, 280, p.2891-2001, 2006.

FORSMAN, A.; RINGBLOM, K.; CIVANTOS, E.; AHNESJO, J. Coevolution of color pattern and thermoregulatory behavior in polymorphic pygmy grasshoppers *Tetrix undulate*. **Evol. Int. J. Org. Evol.**, 56, p.349–360, 2002.

FORSTER, R.E. II.; FERGUSON, T.B. Relationship between hypothalamic temperature and thermoregulatory effectors in unanesthetized cat. **Am J Physiol**, 169, p.255–269, 1952.

GULER, A.D.; LEE, H.; IIDA, T.; SHIMIZU, I.; TOMINAGA, M.; CATERINA, M. Heat-evoked activation of the ion channel, TRPV4. **J Neurosci**; 22, p.6408–14, 2002.

GUPTA, B.N.; NIER, K.; HENSEL, H. Cold-sensitive afferents from the abdomen. **Pflugers Arch**, 380, p.203–4, 1979.

HASDAY, J. D.; FAIRCHILD, K. D.; SHANHOLTZ, C. The role of fever in the infected host. **Microbes and Infection**, v.2, p.1891–1904, 2000.

HAYES; J.P.; GARLAND, T. JR. The evolution of endothermy: Testing the aerobic capacity model. **Evolution**, p.836-847, 1995.

HELFMANN, W.; JANNES, P.; JESSEN, C. Total body thermosensitivity and its spinal and supraspinal fractions in the conscious goose. **Pflügers Arch.**, 391 (1), p.60–67, 1981.

HELLSTROM, B.; HAMMEL, H.T. Some characteristics of temperature regulation in the unanesthetized dog. **Am J Physiol**, 213, p.547–56, 1967.

HENSEL, H.; BRÜCK, K.; RATHS, P. Homeothermic organisms. In *Temperature and Life* (ed. H. Precht, J. Christophersen, H. Hensel and W. Larcher), **New York: Springer-Verlag**, p.503-761. 1973.

HERRERA, M.; SANCHEZ DEL CAMPO, F.; SMITH-AGREDA, V. The commissural nucleus of the inferior colliculus in the rabbit. A morphological study. **Journal of Hirnforsch**, v.28, p.671-683, 1987.

HOLOWATZ, L.A.; THOMPSON, C.S.; MINSON, C.T.; KENNEY, W.L. Mechanisms of acetylcholine-mediated vasodilatation in young and aged human skin. **J Physiol**, 563, p.965–73, 2005.

HORI, T.; KATAFUCHI, T. Cell biology and the functions of thermosensitive neurons in the brain. **Prog Brain Res**, 115, p.9–23, 1998.

HORI, T.; KIYOHARA, T.; SHIBATA, M.; OOMURA, Y.; NISHINO, H.; AOU, S.; FUJITA, I. Responsiveness of monkey preoptic thermosensitive neurons to non-thermal emotional stimuli. **Brain Res Bull**, 17, p.75–82, 1986.

HUDSON, P.M.; LUMB, B.M. Neurones in the midbrain periaqueductal grey send collateral projections to nucleus raphe magnus and the rostral ventrolateral medulla in the rat. **Brain Res**, 733(1), p.138-41, 1996.

KATAOKA, N.; HIOKI, H.; KANEKO, T.; NAKAMURA, K. Psychological stress activates a dorsomedial hypothalamus-medullary raphe circuit driving brown adipose tissue thermogenesis and hyperthermia. **Cell Metab**, 20, p.346–358, 2014.

KAVALIERS, M.; HIRST, M. The presence of an opioid system mediating behavioral thermoregulation in the terrestrial snail, *Cepaea nemoralis*. **Neuropharmacology**, 23, p.1285–1289, 1984.

KELLOGG, D.L.JR; HODGES, G.J.; OROZCO, C.R.; PHILLIPS, T.M.; ZHAO, J.L.; JOHNSON, J.M. Cholinergic mechanisms of cutaneous active vasodilation during heat stress in cystic fibrosis. **J Appl Physiol**, 103, p.963–8, 2007.

KINGSBURY, M.A.; KELLY, A.M.; SCHROCK, S.E.; GOODSON, J.L. Mammal-like organization of the avian midbrain central gray and a reappraisal of the intercollicular nucleus. **PLoS One**, v.6, 2011.

KITTELBERGER, J.M.; LAND, B.R.; BASS, A.H. Midbrain periaqueductal gray and vocal patterning in a teleost fish. **Journal of Neurophysiology**, v.96, p.71–85, 2006.

KLEITMAN, N. The effect of motion pictures on body temperature. **Science**, v.102, p.507–508, 1945.

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.; SOSZYNSKI, D. Role of fever in disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.856, p.224-233, 1998.

KLUGER, M.J.; KOZAK, W.; LEON, L.R.; SOSZYNSKI, D.; CONN, C.A. Cytokines and fever. **Neuroimmunomodulation**, v.2, p.216–223, 1995.

KORTE, S.M.; KOOLHAAS, J.M.; WINGFIELD, J.C.; MCEWEN, B.S. The Darwinian concept of stress: benefits of allostasis and costs of allostatic load and the trade-offs in health and disease. **Neurosci Biobehav Rev**, 29(1), p.3–38, 2005.

KOTEJA, P. Measuring Metabolism with Open-Flow Respirometric Systems: Wich design to choose? **British Ecological Society**, volume 10, n 5, p.675-677, 1996.

KRUKOFF, T.L. Central nitric oxide in regulation of autonomic functions. **Brain Research**, Rev. 30, 52–65, 1999

LEDOUX, J.E. The emotional brain, fear, and the amygdala. **Cell Mol Neurobiol**, 23(4-5), p.727-38, 2003.

- LEDOUX, J.E. Emotion circuits in the brain. **Annu Rev Neurosci.**, 21, p.155-84, 2000.
- LEMAY, L.G.; VANDER, A.J.; KLUGER, M.J. The effect of physiological stress on plasma interleukin-6 activity in rats. **Physiological and Behavior**, v.47, p.957-961, 1990.
- LI, D.P.; CHEN, S.R.; FINNEGAN, T.F.; PAN, H.L. Signalling pathway of nitric oxide in synaptic GABA release in the rat paraventricular nucleus. **J. Physiol.** 554, p.100-110, 2003.
- LISBOA, S. F.; MAGESTO, A. C.; AGUIAR, J. C.; RESSTEL, L. B. M.; GUIMARAES, F. S. Complex interaction between anandamide and the nitrenergic system in the dorsolateral periaqueductal gray to modulate anxiety-like behavior in rats. **Neuropharmacology**, v.75, n. SI, p.86-94, 2013.
- LOMAX, P.; MALVEAUX, E.; SMITH, R.E. Brain temperatures in the rat during exposure to low environmental temperatures. **Am J Physiol**, 207, p.736-739, 1964.
- LONG, N.C.; MORIMOTO, A.; NAKAMORI, T.; MURAKAMI, N. The effect of physical restraint on IL-1 β -and LPS-induced fever. **Physiology & Behavior**, v.50, p.625-628, 1991.
- LOVICK, T.A. Panic disorder: a malfunction of multiple transmitter control systems with in the periaqueductal gray matter? **Neuroscientist**, 6, p.48-59, 2000.
- MADDEN, C.J.; MORRISON, S.F. Excitatory amino acid receptors in the dorsomedial hypothalamus mediate prostaglandin-evoked thermogenesis in brown adipose tissue. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, 286, p.320-325, 2004.
- MANDADI, S.; SOKABE, T.; SHIBASAKI, K.; KATANOSAKA, K.; MIZUNO, A.; MOQRICH, A.; PATAPOUTIAN, A.; FUKUMI-TOMINAGA, T.; MIZUMURA, K.; TOMINAGA, M. TRPV3 in keratinocytes transmits temperature information to sensory neurons via ATP. **Pflügers Arch**, 458, p.1093-1102, 2009.
- MCGAW, I.J. Behavioral thermoregulation in *Hemigrapsus nudus*, the amphibious purple shore crab. **Biol. Bull.**, 204, p.38-49, 2003.
- MCKEMY; D.D.; NEUHAUSSER, W.M.; JULIUS, D. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. **Nature**, 416, p.52-8, 2002.
- MCNAUGHTON, N.; CORR, P.J. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v.28, p. 285-305, 2004.
- MERCER, J.B.; SIMON, E. A comparison between total body thermosensitivity and local thermosensitivity in mammals and birds. **Pflügers Arch.** 400, p.228-234, 1984.
- MIGUEL, T.T.; GOMES, K.S.; NUNES-DE-SOUZA, R.L. Contrasting effects of nitric oxide and corticotropinreleasing factor within the dorsal periaqueductal gray on defensive behavior and nociception in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 45, p.299-307, 2012.

MINAMI, M.; KURASHI, Y.; YAMAGUCHI, T.; NAKAI, S.; HIRAI, Y.; SATOH, M. Immobilization stress induces interleukin-1 β mRNA in the rat hypothalamus. **Neuroscience Letters**, v.123, p.254-256, 1991.

MINSON, C.T.; WLADKOWSKI, S.L.; PAWELCZYK, J.A.; KENNEY, W.L. Age, splanchnic vasoconstriction, and heat stress during tilting. **Am J Physiol**, 276, p.203–12, 1999.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v.43, p.109-142, 1991.

MONTELL, C. The TRP superfamily of cation channels. **Sci STKE**, p.272, 2005.

MORRISON, S.F. Central pathways controlling brown adipose tissue thermogenesis. **Physiology**, v.19, p.67–74, 2004.

MORRISON, S. . Differential regulation of sympathetic outflows to vasoconstrictor and thermoregulatory effectors. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.940, p.286-298, 2001.

MORRISON, S.F. RVLM and raphe differentially regulate sympathetic outflows to splanchnic and brown adipose tissue. **American Journal of Physiology**, 276, p.962–973, 1999.

MORRISON, S.F.; NAKAMURA, K. Central neural pathways for thermoregulation. **Front Biosci**, 16, p.74–104, 2011.

MUGNAINI, E.; OERTEL, W.H. An atlas of the distribution of GABAergic neurons and terminals in the rat CNS as revealed by GAD immunohistochemistry. In: Bjorklund, A., Hokfelt, T. (Eds.), *Handbook of Chemical Neuroanatomy 4: GABA and Neuropeptides in the CNS*. Elsevier, Amsterdam., 1985.

NAGASHIMA, K.; NAKAI, S.; TANAKA, M.; KANOSUE, K. Neuronal circuitries INVOLVED IN THERMOREGULATION. **Autonomic Neuroscience**, v.85, p.18–25, 2000.

NAKAMURA, K.; MATSUMURA, K.; HUBSCHLE, T.; NAKAMURA, Y.; HIOKI, H.; FUJIYAMA, F.; BOLDOGKOI, Z.; KONIG, M.; THIEL, H.J.; GERSTBERGER, R.; OBAYASHI, S.; KANEKO, T. Identification of sympathetic premotor neurons in medullary raphe regions mediating fever and other thermoregulatory functions. **J Neurosci**, 24, p.5370–80.

NAKAMURA, K.; MORRISON, S.F. A thermosensory pathway mediating heat defense responses. **Proc Natl Acad Sci USA**., 2010.

NAKAMURA, K.; MORRISON, S.F. A thermosensory pathway that controls body temperature. **Nat Neurosci**, 11, p.62–71, 2008.

NAKAMURA, K.; MORRISON, S.F. Central efferent pathways mediating skin cooling-evoked sympathetic thermogenesis in brown adipose tissue. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, 292, p.127–136, 2007.

NAKAMURA, Y.; NAKAMURA, K.; MATSUMURA, K.; KOBAYASHI, S.; KANEKO, T.; MORRISON, S.F. Direct pyrogenic input from prostaglandin EP3 receptor-expressing preoptic neurons to the dorsomedial hypothalamus. **Eur J Neurosci**, 22, p.3137–3146, 2005.

NAKAMURA, K.; MORRISON, S.F. Central efferent pathways for cold-defensive and febrile shivering. **The Journal of Physiology**, v.589, p.3641–3658, 2011.

NAKAYAMA, K.; GOTO, S.; KURAOKA, K.; NAKAMURA, K. Decrease in nasal temperature of rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) in negative emotional state. **Physiol Behav**, 84(5), p.783–90, 2005.

NOLAN, P.C.; WALDROP, T.G. In vivo and in vitro responses of neurons in the ventrolateral medulla to hypoxia. **Brain Research**, v.630, p.101–114, 1993.

OKA, T.; OKA, K.; HORI, T. Mechanisms and mediators of psychological stress-induced rise in core temperature. **Psychosomatic Medicine**, v.63, p.476–486, 2001.

OKA, T.; OKA, K.; HORI, T.; KUBO, C. Studies on the mechanisms of fever in patients with psychogenic fever: are proinflammatory cytokines involved in psychogenic fever. **Japanese Journal of Psychosomatic Medicine**, v.38 (Suppl), p.135, 1998.

OLDFIELD, B.J.; GILES, M.E.; WATSON, A.; ANDERSON, C.; COLVILL, L.M.; MCKINLEY, M.J. The neurochemical characterisation of hypothalamic pathways projecting polysynaptically to brown adipose tissue in the rat. **Neuroscience**, 110, p.515–26, 2002.

O'LEARY, D.S.; JOHNSON, J.M.; TAYLOR, W.F. Mode of neural control mediating rat tail vasodilation during heating. **J Appl Physiol**, 59, p.1533–8, 1985.

ONSTOTT, D.; MAYER, B.; BEITZ, A.J. Nitric oxide synthase immunoreactive anatomically define a longitudinal dorsolateral column within the midbrain periaqueductal gray of the rat: analysis using laser confocal microscopy. **Brain Research**, v.610, p.317–324, 1993.

OOTSUKA, Y.; MCALLEN, R.M. Interactive drives from two brain stem premotor nuclei are essential to support rat tail sympathetic activity. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, 289, p.1107–15, 2005.

OUEDRAOGO, R.M., GOETTEL, M.S., BRODEUR, J. Behavioral thermoregulation in the migratory locust: a therapy to overcome fungal infection. **Oecologia**, 138, p.312–319, 2004.

PAGLIARO, P. Differential biological effects of products of nitric oxide (NO) synthase: it is not enough to say NO. **Life Sciences**, v.73, p.2137–2149, 2003.

PARR, L.A.; HOPKINS, W.D. Brain temperature asymmetries and emotional perception in chimpanzees, *Pan troglodytes*. **Physiol Behav** 71(3–4), p.363–71, 2000.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates, 5^a ed.: **Elsevier Academic Press**, 2005.

PEIER, A.M.; MOQRICH, A.; HERGARDEN, A.C.; REEVE, A.J.; ANDERSSON, D.A.; STORY, G.M.; EARLEY, T.J.; DRAGONI, I.; MCINTYRE, P.; BEVAN, S.; PATAPOUTIAN, A. A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. **Cell**, 108, p.705–715, 2002.

PEZALLA, P. D. Morphine-induced analgesia and explosive motor behavior in an amphibian. **Brain Research**, v.273, p.297–305, 1983.

PIRES, H.H.; LAZZARI, C.R.; SCHILMAN, P.E.; DIOTAIUTI, L.; LORENZO, M.G. Dynamics of thermopreference in the Chagas disease vector *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae). **J. Med. Entomol.**, 39, p.716–719, 2002.

RATHNER, J.A.; MADDEN, C.J.; MORRISON, S.F. Central pathway for spontaneous and prostaglandin E₂-evoked cutaneous vasoconstriction. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, 295, p.343–354, 2008.

RATHNER, J.A.; MCALLEN, R.M. The lumbar preganglionic sympathetic supply to rat tail and hindpaw. **J Auton Nerv Syst**, 69, p.127–31, 1998.

RATHNER, J. A.; MORRISON, S. F. Rostral ventromedial periaqueductal gray: A source of inhibition of the sympathetic outflow to brown adipose tissue. **Brain Research**, v.1077, p.99-107, 2006.

RATHNER, J.A.; OWENS, N.C.; MCALLEN, R.A. Cold-activated raphespinal neurons in rats. **Journal of Physiology**, 535, p.841– 854, 2001.

REICHLING, D.B. GABAergic neuronal circuitry in the periaqueductal gray matter. In: Depaulis, A., Bandler, R. (Eds.). **The Midbrain Periaqueductal Gray Matter**. Plenum, New York, 1991.

RENBOURN, E. T. Body temperature and pulse rate in boys and young men prior to sporting contests. A study of emotional hyperthermia: with a review of the literature. **Journal of Psychosomatic Research**, v.4, p.149-175, 1960.

RIEDEL, W. Warm receptors in the dorsal abdominal wall of the rabbit. **Pflugers Arch**, 361, p.205–6, 1976.

RIZVI, T.A.; ENNIS, M.; SHIPLEY, M.T. Reciprocal connections between the medial preoptic area and the midbrain periaqueductal gray in rat: A WGA-HRP and PHA-L study. **Journal of Comparative Neurology**, 315, p.1–15, 1992.

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.

SANCHES, D. B.; CARNIO, E. C.; BRANCO, L.G. Central nNOS is involved in restraint stress-induced fever: evidence for a cGMP pathway. **Physiology and Behavior**, v.80, p.139-145, 2003.

SANDERS, S.K.; SHEKHAR, A. Blockade of GABA_A receptors in the region of the anterior basolateral amygdala of rats elicits increases in heart rate and blood pressure. **Brain Res**, 567(1), p.101-110, 1991.

SAWCHENKO, P. E.; SWANSON, L. W.; STEINBUSCH, H. W.; VERHOFSTAD, A. A. The distribution and cells of origin of serotonergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. **Brain Research**, v 277, p.355-360, 1983.

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.

SEWARDS, T.V.; SEWARDS, M.A. Fear and power-dominance drive motivation neural representations and pathways mediating sensory and mnemonic inputs, and outputs to premotor structures. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v.26, n. 5, p. 553-579, 2002.

SIMERLY, R.B.; SWANSON, L.W. Projections of the medial preoptic nucleus: A Phaseolus vulgaris leucoagglutinin anterograde tract tracing study in the rat. **Journal of Comparative Neurology**, 270, p.209-242, 1988.

SINGER, R.; HARKER, C. T.; VANDER, A. J.; KLUGER, M. J. Hyperthermia induced by open-field stress is blocked by salicylate. **Physiology & Behavior**, v.36, p. 1179-1182, 1986.

SMALLS, S.L.; OKERE, C.O. Acute restraint increases varicosity density and reduces the inter-varicosity distance in NADPH diaphorase-containing neurons in the rat dorsolateral periaqueductal gray matter. **Neuroscience Letters**, v.511, p.23-27, 2012.

SMITH, J.E.; JANSEN, A.S.; GILBEY, M.P.; LOEWY, A.D. CNS cell groups projecting to sympathetic outflow of tail artery: neural circuits involved in heat loss in the rat. **Brain Res**, 786, p.153-164, 1998.

SOLTIS, R.P.; COOK, J.C.; GREGG, A.E.; STRATTON, J.M.; FLICKINGER, K.A. EAA receptors in the dorsomedial hypothalamic area mediate the cardiovascular response to activation of the amygdala. **Am J Physiol**, 275(2 Pt 2)p.624-31, 1998.

SORIANO, R.N.; RAVANELLI, M.I.; BATALHÃO, M.E.; CARNIO, E.C.; BRANCO, L.G.S. Proipyretic role of the locus coeruleus nitric oxide pathway, **Experimental Physiology**, v.95.6, p.669-677, 2010.

STEINER, A.A.; BRANCO, L.G.S. Nitric oxide in the thermoregulation of body temperature and fever. **Journal of Thermal Biology**, v.26, p.325-330, 2001.

STEINER, A.A.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; MCCAN, S. M.; BRANCO, L. G. S. Antipyretic role of the NO-cGMP pathway in the anteroventral preoptic region of the rat brain. **American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v.282, p.584-593, 2002.

STEPHENSON-JONES, M.; SAMUELSSON, E.; ERICSSON, J.; ROBERTSON, B.; GRILLNER, S. Evolutionary conservation of the basal ganglia as a common vertebrate mechanism for action selection. **Current Biology**, v.21, p.1081–1091, 2011.

STORY, G.M.; PEIER, A.M.; REEVE, A.J.; EID, S.R.; MOSBACHER, J.; HRICIK, T.R.; EARLEY, T.J.; HERGARDEN, A.C.; ANDERSSON, D.A.; HWANG, S.W.; MCINTYRE, P.; JEGLA, T.; BEVAN, S.; PATAPOUTIAN, A. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. **Cell**, 112, p.819–29, 2003.

TANAKA, M.; NAGASHIMA, K.; MCALLEN, R.M.; KANOSUE, K. Role of the medullary raphe in thermoregulatory vasomotor control in rats. **J Physiol**, 540, p.657–64, 2002.

TANAKA, M.; TONOUCHE, M.; HOSONO, T.; NAGASHIMA, K.; YANASE-FUJIWARA, M.; KANOSUE, K. Hypothalamic region facilitating shivering in rats. **Jpn J Physiol**, 51, p.625–629, 2001.

TATTERSALL, G.; 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.

TEN DONKELAAR, H. J.; DE BOER-VAN HUIZEN, R. A possible pain control system in a non-mammalian vertebrate (a lizard, *Gekko gekko*). **Neuroscience Letters**, v.83, p.65–70, 1987.

TER HORST, G. J.; LUITEN, P. G. The projections of the dorsomedial hypothalamic nucleus in the rat. **Brain Research Bulletin**, v.16, p.231–248, 1986.

TERLOUW, E.M.C.; KENT, S.; CREMONA, S.; DANTZER, R. Effect of intracerebroventricular administration of vasopressin on stress-induced hyperthermia in rats. **Physiology & Behavior**, v.60, p. 417-424, 1996.

THOMPSON, R.H.; CANTERAS, N.S.; SWANSON, L.W. Organization of projections from the dorsomedial nucleus of the hypothalamus: a PHA-L study in the rat. **J Comp Neurol**, 376 (1), p.143-73, 1996.

THOMPSON, R. H.; CANTERAS, N. S.; SWANSON, L. W. Organization of projections from the dorsomedial nucleus of the hypothalamus: a PHA-L study in the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v.376, p.143–173, 1996.

TOTH, I.E.; TOTH, D.E.; BOLDOGKOI, Z.; HORNYAK, A.; PALKOVITS, M.; BLESSING, W.W. Serotonin-synthesizing neurons in the rostral medullary raphe/parapyramidal region transneuronally labelled after injection of pseudorabies virus into the rat tail. **Neurochem Res**, 31, p.277–86, 2006.

TSENG, L.F.; WEI, E.T.; LOH, H.H.; LI, C.H. Endorphin: central sites of analgesia, catalepsy and body temperature changes in rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.214, p.328-332, 1980.

ULIANA, D.L.; HOTT, S.C.; LISBOA, S.F.; RESSTEL, L.B.M. Dorsolateral periaqueductal gray matter CB1 and TRPV1 receptors exert opposite modulation on expression of contextual fear conditioning. **Neuropharmacology**, 103, p.257-269, 2016.

VINKERS, C.H.; VAN BOGAERT, M.J.; KLANKER, M.; KORTE, S.M.; OOSTING, R.; HANANIA, T.; HOPKINS, S.C. Translational aspects of pharmacological research into anxiety disorders: the stress-induced hyperthermia (SIH) paradigm. **Eur J Pharmacol**, 585(2-3), p.407-25, 2008.

VIZIN, R.C.L.; SCARPELLINI, C.da S.; ISHIKAWA, D.T; CORREA, G.M.; SOUZA, C.O. de; GARGAGLIONI, L. H.; CARRETTIERO, D.C; BÍCEGO, K.C.; ALMEIDA, M.C. TRPV4 activates autonomic and behavioural warmth-defence responses in Wistar rats, **Acta Physiologica**, volume 214, issue 2, p.275-289, 2015.

WALLIN, B.G.; CHARKOUDIAN, N. Sympathetic neural control of integrated cardiovascular function: insights from measurement of human sympathetic nerve activity. **Muscle Nerve**, 36, p.595-614, 2007.

WANG, M.R.; KUO, J.S.; CHAI, C.Y. Nitric oxide produces different actions in different areas of the periaqueductal grey in cats. **Neuroscience Letters**, v.309, p.57-61, 2001.

XING, J.; LI, D.P.; LI, J. Role of GABA receptors in nitric oxide inhibition of dorsolateral periaqueductal gray neurons. **Neuropharmacology**, 54, p.734-744, 2008.

XU, H.; RAMSEY, I.S.; KOTTECHA, S.A.; MORAN, M.M.; CHONG, J.A.; LAWSON, D.; GE, P.; LILLY, J.; SILOS-SANTIAGO, I.; XIE, Y.; DISTEFANO, P.S.; CURTIS, R.; CLAPHAM, D.E. TRPV3 is a calcium-permeable temperature sensitive cation channel. **Nature**, 418, p.181-6, 2002.

YOSHIDA, K.; KASAMA, K.; KITABATAKE, M.; IMAI, M. Biotransformation of nitric oxide, nitrite and nitrate. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, v52, p.103-115, 1983.

YOSHIDA, K.; NAKAMURA, K.; MATSUMURA, K.; KANOSUE, K.; KONIG, M.; THIEL, H.J.; BOLDOGKOI, Z.; TOTH, I.; ROTH, J.; GERSTBERGER, R.; HUBSCHLE, T. Neurons of the rat preoptic area and the raphe pallidus nucleus innervating the brown adipose tissue express the prostaglandin E receptor subtype EP3. **Eur J Neurosci**, 18, p.1848-60, 2003.

YOSHIDA, K.; KONISHI, M.; NAGASHIMA, K.; SAPER, C. B.; KANOSUE, K. Fos activation in hypothalamic neurons during cold or warm exposure: projections to periaqueductal gray matter. **Neuroscience**, v.133, p.1039-1046, 2005.

ZARETSKAIA, M.V.; ZARETSKY, D.V.; SHEKHAR, A.; DIMICCO, J.A. Chemical stimulation of the dorsomedial hypothalamus evokes non-shivering thermogenesis in anesthetized rats. **Brain Res**, 928, p.113-125, 2002.

ZARETSKAIA, M.V.; ZARETSKY, D.V.; DIMICCO, J.A. Role of the dorsomedial hypothalamus in thermogenesis and tachycardia caused by microinjection of prostaglandin E2 into the preoptic area in anesthetized rats. **Neurosci Lett**, 340, p.1-4, 2003.

ZEISBERGER, E. Cold adaptation. In: Blatteis, C. (Ed.). **Physiology and Pathophysiology of Temperature Regulation**. World Scientific, Singapore, pp. 207–227, 1998.

ZHANG, Y. H; HOSONO T.; YAMADA, K.; CHEN, X.M.; SHIOSAKA, S.; KANOSUE, K. Efferent neuronal organization of thermoregulatory vasomotor control. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.813, p.117–122, 1997.

ZHANG, Y. H; HOSONO T.; YANASE-FUJIWARA, M.; CHEN, X. M.; KANOSUE, K. Effect of midbrain stimulations on thermoregulatory vasomotor responses in rats. **The Journal of Physiology**, v.503, p.177–186, 1997.