

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS UFSCAR/UNESP

**Regulação da temperatura corporal: sensores e
efetores térmicos**

Carolina da Silveira Scarpellini

Araraquara, SP, 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS UFSCAR/UNESP

Regulação da temperatura corporal: sensores e
efetores térmicos

Carolina da Silveira Scarpellini

Orientadora: Kênia Cardoso Bicego

Co-orientadora: Maria Camila Almeida

Tese apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, associação ampla entre a Universidade Federal de São Carlos e a Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências, área de Ciências Fisiológicas.

Araraquara, SP, 2016

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

S286r Scarpellini, Carolina da Silveira
Regulação da temperatura corporal : sensores e
efetores térmicos / Carolina da Silveira
Scarpellini. -- São Carlos : UFSCar, 2016.
111 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2016.

1. Temperatura Corporal. 2. TRPV4. 3. Área pré-
óptica. 4. Osmorregulação. 5. Resfriamento encefálico.
I. Título.

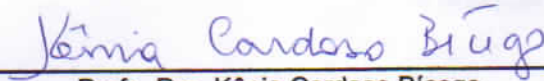


UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

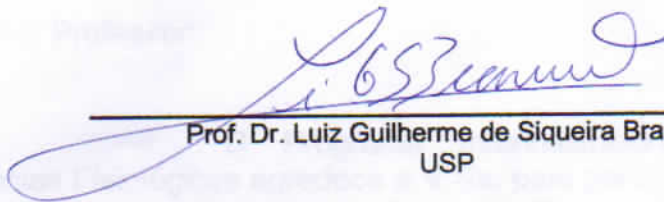
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Carolina da Silveira Scarpellini, realizada em 12/02/2016:



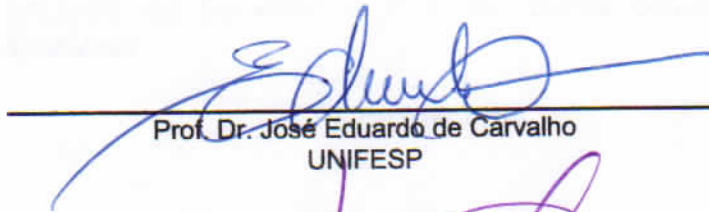
Profa. Dra. Kênia Cardoso Bicego
UNESP



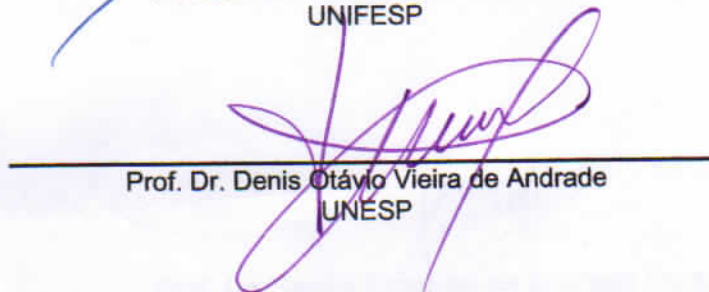
Prof. Dr. Luiz Guilherme de Siqueira Branco
USP



Profa. Dra. Patricia Maria de Paula
UNESP



Prof. Dr. José Eduardo de Carvalho
UNIFESP



Prof. Dr. Denis Otávio Vieira de Andrade
UNESP

Dedico este trabalho ao meu esposo, Buyu, aos meus pais, Maria Aparecida e João Carlos, aos meus irmãos, Ennio e Eduardo, as minhas cunhadas, Mariângela e Michele e aos meus sobrinhos, Vicente e Antônio, por todo incentivo, paciência e pelos momentos de infinita felicidade que me proporcionam. A vocês, toda a minha gratidão e o meu amor.

AGRADECIMENTOS

A minha família, por ser o berço dos meus valores, o lugar que renova minhas esperanças e o porto seguro para onde eu sempre poderei voltar.

À professora Kênia, que após 11 anos de parceria, se tornou minha amiga, além de orientadora. Obrigada pela paciência ao longo dos anos, pela convivência sempre harmoniosa e por me ensinar que devagar se vai longe.

À professora Maria Camila, por me co-orientar de forma tão presente e amigável através de todos os meios de comunicação disponíveis.

Ao professor Glenn J. Tattersall, pela oportunidade oferecida e paciência ao longo de todo o processo do intercâmbio.

À professora Luciane, por dividir com a Kênia a minha formação nestes anos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da UFSCar/UNESP, pela oportunidade.

À UNESP de Jaboticabal, pela estrutura proporcionada e pela minha formação como profissional desde a aprovação no vestibular até aqui.

À Brock University e a todos que não mediram esforços para me ajudarem no processo de imigração para o Canadá durante o intercâmbio: Sheila Young, Liv Park e Jade Bowie.

A todos os companheiros do laboratório de Fisiologia, pela ajuda, convivência, aprendizado, paciência e boas risadas: Paula, Lucas, Lara, Giuliana, Caroline, Victor, Gabriela, Vivian, Camila, Jolene, Kassia, Mariane, Luis Gustavo, Danuzia, Elisa, Lays, Leonardo, Carlos e Jaime. Em especial à Gabriela pela ajuda com as cirurgias e os experimentos com o gradiente térmico.

Ao Euclides, Gabriela, Renata e Raquel, pelo auxílio diário no laboratório e cuidado com os animais.

Aos companheiros do laboratório E³PL (Evolutionary, Ecological & Environmental Physiology), Ian, Jacob e Tom, pelos bons momentos, ensinamentos com as novas técnicas e o cuidado com os lagartos durante o intercâmbio.

Às amigas descobertas durante o intercâmbio, Laila, Débora e Luciane, pelo companheirismo em terras estrangeiras.

Aos amigos, Matheus, Vanessa, Roberta, Andreza, Thamyres, Juliana, Neliane, Felipe, Marta, Débora, Ana Carla, Patrícia, Marita, Livia e Camila, que mesmo distantes sempre se fizeram presentes. Em especial à Roberta que além da amizade, emprestou sua

criatividade, talento e profissionalismo na confecção de todos os pôsteres de congresso e esquemas usados em apresentações.

Aos amigos que fizeram toda a diferença durante a caminhada em direção ao final do doutorado, tornando este processo muito mais leve e prazeroso, Leticia, Lucas, Nayara, Giuliana, Breno e Fernando. Obrigada por ouvir os desabafos, pelas terapias semanais e pelas inúmeras gargalhadas.

À FAPESP (#2011/19131-2), ao CNPq e Capes (Ciência sem Fronteiras, #209872/2013-6) e ao governo canadense (Emerging Leaders in the Americas Program), pelo apoio financeiro concedido durante os quatro anos de doutorado.

E a Deus, por me conduzir até aqui.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	10
Regulação da Temperatura corporal (Tc): importância e detecção:	10
Regulação da Temperatura corporal (Tc): integração e processamento da informação	13
Regulação da Temperatura corporal (Tc): efetores	16
Regulação da Temperatura corporal (Tc): investigando o papel do TRPV4 periférico e central	20
Regulação da Temperatura corporal (Tc): influências de outros sistemas.....	22
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24

Capítulo 1. TRPV4 periférico ativa respostas autonômicas e comportamentais de defesa ao calor em ratos Wistar

RESUMO	31
ABSTRACT	32
LISTA DE ABREVIACÕES	33
1. INTRODUÇÃO	34
2. MATERIAL E MÉTODOS	36
Animais	36
Fármacos.....	36
Procedimentos cirúrgicos	36
Medidas de Consumo de Oxigênio.....	37
Protocolos experimentais.....	38
Processamento e análise dos dados.....	40
3. RESULTADOS	41
Efeito do bloqueio químico do TRPV4 na Tc e nos termofetores autonômicos, termogênese e tônus vasomotor da cauda:	41
Efeito da manipulação do TRPV4 na termorregulação comportamental – gradiente térmico:	44
4. DISCUSSÃO	45
Papel dos TRPV4 quanto a Ta é fixa	46
Papel do TRPV4 quando a Ta pode ser selecionada pelo animal.....	47
Perspectivas.....	48
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

Capítulo 2. Participação dos TRPV4 centrais na ativação de respostas de perda de calor em ratos.....	54
RESUMO.....	55
ABSTRACT	56
LISTA DE ABREVIACÕES	57
1. INTRODUÇÃO	58
2. MATERIAL E MÉTODOS	60
Animais	60
Fármaco	60
Cirurgias.....	60
Microinjeção e procedimento histológico.....	61
Medidas da Tc e temperatura da pele da cauda (Tp):	62
Medidas de Consumo de Oxigênio.....	62
Medidas de temperatura de preferência em gradiente térmico.....	63
Protocolos Experimentais.....	64
Análise dos resultados.....	65
3. RESULTADOS	66
Sítios de microinjeção na área pré-óptica medial	66
Efeito da microinjeção intra MPA de antagonista de TRPV4 sobre Tc de ratos expostos a 28°C	67
Efeito da microinjeção intra MPA de antagonista de TRPV4 sobre Tc de ratos expostos a 21°C:.....	68
Efeito da microinjeção intra MPA de antagonista de TRPV4 sobre os termofetores autonômicos, termogênese e tônus vasomotor da cauda, a 28°C:	68
Efeito da microinjeção intra MPA de antagonista de TRPV4 sobre a Ta de preferência:	70
4. DISCUSSÃO	71
Papel dos TRPV4 centrais no controle da Tc e os termofetores envolvidos.....	71
Modelo proposto para o mecanismo de ação termolítica dos TRPV4 na MPA	73
Críticas da metodologia	75
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

Capítulo 3. Consequências termorreguladoras do aumento da osmolalidade plasmática em lagartos <i>Pogona vitticeps</i>	81
RESUMO.....	82
ABSTRACT	83
LISTAS DE ABREVIÇÕES.....	84
1. INTRODUÇÃO	85
2. MATERIAL E MÉTODOS	88
Animais	88
Injeções.....	88
Concentração plasmática	88
<i>Shuttle box</i>	89
<i>Gaping</i>	91
Consumo de oxigênio	91
Análise estatística	94
3. RESULTADOS	95
Osmolalidade plasmática e consumo de água	95
Efeito das injeções de salina hipertônica no comportamento de <i>shuttling</i>	95
Efeito das injeções de salina hipertônica no <i>gaping</i>	95
Efeito das injeções de salina hipertônica nas temperaturas da superfície da cabeça e do corpo.....	97
Efetividade do <i>gaping</i> para a PEA e efeito das injeções de salina hipertônica no metabolismo e na PEA	99
4. DISCUSSÃO	101
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107
Apêndices.....	111
Apêndice A.....	111
Apêndice B.....	130

1. INTRODUÇÃO GERAL

Regulação da Temperatura corporal (T_c): importância e detecção

Poucos fatores têm tanta influência sobre as variáveis fisiológicas e bioquímicas de um animal quanto a temperatura (Randall et al., 2000). A temperatura pode alterar desde a quantidade do oxigênio dissolvido na água até a atividade neuronal, contratibilidade dos cardiomiócitos ou função imunológica dos animais, interferindo diretamente na sobrevivência deles (Wenisch et al., 1996; Wasserstrom and Vites, 1999; Aihara et al., 2001, Odum, 2012). Assim, é evidente que a manutenção da temperatura corporal (T_c) dentro de certos limites fisiológicos é indispensável para o funcionamento equilibrado do organismo como um todo.

Os animais em geral, por meio de mecanismos termofetores autonômicos e/ou comportamentais, conseguem regular suas T_cs dentro de limites compatíveis com sua sobrevivência (Bícego et al., 2007). Estes mecanismos serão discutidos adiante, entretanto, já se faz necessário esclarecer que o uso da palavra “autonômico” no presente trabalho não se refere necessariamente a mecanismos controlados pelo sistema nervoso autônomo, mas sim a mecanismos termorreguladores “involuntários”, em oposição aos mecanismos comportamentais de regulação da T_c, geralmente chamados de “voluntários” ou “comportamentos motivados” (Glossary of Terms For Thermal Physiology, 2001; Morrison e Nakamura, 2011).

A forma como a manutenção da T_c acontece nos vertebrados pode diferir entre as espécies: alguns animais (peixes, anfíbios e répteis) regulam suas T_cs principalmente por meio de uma fonte externa de energia térmica, comumente o sol, e são chamados de ectotermos. Já os endotermos (aves e mamíferos) dependem especialmente de uma fonte interna de calor, vinda do próprio metabolismo (Bícego et al., 2007). Apesar destas diferenças, a regulação da T_c nos animais em geral depende, primeiramente, que a variação da temperatura ambiente (T_a) seja detectada por receptores da pele e que tal informação seja levada ao sistema nervoso central para integração, processamento e elaboração das devidas respostas que, por sua vez, ao serem efetuadas pelos órgãos periféricos silenciam os receptores cutâneos fechando a alça de *feedback negativo*. De fato, pelo menos em mamíferos, também há termorreceptores na cavidade abdominal e no próprio encéfalo e medula espinal, mas são aqueles localizados na pele que providenciam, às regiões centrais

termorreguladoras, as informações essenciais para uma rápida ativação dos efetores e, consequente, manutenção da Tc (Bratincsák e Palkovits, 2005).

Recentemente foram identificados alguns canais não seletivos para cátions (TRPs: “*transient receptor potential*” channels) que respondem a diversos estímulos, tais como: hipertonicidade, som, acidez e temperatura (Voets e Nilius, 2003; Talavera et al., 2008; Cui et al., 2011). Os TRPs são uma família de receptores de membrana com seis domínios transmembranares cada (Clapham, 2003) e, atualmente, sabe-se que nove deles são sensíveis à variação de temperatura (termoTRP). Apesar de nove TRPs responderem à temperatura, apenas seis estão presentes nas terminações nervosas livres cutâneas ou nos queratinócitos da pele e, então, têm sido sugeridos como possíveis termorreceptores: TRPM8, A1 e V1-V4 (Fig. 1; Patapoutian et al., 2003; Caterina, 2007).

O que é conhecido a respeito dos TRPM8 e A1 é que eles são ativados por temperaturas frias, não nocivas e nocivas, respectivamente. O TRPM8 pode ser ativado por substâncias como mentol e eucaliptol e já foi demonstrado que camundongos *knock out* para este receptor têm déficit na detecção de temperaturas frias não nocivas (Bautista et al., 2007; Colburn et al., 2007; Dhaka et al., 2007). Ainda, um estudo mais recente com animais não geneticamente modificados mostrou que o uso de um antagonista específico para M8 bloqueou as respostas de defesa ao frio e diminuiu a Tc quando a temperatura da cauda dos animais estava abaixo de 23°C (Almeida et al., 2012), corroborando a ideia de que estes receptores são importantes para a detecção do frio moderado. Em relação aos TRPA1, *in vitro*, eles são ativados por temperaturas abaixo de 17°C e, por isso, sugeridos como sensores de frio nocivo (Story et al., 2003; Obata et al., 2005; Katsura et al., 2006), embora outro estudo tenha demonstrado que a sensação de frio é pouco afetada em camundongos *knock out* para TRPA1 (Bautista et al., 2006). Desta forma, ainda são necessários mais estudos para determinar o papel deste receptor na termorregulação.

Quanto aos receptores TRPV1-4, é conhecido que eles são sensíveis a temperaturas quentes nocivas (V1-2) ou mornas (V3-4). Os TRPV1 são ativados por temperaturas acima de 42°C e por agonistas exógenos como a capsaicina, substância encontrada nas pimentas ardidas, ou o etanol e estão presentes em neurônios sensoriais e nociceptivos, sendo considerados receptores essenciais para o desenvolvimento da hiperalgesia térmica (Caterina et al., 2000; Davis et al., 2000; Trevisani et al., 2002; Moriyama et al., 2005; Caterina, 2007). Já os TRPV2 respondem a temperaturas acima de 52°C e também são encontrados em neurônios sensoriais, embora não há nenhuma evidência *in vivo* deste receptor como termosensor (Huang et al., 2006). Estudos *in vitro* mostram que

os TRPV3 e V4 respondem a temperaturas acima de 33°C e acima de 24°C, respectivamente (Patapoutian et al., 2003), e são encontrados predominantemente nos queratinócitos. Camungondos *knock out* para V3 apresentam reduzida sensibilidade a temperaturas mornas (Moqrich et al., 2005) e os *knock out* para V4 selecionam Tas mais quentes que os animais selvagens quando colocados em um gradiente térmico (Lee et al., 2005). Tais dados indicam que os queratinócitos da pele, via V3 e V4, devem se comunicar com os neurônios sensoriais primários informando-os sobre os estímulos quentes não nocivos periféricos. Tal comunicação tem sido proposta ser mediada por ATP (Peier et al., 2002; Mandadi et al., 2009) ou prostaglandina E2 (Huang et al., 2008).

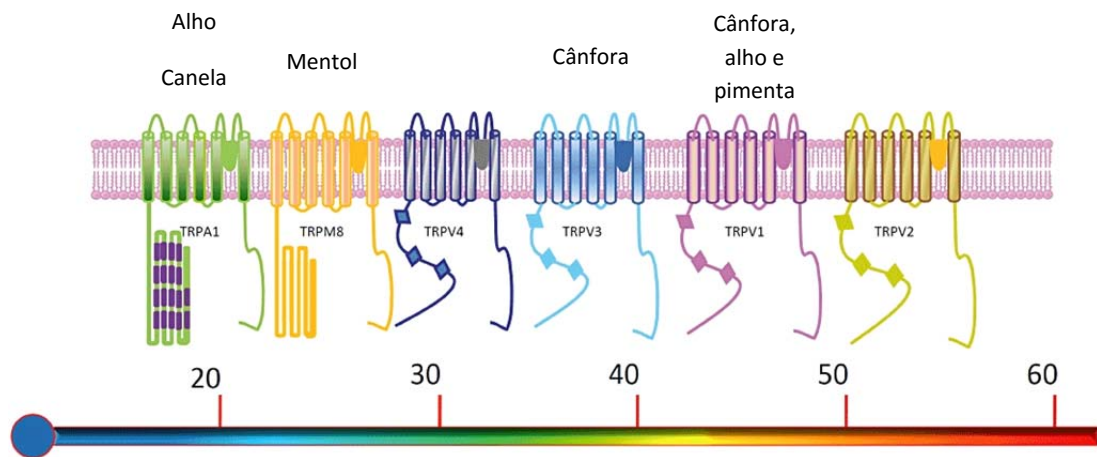


Fig. 1. Representação esquemática dos TRPs e suas respectivas faixas de temperaturas de ativação. Cada termoTRP é também ativado por compostos naturais, como indicado acima dos receptores, que são sugeridos induzirem relevante sensação térmica ou de dor em humanos. Figura adaptada de Vay et al., 2012.

Sobre o mecanismo de abertura destes canais, é sugerido que nos receptores sensíveis ao calor, há uma desestabilização do estado “fechado” do canal quando a temperatura aumenta, facilitando a abertura do mesmo e o contrário ocorre nos receptores de frio: a estabilização do estado “aberto” acontece quando a temperatura é diminuída, promovendo a abertura do receptor (Voets et al., 2004).

É ainda interessante notar que a participação dos termoTRPs na termorrecepção não parece ser característica exclusiva de mamíferos, pois foi observado que a inibição de TRPM8 e TRPV1 abole a termorregulação comportamental em crocodilos, indicando que tais sensores são importantes também nesses animais (Seebacher e Murray, 2007) e talvez em todos os vertebrados. Embora muitos estudos ainda sejam necessários para elucidar completamente a via da termorregulação, a descoberta dos TRPs já contribuiu

enormemente nos últimos anos para o conhecimento dos mecanismos de transdução da informação térmica cutânea. Nós voltaremos a este assunto mais tarde já que ele foi foco dos dois primeiros capítulos deste trabalho, mas primeiramente, discutiremos sobre a sequência que a informação térmica segue após ser detectada pelos receptores periféricos.

Regulação da Temperatura corporal (T_c): integração e processamento da informação

Existe uma região no sistema nervoso central dos vertebrados chamada *área pré-óptica do hipotálamo* (APO) que é, especialmente em mamíferos, de extrema importância para a termorregulação. A APO situa-se na transição entre o diencéfalo e o telencéfalo e é sugerida ser termossensível, pois detecta as alterações térmicas locais, além de termointegradora, já que recebe informações térmicas de várias regiões do organismo por meio dos receptores periféricos (Lepkovsky et al., 1968; Lillywhite, 1971; Berk e Heath; 1975; Boulant, 1998; Bicego et al., 2007). Na APO são encontrados principalmente neurônios sensíveis à variação de temperatura (~ 20%), que aumentam a frequência de disparos frente a um aumento da T_a ou da própria temperatura hipotalâmica (~0.8 potenciais de ação/°C) e neurônios insensíveis à variação de temperatura (~75%) que, por outro lado, mostram pouca ou nenhuma mudança na sua atividade espontânea frente a alterações na temperatura local ou T_a. Recentemente foi sugerido por Wechselberger e colaboradores (2006) que os canais de potássio são críticos para a determinação da termossensibilidade dos neurônios hipotalâmicos: quanto maior a corrente iônica do canal de potássio, maior a hiperpolarização e menor a frequência de disparo dos neurônios, possivelmente como acontece naqueles insensíveis ao calor. Segundo o modelo proposto por Hammel (1965) e modificado posteriormente por Boulant (2006), quando os neurônios sensíveis à variação de temperatura são ativados pelo aumento de temperatura (local ou periférico), eles estimulam os neurônios efetores de perda e inibem os efetores de produção de energia térmica levando à manutenção da T_c. Entretanto, quando a temperatura é reduzida, a frequência destes neurônios é diminuída de tal modo que a frequência daqueles insensíveis à temperatura prevaleça, inibindo os efetores de perda e ativando os efetores de produção de calor, resultando no controle da T_c frente ao frio (Fig. 2).

As informações térmicas da periferia recebidas pela APO não são enviadas diretamente pelos termorreceptores cutâneos. Primeiramente, os neurônios sensoriais primários, que contém os receptores de temperatura ou que recebem informação térmica dos queratinócitos, fazem sinapse no corno dorsal da medula espinal, de onde neurônios de segunda ordem dirigem-se ao encéfalo. Duas vias são atualmente conhecidas para a

transmissão das informações térmicas: uma delas vai da medula ao tálamo e de lá outros neurônios aferentes seguem para córtex somatossensorial primário e para a ínsula (Bear, 2006, revisão de Romanovsky, 2007). Esta via é conhecida como espinotalamocortical e é responsável pela percepção e discriminação da temperatura cutânea. A segunda via é a que chega até a APO e ativa as respostas efetoras de acordo com as alterações na T_a .

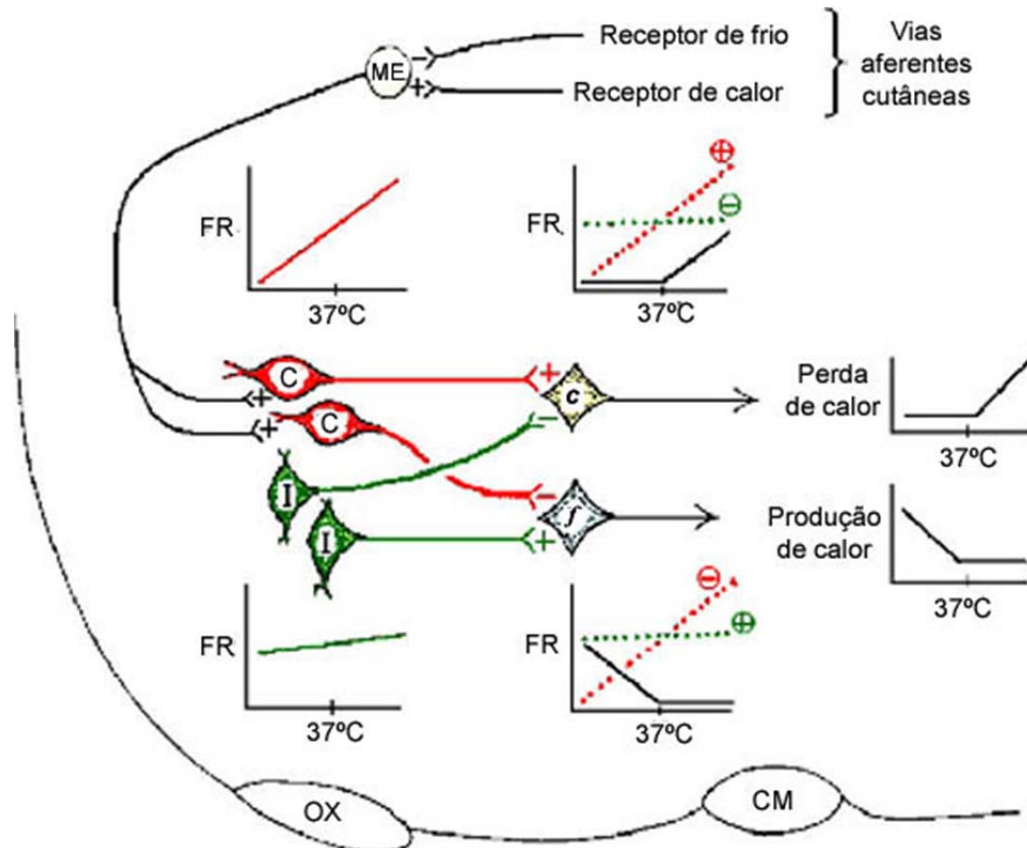


Fig. 2. Modificação sugerida por Boulant (2006) do modelo proposto por H. T. Hammel (1965) para explicar o mecanismo neuronal hipotalâmico de regulação da temperatura corporal. A cor vermelha se refere aos neurônios sensíveis ao calor e as suas respectivas frequências de disparo. A cor verde é relativa aos neurônios insensíveis à variação de temperatura e suas frequências de disparo. Os gráficos mostram a frequência de disparos (FR) de cada neurônio e as mudanças termorreguladoras (à direita; produção e perda de calor) de acordo com as alterações na temperatura hipotalâmica. Linhas pontilhadas indicam a frequência das sinapses excitatórias (+) e inibitórias (-). Quando os neurônios sensíveis ao calor estão ativados (C), eles ativam os neurônios efetores de perda de calor (*c*) e inibem os efetores de produção de calor (*f*). Quando a frequência de disparo dos neurônios insensíveis à variação de temperatura (I) é superior a dos C, os *c* são inibidos e os *f* são ativados. ME: neurônio do corno dorsal da medula espinal; OX, quiasma óptico; CM: corpo mamilar. (Adaptado de Boulant, 2006).

Nakamura e Morrison (2008, 2010) contribuíram de forma significativa para o conhecimento atual sobre as vias de controle da Tc. No modelo sugerido por estes autores, em ambientes quentes, os neurônios de segunda ordem da medula espinal, depois de receberem as informações dos termorreceptores periféricos, ativam o núcleo parabraquial dorsal por neurotransmissão glutamatérgica que, por sua vez, envia aferências também glutamatérgicas ao núcleo pré-óptico mediano (MnPO). Do MnPO, neurônios excitatórios (Glu) seguem em direção à área pré-óptica medial (MPA), ativando então esta região. A MPA, provavelmente por meio dos neurônios sensíveis ao calor, inibe, via aferências gabaérgicas, regiões encefálicas caudais (hipotálamo dorso medial e núcleo rostral da rafe) responsáveis pela ativação dos efetores de produção e conservação de energia térmica. Se tais efetores são inibidos pela MPA, a produção e conservação de energia térmica são reduzidas, regulando a Tc. No caso de ambiente frio, os receptores cutâneos transmitem a informação periférica aos neurônios espinais que seguem em direção ao núcleo parabraquial lateral e, daí, ao MnPO. Entretanto, do MnPO, aferências gabaérgicas são enviadas à MPA, inibindo esta região e, portanto, desinibindo as regiões caudais que ativam os efetores de produção e conservação de calor, controlando assim a Tc (Nakamura, 2011; Fig. 3).

Apesar das vias termossensoras estarem bem descritas para mamíferos (ratos), este assunto ainda é muito pouco estudado em ectotermos. O que se sabe atualmente é que três espécies (uma de crocodilo e duas de peixes teleósteos) possuem TRPs sensíveis à temperatura (Seebacher e Murray, 2007; Gau et al., 2013; Nisembaum et al., 2015) e que a APO também parece ser um sítio importante para a termorregulação de peixes, anfíbios e répteis (Lillywhite, 1971; Berk e Heath, 1975; Nelson e Prosser, 1979; Bicego e Branco, 2002), mas ainda não existe nenhum dado se a via termorreguladora em ectotermos é a mesma ou parecida com a descrita para mamíferos.

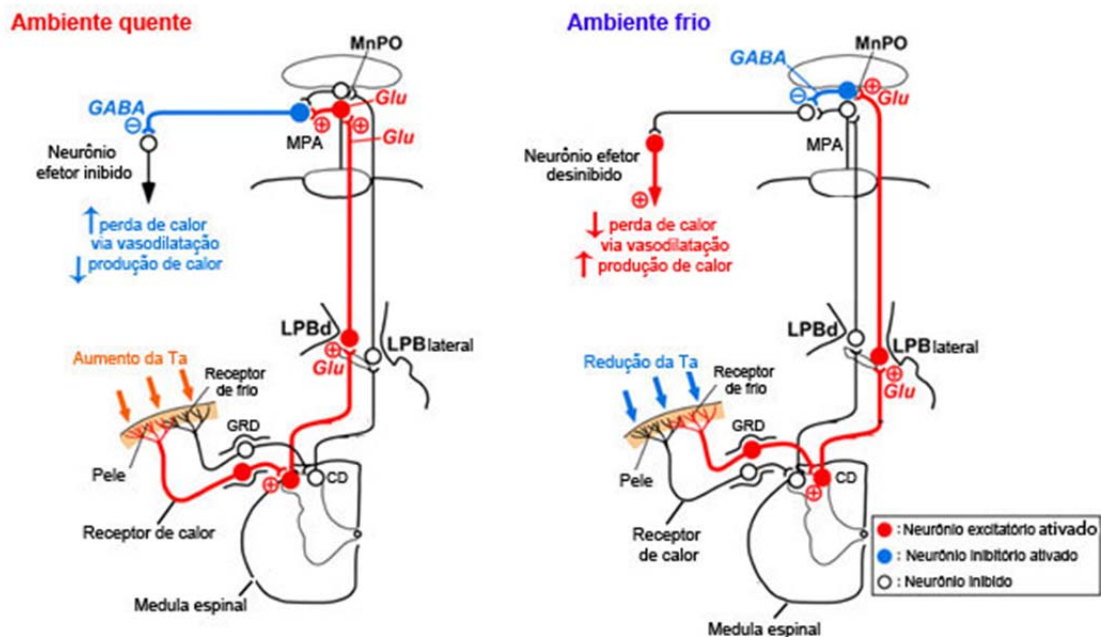


Fig. 3. Esquema do modelo proposto por Nakamura e Morrison (2008, 2010) para a via termossensora de regulação da temperatura corporal a partir da pele. Em ambiente quente, o MnPO envia aferências excitatórias para a MPA que inibe os neurônios eferentes de produção e conservação de calor, reduzindo então a produção e aumentando a perda de calor. Em ambiente frio, o MnPO inibe a MPA e desinibe os neurônios eferentes de produção e conservação de calor, aumentando-as. GRD: gânglio da raiz dorsal da medula espinal; CD: corno da raiz dorsal da medula espinal; LPBd: núcleo parabraquial dorsal; LPBlateral: núcleo parabraquial lateral; MnPO: núcleo pré óptico mediano; MPA: área pré-óptica medial; Glu: glutamato. Adaptado de Nakamura e Morrison (2010).

Regulação da Temperatura corporal (T_c): efetores

Nesta seção, veremos em detalhes a última parte do caminho da informação térmica: após os sinais serem enviados da periferia, integrados e processados centralmente, respostas apropriadas são enviadas aos órgãos efetores, aumentando ou diminuindo a produção, conservação e a perda de energia térmica e regulando a T_c .

Como mencionado no início desta introdução, há duas classes de mecanismos efetores de termorregulação: os autonômicos e os comportamentais. Os primeiros são aqueles ditos “involuntários” ou não motivados e são encontrados principalmente em endotermos (animais que possuem alta produção de energia térmica endógena e eficiente isolante térmico; Bicego et al., 2007). Dentre os autonômicos em endotermos, alguns exemplos são: a taxa metabólica basal, a termogênese dependente e independente de tremor (produção de calor), a vasoconstrição e a piloereção (conservação de energia térmica) e a sudorese e a ofegação (perda de energia térmica). Por outro lado, os mecanismos comportamentais são aqueles

“voluntários” ou motivados (Nakamura e Morrison, 2011), considerados os mais antigos na escala filogenética, os menos energeticamente dispendiosos e podem ser exemplificados pela busca por um ambiente mais frio ou mais quente e a adoção de posturas corporais que facilitam ou dificultam a transferência de calor para o ambiente (Bícego et al., 2007). A regulação da T_c nos ectotermos, por possuírem baixa produção endógena de energia térmica e isolante térmico pouco eficiente, depende principalmente dos mecanismos comportamentais e, por esta razão, estes animais têm suas T_c s mais parecidas com as T_a s, uma vez que estão mais sujeitos às alterações ambientais e dispõe de menos recursos endógenos para controlarem a T_c . Em contrapartida, os endotermos, por meio da modulação dos mecanismos autonômicos e por contarem com um isolante térmico mais eficiente, são capazes de regular a T_c dentro de uma faixa estreita por determinado tempo mesmo em um ambiente com ampla variação de T_a . Entretanto, é importante dizer que apesar da dependência dos ectotermos em relação aos mecanismos comportamentais, alguns répteis também podem apresentar mecanismos autonômicos como variações de fluxo sanguíneo periférico dependente da T_a , ofegação, termogênese por tremor durante a incubação de seus ovos (observada em pítons), dentre outros (revisão de Bícego et al., 2007).

Quanto aos mecanismos autonômicos, a conservação de energia térmica ocorre principalmente por vasoconstrição periférica e piloereção (mamíferos), embora alguns animais possuam outros artifícios como o mecanismo de contracorrente e/ou camada subcutânea de gordura. A vasoconstrição periférica implica em um menor fluxo sanguíneo para a pele causando uma queda na temperatura deste órgão e, dessa forma, a diferença termal entre a pele e o ambiente é reduzida. Além disso, durante a piloereção, a camada de ar aprisionada entre os pelos apresenta uma temperatura intermediária entre a temperatura da pele e a T_a e, assim, a diferença termal entres os dois meios é gradativa ao invés de robusta. A redução na diferença térmica ou a formação de um gradiente térmico entre os dois meios contribuem para uma menor transferência de calor do animal para o ambiente e, assim, mais energia térmica é conservada no organismo. Quanto ao mecanismo de contracorrente, ele é geralmente observado em animais que vivem em ambientes frios, como golfinhos, baleias e gaivotas. Nestes animais, as artérias (sangue aquecido) que se direcionam para as extremidades são rodeadas por muitas veias (sangue resfriado), proporcionando assim transferência de calor entre os vasos sanguíneos, ou seja, o sangue arterial chega à extremidade mais resfriado - o que garante um menor gradiente termal entre a superfície corporal e o meio que a rodeia, implicando em menor perda de energia do animal - enquanto o sangue venoso chega ao centro do corpo mais aquecido, conservando a energia térmica dentro

do animal. A gordura, por sua vez, contribui para a conservação da energia térmica endógena por ser um bom isolante térmico e um tecido pouco vascularizado (Willmer et al., 2005).

Quanto à produção de energia térmica, esta pode ser classificada em obrigatória ou facultativa. Todos os processos metabólicos de um organismo resultam na liberação de energia, assim, termogênese obrigatória é a produção de energia decorrente dos processos metabólicos basais durante o repouso e em condições de conforto térmico para o animal. Qualquer aumento na taxa metabólica (decorrente de digestão, atividade física ou desafio térmico) implica em maior liberação de energia térmica e constitui a chamada termogênese facultativa. O desafio térmico pode ativar duas vias de produção de calor: dependente ou independente de tremor. O tremor consiste em movimentos involuntários da musculatura esquelética sem que haja realização de trabalho mecânico, resultando no aumento da taxa de produção de energia térmica (Glossary of Terms for Thermal Physiology, 2001). Já a termogênese independente de tremor é aquela que acontece no tecido adiposo marrom de mamíferos placentários. Este tecido, localizado próximo às escápulas, ao esterno e aos rins, é bastante vascularizado e apresenta alta densidade de mitocôndrias, sendo de especial importância para os animais de pequeno tamanho, recém-nascidos ou aclimatados ao frio (Mackowiak, 1998; Branco et al., 2005). Nas mitocôndrias das células em geral, a oxidação dos substratos resulta em um gradiente de concentração de prótons entre o espaço intermembrana e a matriz mitocondrial e estes prótons retornam para a matriz principalmente através da enzima ATP sintase, resultando na formação de ATP e dissipação de energia, como em todo processo bioquímico. No tecido adiposo marrom uma proteína desacopladora de prótons (UCP1) é encontrada na membrana interna das mitocôndrias e funciona como uma via para o fluxo de prótons independente da ATP sintase. Desse modo, grande parte da energia armazenada no gradiente é dissipada como calor ao passar pela UCP1 (já que não há produção de ATP), o que contribui para o aquecimento dos animais (Branco et al., 2005; Nelson, et al., 2004). Adicionalmente, já foi encontrado uma proteína homóloga à UCP1 no músculo esquelético de aves, avUCP, sugerindo que tal musculatura também pode ser capaz de produzir energia térmica independente de tremor, entretanto suas funções ainda não estão totalmente esclarecidas (Bicudo, et al., 2002; Nelson, et al., 2004; Branco et al., 2005).

A respeito dos mecanismos de perda de energia térmica, eles englobam basicamente a vasodilatação periférica e a sudorese ou ofego (perda evaporativa). Na vasodilatação ocorre exatamente o contrário do que acontece na vasoconstrição: o fluxo sanguíneo periférico é aumentado e, conseqüentemente, a temperatura da pele também, contribuindo assim para a transferência de calor do animal para o ambiente, sendo este

mecanismo de extrema importância em ratos, especialmente nos vasos da cauda (Little e Stoner, 1968). Quanto à sudorese e ao ofego, a perda de energia térmica se dá por meio da evaporação que consiste na passagem da água do estado líquido para o gasoso a partir da energia térmica fornecida pelo próprio organismo, favorecendo a redução do conteúdo energético do animal. A evaporação de qualquer líquido da superfície corporal ou das mucosas é o único meio de perder energia quando a T_a é maior que a T_c , sendo a sudorese de grande importância para humanos, equinos e bovinos e o ofego mais importante para cães, gatos, ovelhas e aves. Durante o ofego, a expiração acontece preferencialmente pela abertura oral ao invés das vias aéreas e, assim, colabora para que a energia térmica contida no ar expelido pelos pulmões seja dissipada mais eficientemente que durante uma respiração não ofegante. Além disso, a exposição da língua ao ar favorece a evaporação da água da saliva (Schmidt-Nielsen et al., 1970; Randall, 1997). No caso do rato, modelo experimental de parte do presente estudo, a perda evaporativa de energia térmica é realizada pela associação de um mecanismo autonômico, que é a produção de saliva, e um comportamental, que é o espalhamento dessa saliva sobre os pelos quando são expostos a ambientes quentes (Hainsworth e Stricker, 1969). A evaporação da saliva espalhada sobre a superfície corporal facilita a transferência de calor para o ambiente. Ainda, há animais que utilizam o mecanismo de contracorrente para manter resfriada, ao invés de aquecida, determinada região do corpo, como é o caso da gazela africana. Neste animal, o sangue arterial que ascende ao encéfalo transfere calor para o sangue venoso que retorna das veias nasais ao interior do organismo e, assim, o encéfalo é mantido mais resfriado do que o restante do corpo (Willmer et al., 2005).

Já os mecanismos comportamentais, como mencionado, são todos aqueles que contribuem para a conservação ou a dissipação da energia térmica de um organismo. Alguns exemplos são: adoção de posturas encolhidas ou estiradas, aproximação ou distanciamento entre membros de um grupo, procura por lugares mais ou menos ventilados, exposição ao sol ou à sombra, chafurdação (muito comum em suínos), dentre outros. Além de apresentarem custo energético mais reduzido que os autonômicos, os mecanismos comportamentais possibilitam ainda a manutenção da T_c sem exonerar as reservas corpóreas, tais como água e ácidos graxos, aumentando a chance de sobrevivência dos animais em ambientes hostis (Almeida et al., 2015). Dois comportamentos termorreguladores são de especial importância para o presente trabalho. Um é conhecido como “*shuttling*” que é o movimento de vai e vem entre áreas mais ou menos quentes e que possibilita a manutenção da T_c dentro de uma faixa estreita. Este comportamento é tipicamente observado em lagartos e de grande relevância para ectotermos em geral, já que um ambiente de temperatura ótima e constante é raramente

encontrado no campo. O outro mecanismo, o *gaping*, é também uma associação entre autonômico e comportamental e foi descrito como a abertura da cavidade bucal quando os animais são expostos a altas T_a s. Este comportamento é observado, dentre outros animais, em lagartos da espécie *Pogona vitticeps* e tem sido sugerido como mecanismo de perda evaporativa de energia térmica, pois a abertura da boca é gradual e proporcional ao aumento da T_a (Tattersall et al., 2006). O *gaping* difere do ofego principalmente por ter início em T_a s próximas às selecionadas pelos animais em campo, ao passo que o ofego só aparece em T_a s muito altas, próximas às letais (Heatwole et al., 1973), sendo o *gaping* então considerado um mecanismo que contribui pra regulação fina da T_c (Tattersall e Gerlach, 2005). Tanto o *shuttling* quanto o *gaping* serão novamente abordados quando o tema do terceiro capítulo for descrito.

Finalmente, é importante comentar que a via descrita por Nakamura e Morrison (2008, 2010; Fig. 3) menciona apenas a vasoconstrição e a produção de calor por tremor ou pelo tecido adiposo marrom como os mecanismos modulados pela MPA. Muito pouco atualmente é conhecido sobre as vias de ativação/inibição dos mecanismos comportamentais e, por isso, muitos estudos ainda são necessários nesta área. Até mesmo a participação da APO na gênese do comportamento termorregulador ainda é discutida: alguns estudos mostraram que a lesão da APO não interfere na termorregulação comportamental de mamíferos (Satinoff e Rutstein, 1970; Almeida et al., 2006), enquanto outros demonstram que a APO participa da ativação deste mecanismo (Refinetti e Carlisle, 1985, Konishi et al., 2007). Refinetti e Carlisle (1985) mostraram que a alteração da temperatura local do hipotálamo anterior, onde a APO é encontrada, por meio de termodos induziu respostas comportamentais de termorregulação em ratos, enquanto o trabalho de Konishi e colaboradores (2007) mostrou recentemente, na mesma espécie de animal, que lesões do MnPO inibiu o comportamento de escape de ambientes quentes (*heat escape*) induzido por injeções subcutâneas de salina hipertônica. Na tentativa de contribuir com mais evidências a este respeito, a participação da APO na termorregulação comportamental também foi um dos temas do presente trabalho, conforme descrito na próxima seção.

Regulação da T_c : investigando o papel do TRPV4 periférico e central

É indiscutível o progresso que foi alcançado nos últimos anos com a descrição das vias neuronais de integração e modulação dos efetores, propostas por Nakamura e Morrison (2008, 2010), entretanto pouco ainda é conhecido sobre o começo desta via, a termorrecepção periférica. Como já mencionado, os TRPs têm sido propostos como sendo os

detectores das alterações da Ta e os iniciadores da regulação da Tc e, de fato, alguns estudos, *in vitro* ou em animais geneticamente modificados, já mostraram que estes canais são sensíveis à temperatura e capazes de detectarem a Ta e/ou ativarem alguns efetores (Story et al., 2003; Lee et al., 2005; Moqrich, et al., 2005; Colburn et al., 2007), o que torna ainda mais promissor e motivador a continuação dos estudos com os termoTRPs. Entretanto, dos trabalhos citados até agora, a grande maioria foi feita com animais *knock out*, o que compromete a interpretação dos resultados já que outros sistemas/vias podem compensar a ausência do(s) receptor(es) e levar a uma resposta não específica. Graças ao desenvolvimento de ferramentas farmacológicas para estes canais, como agonistas e antagonistas, os trabalhos com animais não geneticamente modificados podem agora ser conduzidos. Recentemente, Almeida e colaboradores (2012), mostraram a participação dos TRPM8 periféricos na detecção de temperaturas frias não nocivas a partir do uso de antagonista específico para este receptor. O bloqueio do M8 periférico, além de causar uma redução na Tc dos animais expostos ao frio, impediu ou, ao menos, atenuou a ativação de todos os efetores estudados: busca por um ambiente mais quente, vasoconstrição da cauda e termogênese do tecido adiposo marrom, sugerindo a importância do TRPM8 na termodeteção.

Outro receptor que responde a estímulos não nocivos é o TRPV4, aparentemente sensível a temperaturas superiores a 25°C. Estes canais são amplamente expressos nos tecidos de mamíferos como: coração, rins, glândulas salivares, células endoteliais da aorta e, de especial interesse para nosso trabalho, em queratinócitos e na APO, especificamente no MnPO e na MPA (Güler et al., 2002; Watanabe, et al., 2002; Patapoutian, et al., 2003, Caterina, 2007).

Em relação ao seu papel na termorregulação, sabe-se que, além de camundongos geneticamente destituídos de canais TRPV4 selecionarem Tas mais altas do que os camundongos selvagens, eles também apresentam maior latência no teste de retirada da cauda quando esta é imersa em temperaturas moderadamente altas em comparação aos animais controles (Lee et al., 2005). Nenhum estudo ainda havia sido publicado sobre o papel do V4 na termorrecepção e no controle da Tc em animais não geneticamente modificados. Este constituiu o primeiro objetivo da presente tese (veja capítulo 1), que foi investigar o efeito da inibição dos TRPV4 sobre a Tc, os mecanismos autonômicos (termogênese e índice de perda de calor) e os mecanismos comportamentais (temperatura selecionada em gradiente térmico). Paralelamente ao nosso trabalho, o laboratório da professora Maria Camila Almeida mostrou que a aplicação tópica de agonista de V4 no dorso de ratos, a 26°C, causava uma redução na Tc que podia ser atenuada pelo tratamento prévio com o respectivo antagonista.

Além disso, o agonista de TRPV4 também induzia vasodilatação da cauda e indicava ativação de busca pelo frio quando os animais eram colocados em um “*shuttle box*”. Assim, a integração dos dados dos dois laboratórios resultou em uma publicação (Vizin, et al., 2015), que pode ser encontrada no “Apêndice A”.

Além dos resultados do primeiro capítulo, a localização dos TRPV4 em regiões hipotalâmicas envolvidas com a ativação de termofetores (Güler et al., 2002), como a MPA e o MnPO, sugeria que esses canais centrais poderiam também participar da ativação das vias efetoras (termolíticas) frente a estímulos térmicos. Nesse caso, a sinalização até os V4 da APO seria provável acontecer via algum mediador neuroquímico e não diretamente pela temperatura, já que a temperatura encefálica de endotermos praticamente não é alterada (exceto em torpor) ao longo de toda a vida do animal (revisão de Bicego et al., 2007). Verificar o papel dos TRPV4 hipotalâmicos na manutenção da Tc foi o segundo objetivo desta tese. Por meio da microinjeção na MPA de antagonista seletivo para V4, determinamos as alterações na Tc e, novamente, quais termofetores são modulados por este receptor: taxa metabólica, vasodilatação ou seleção de temperatura ambiente de preferência. O trabalho completo está descrito na forma de manuscrito no capítulo 2.

Regulação da Temperatura corporal (Tc): influências de outros sistemas

Diferentemente do que foi focado até agora, na última parte desta tese, o objetivo foi estudar como a regulação da Tc acontece quando o sistema encontra alguma limitação nos recursos disponíveis. No caso, usamos como modelo a limitação de água corpórea através do uso de injeções periféricas de salina hipertônica. Se levarmos em conta que, em altas Tas, os mecanismos de perda de energia térmica mais eficientes são os evaporativos (sudorese, ofegação, *gaping?*), fica evidente que, se o animal está em condição de desafio osmótico, a regulação da Tc pode ser comprometida.

Evidências sobre a interação entre estes dois sistemas, termorregulador e osmorregulador, já foram observadas tanto *in vitro* (Silva e Boulant, 1984) quanto *in vivo* (Schmidt-Nielsen et al., 1957; Parmenter e Heatwole, 1975; Kleinhaus et al., 1985; Preest e Pough, 1989). No entanto, não havia dados sobre a influência da hiperosmolaridade nos limiares de ativação/desativação de diferentes termofetores, como o *shuttling* e o *gaping*. Estes comportamentos são bem descritos em um lagarto da família Agamidae, *Pogona vitticeps*, encontrado nas regiões áridas da Austrália central e que, portanto, se caracterizou como uma espécie ideal para nosso estudo. O *shuttling* foi escolhido por ser um comportamento termorregulador frequentemente observado no campo. Além disso, o *shuttle*

box com temperaturas variáveis, aparato utilizado para estudar o *shuttling*, confere algumas vantagens quando comparado ao estudo da seleção de T_a de preferência em gradiente térmico (Cadena e Tattersall, 2009). Pode ser citada, por exemplo, a possibilidade de se determinar o limiar inferior e superior do *shuttling* e, como no presente trabalho, como estes limiares podem ser influenciados por outros sistemas. Em relação ao *gaping*, ele foi escolhido por ser um mecanismo exibido em T_a s levemente acima daquelas em que os animais são geralmente encontrados na natureza, ou seja, supostamente contribui para a regulação fina da T_c , ao contrário do ofego que é observado em T_a s próximas às letais e parece agir como um último recurso para a sobrevivência. Além disso, o *gaping* é estritamente dependente de água, enquanto o *shuttling* não, e seu estudo traria resultados interessantes sobre como o organismo lida com a manutenção da T_c quando dois sistemas (o de termo e o de osmorregulação) estão em conflito. Adicionalmente, a efetividade o *gaping* quanto à perda evaporativa de energia térmica também foi avaliada. Estes e todos os outros resultados deste estudo estão apresentados no capítulo 3 e a publicação encontra-se no “Apêndice B”.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIHARA, H.; OKADA, Y.; TAMAKI, N. The effects of cooling and rewarming on the neuronal activity of pyramidal neurons in guinea pig hippocampal slices. **Brain Res.**, v. 893, p. 36-45, 2001.
- ALMEIDA, M.C.; STEINER, A.A.; BRANCO, L.G.S.; ROMANOVSKY, A.A. Neural Substrate of Cold-Seeking Behavior in Endotoxin Shock. **Plos one**, 1, e1, 2006.
- ALMEIDA, M.C.; HEW-BUTLER, T.; SORIANO, R.N.; RAO, S.; WANG, W.; WANG, J.; TAMAYO, N.; OLIVEIRA, D.L.; NUCCI, T.B.; ARYAL, P.; GARAMI, A.; BAUTISTA, D.; GAVVA, N.R.; ROMANOVSKY, A.A. Pharmacological blockade of the cold receptor TRPM8 attenuates autonomic and behavioral cold defenses and decreases deep body temperature. **J Neurosci.**, v. 32, n. 6, p. 2086-99, 2012.
- ALMEIDA, M.C.; VIZIN, R.C.; CARRETTIERO, D.C. Current understanding on the neurophysiology of behavioral thermoregulation. **Temperature**. 2015. In press. 10.1080/23328940.2015.1095270
- BAUTISTA, D. M.; JORDT, S.E.; NIKAI, T.; TSURUDA, P.R.; READ, A.J.; POBLETE, J.; YAMOAHA, E.N.; BASBAUM, A.I.; JULIUS, D. TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. **Cell**, v. 124, p. 1269–1282, 2006.
- 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**, v. 448, p. 204–208, 2007.
- BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. The Somatic Sensory System. In: **Neuroscience: Exploring the Brain**. 3 ed., Philadelphia:Lippincott Williams & Wilkins, 2006, p. 389-422.
- BERK, M.L.; HEATH, J.E. Effects of preoptic, hypothalamic, and telencephalic lesions on thermoregulation in the lizard, *Dipsosaurus dorsalis*. **J. Therm. Biol.**, v. 1, p. 65–78, 1975.
- BÍCEGO, K. C.; BRANCO, L. G. S. Discrete electrolytic lesion of the preoptic area prevents LPS-induced behavioral fever in toads. **J. Exp. Biol.**, v. 205, p. 3513-3518, 2002.
- BICEGO, K.C.; BARROS, R.C.; BRANCO, L.G.; Physiology of temperature regulation: comparative aspects. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.**, v. 147, p. 616–639, 2007.
- BICUDO, J. E. P. W.; BIANCO, A. C.; VIANNA, C. R. Adaptive thermogenesis in hummingbirds. **J. Exp. Biol**, v. 205, p. 2267–2273, 2002.
- BOULANT, J.A., Hypothalamic neurons: mechanisms of sensitivity to temperature. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** v. 856, p. 108–115, 1998.
- BOULANT, J. A. Neuronal basis of Hammel’s model for set-point thermoregulation. **J Appl Physiol**, v.100, p. 1347–1354, 2006.

BRANCO, L.G.S.; STEINER, A.A.; BÍCEGO, K.C. Regulação Endócrina da Temperatura Corporal. In: ANTUNES-RODRIGUES, J.; MOREIRA, A. C.; ELIAS, L. L. K.; Castro, M. **Neuroendocrinologia Básica e Aplicada**. São Paulo: Guanabara Koogan, 2005. p.64-80.

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

CADENA, V.; TATTERSALL, G. J. The effect of thermal quality on the thermoregulatory behavior of the bearded dragon *Pogona vitticeps*: influences of methodological assessment. **Physiol. Biochem. Zool.** v. 82, p. 203-217, 2009.

CATERINA, M.J.; LEFFLER, A.; MALMBERG, A.B.; MARTIN, W.J.; TRAFTON, J.; PETERSEN-ZEITZ, K.R.; KOLTZENBURG, M.; BASBAUM, A.I.; JULIUS, D. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. **Science**, v. 288, p. 306–313, 2000.

CATERINA, M. Transient receptor potential ion channels as participants in thermosensation and thermoregulation. **Am. J. Physiol.: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 292, p. R64–R76, 2007.

CLAPHAM, D. E. TRP channels as cellular sensors. **Nature**, v. 426, p. 517-524, 2003.

COLBURN, R.W.; LUBIN, M.L.; STONE, D.J.Jr.; WANG, Y.; LAWRENCE, D.; D'ANDREA, M.R.; BRANDT, M.R.; LIU, Y.; FLORES, C.M.; QIN, N. Attenuated cold sensitivity in TRPM8 null mice. **Neuron**, v. 54, p. 379 –386, 2007.

CUI, N.; ZHANG, X.; TADEPALLI, J.S.; YU, L.; GAI, H.; PETIT, J.; PAMULAPATI, R.T.; JIN, X.; JIANG, C. Involvement of TRP channels in the CO₂ chemosensitivity of locus coeruleus neurons. **J Neurophysiol**, v. 105, p. 2791–2801, 2011.

DAVIS, J.B.; GRAY, J.; GUNTHORPE, M.J.; HATCHER, J.P.; DAVEY, P.T.; OVEREND, P.; HARRIES, M.H.; LATCHAM, J.; CLAPHAM, C.; ATKINSON, K.; UGHES, S.A.; RANCE, K.; GRAU, E.; HARPER, A.J.; PUGH, P.L.; ROGERS, D.C.; BINGHAM, S.; RANDALL, A.; SHEARDOWN, S.A. Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. **Nature**, v. 405, p. 183–187, 2000.

DHAKA, A.; MURRAY, A.N.; MATHUR, J.; EARLEY, T.J.; PETRUS, M.J.; PATAPOUTIAN, A. TRPM8 is required for cold sensation in mice. **Neuron**, v. 54, p. 371–378, 2007.

GAU, P.; POON, J.; UFRET-VINCENY, C.; SNELSON, CD.; GORDON, SE.; RAIBLE, DW.; DHAKA, A. The zebrafish ortholog of TRPV1 is required for heat-induced locomotion. **J Neurosci**, v. 33, p.5249-5260, 2013.

GLOSSARY OF TERMS FOR THERMAL PHYSIOLOGY. 3rded. **Jpn J Physiol.**, v.51, n.2, 2001.

GÜLER, A. D.; LEE, H.; IIDA, T.; SHIMIZU, I.; TOMINAGA, M.; CATERINA, M. Heat-evoked activation of the ion channel, TRPV4. **J. Neurosci.**, v. 22, n. 15, p. 6408-6414, 2002.

HAINSWORTH, F.R.; STRICKER, E. Evaporative cooling in the rat: effects of partial desalivation. **Am J Physiol.**, v. 217, n. 2, p. 494-497, 1969.

- HAMMEL H. T. Neurons and temperature regulation. In: YAMAMOTO, W. S.; BROBECK, J. R. **Physiological Controls and Regulations**. Philadelphia: Saunders, 1965. p. 71–97.
- HEATWOLE, H.; FIRTH, B. T.; WEBB, G. J.W. Panting thresholds of lizards-I. Some methodological and internal influences on the panting threshold of an Agamid, *Amphibolurus muricatus*. **Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.** v. 46, p. 799-826, 1973.
- HUANG, J.; ZHANG, X.; MCNAUGHTON, P. A. Modulation of temperature-sensitive TRP channels. **Semin Cell Dev Biol.**, v. 17, p. 638–645, 2006.
- HUANG, S.M.; LEE, H.; CHUNG, M.K.; PARK, U.; YU, Y.Y.; BRADSHAW, H.B.; COULOMBE, P.A.; WALKER, J.M.; CATERINA, M.J. Overexpressed transient receptor potential vanilloid 3 ion channels in skin keratinocytes modulate pain sensitivity via prostaglandin E2. **J Neurosci.**, v. 28, p. 3727–13737, 2008.
- KATSURA, H.; OBATA, K.; MIZUSHIMA, T.; YAMANAKA, H.; KOBAYASHI, K.; DAI, Y.; FUKUOKA, T.; TOKUNAGA, A.; SAKAGAMI, M.; NOGUCHI, K. Antisense knock down of TRPA1, but not TRPM8, alleviates cold hyperalgesia after spinal nerve ligation in rats. **Exp Neurol.**, v. 200, p. 112-23, 2006.
- KLEINHAUS, S.; PINSHOW, B.; BERNSTEIN, M. H.; DEGEN, A. A. Brain temperature in heat-stressed, water deprived desert phasianids: sand partridge (*Ammoperdix heyi*) and chukar (*Alectoris chukar sinaica*). **Physiol. Zool.** v. 58, p. 105-116, 1985.
- KONISHI, M.; KANOSUE, K.; KANO, M.; KOBAYASHI, A.; NAGASHIMA, K. The median preoptic nucleus is involved in the facilitation of heat-escape/cold-seeking behavior during systemic salt loading in rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, v. 292, p. R150-R159, 2007.
- LEE, H.; IIDA, T.; MIZUNO, A.; SUZUKI, M.; CATERINA, M.J. Altered thermal selection behavior in mice lacking transient receptor potential vanilloid 4. **J. Neurosci.**, v.25, p. 1304–1310, 2005.
- LEPKOVSKY, S.; SNAPIN, N.; FUTURA, F. Temperature regulation and appetitive behavior in chickens with hypothalamic lesions. **Physiol. Behav.**, v. 3, p. 911–915, 1968.
- LILLYWHITE, H.B.; Temperature selection by the bullfrog, *Rana catesbeiana*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 40, p. 213–227, 1971.
- LITTLE, R. A.; STONER, H.B. The measurement of heat loss from the rat's tail. **Q J Exp Physiol Cogn Med Sci.**, v.53, p. 76-83, 1968.
- MACKOWIAK, P. A. Concepts of fever. **Arch Intern Med.**, v.158, n.17, p. 1870-1881, 1998.
- 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. **Pflugers Arch**, v. 458, p. 1093–1102, 2009.

MORIYAMA, T.; HIGASHI, T.; TOGASHI, K.; IIDA, T., SEGI, E., SUGIMOTO, Y.; TOMINAGA, T.; NARUMIYA, S.; TOMINAGA, M. Sensitization of TRPV1 by EP1 and IP reveals peripheral nociceptive mechanism of prostaglandins. **Mol Pain**. v. 17, p. 1-3, 2005.

MOQRICH, A.; HWANG, S.W.; EARLEY, T.J.; PETRUS, M.J.; MURRAY, A.N.; SPENCER, K.S.; ANDAHAZY, M.; STORY, G.M.; PATAPOUTIAN, A. Impaired thermosensation in mice lacking TRPV3, a heat and camphor sensor in the skin. **Science**, v. 307, p. 1468–1472, 2005.

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

NAKAMURA, K. Central circuitries for body temperature regulation and fever. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. v.301. p. R1207–R1228, 2011.

NAKAMURA, K.; MORRISON, S. F. Preoptic mechanism for cold-defensive responses to skin cooling. **J Physiol**. v. 586 p. 2611–2620, 2008.

NAKAMURA, K.; MORRISON, S.F. A thermosensory pathway mediating heat-defense responses. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 107, p. 8848-8853, 2010

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

NELSON, D.O.; PROSSER, C.D. Effect of preoptic lesions on behavioral thermoregulation of green sunfish, *Lepomis cyanellus*, and of goldfish, *Carassius auratus*. **J. Comp. Physiol.**, v. 129, p. 193–197, 1979.

NELSON, D.L.; COX, M. M.; **Principles of Biochemistry**. 4^a ed. New York: W. H. Freeman Company, 2004. 1100p.

NISEMBAUM, G.L.; BESSEAU, L.; PAULIN, C.H.; CHARPANTIER, A.; MARTIN, P.; MAGNANOU, E.; FUENTÈS, M.; JESUS DELGADO, M.; FALCÓN, J. In the heat of the night: Thermo TRPV channels in the salmonid pineal photoreceptors and modulation of melatonin secretion. **Endocrinology**. 2015 in press (doi: 10.1210/en.2015-1684).

OBATA, K; KATSURA, H.; MIZUSHIMA, T.; YAMANAKA, H.; KOBAYASHI, K.; DAI, Y.; FUKUOKA, T.; TOKUNAGA, A.; TOMINAGA, M.; NOGUCHI, K. TRPA1 induced in sensory neurons contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve injury. **J Clin Invest**, v. 115, p. 2393–2401, 2005.

ODUM, E. P. *Ecologia*. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara S.A., 1983. 434 p.

PARMENTER, C. J. HEATWOLE, H. Panting thresholds of lizards. IV. The effect of dehydration on the panting threshold of *Amphibolurus barbatus* and *Amphibolurus muricatus*. **J. Exp. Zool**. v.191, p. 327-332, 1975.

PATAPOUTIAN, A.; PEIER, A.M.; STORY, G.M.; VISWANATH, V. ThermoTRP channels and beyond: mechanisms of temperature sensation. **Nat Rev Neurosci.**, v. 4, p. 529-539, 2003.

- PEIER, A.M.; REEVE, A.J.; ANDERSSON, D.A.; MOQRICH, A.; EARLEY, T.J.; HERGARDEN, A.C.; STORY, G.M.; COLLEY, S. HOGENESCH, J.B.; MCINTYRE, P.; BEVAN, S.; PATAPOUTIAN, A. A heat-sensitive TRP channel expressed in keratinocytes. **Science**, v. 296, p. 2046–2049, 2002.
- PREEST, M. R.; POUGH, F. H. Interaction of temperature and hydration on locomotion of toads. **Funct. Ecol.**, v. 3, p. 693-699, 1989.
- RANDALL, D.; BURGGREN, W; FRENCH, K. Using energy: meeting environmental challenges. In: _____. **Eckert Animal Physiology: Mechanisms and Adaptations**. 4.ed. New York:Freeman Company, 1997. p. 665–723.
- REFINETTI, R.; CARLISLE, H. J. Effects of anterior and posterior hypothalamic temperature changes on thermoregulation in the rat. **Physiol Behav.**, v. 36, n. 6, p. 1099-1103, 1986.
- ROMANOVSKY, A.A. Thermoregulation: some concepts have changed. Functional architecture of the thermoregulatory system. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, v. 292, p.R37–R46, 2007.
- SATINOFF, E.; RUTSTEIN, J. Behavioral thermoregulation in rats with anterior hypothalamic lesions. **J Comp Physiol Psychol.**, v.71, p. 77-82, 1970.
- SEEBACHER, F.; MURRAY, S.A. Transient receptor potential ion channels control thermoregulatory behaviour in reptiles. **PLoS One**. 2(3):e281, 2007.
- SCHMIDT-NIELSEN, K.; SCHMIDT-NIELSEN, B.; JARNUM, S.A.; HOUP, T. R. Body temperature of the camel and its relation to water economy. **Am. J. Physiol.** v. 188, p. 103-112, 1957.
- SCHMIDT-NIELSEN, K.; BRETZ, W.L.; TAYLOR, C.R. Panting in dogs: unidirectional air flow over evaporative surfaces. **Science**, v.169, n. 950, p.1102-1104, 1970.
- SILVA, N.L.; BOULANT, J.A. Effects of osmotic pressure, glucose, and temperature on neurons in preoptic tissue slices. **Am. J. Physiol.** v. 247, p. R335-R345, 1984.
- 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**, v. 112. p. 819-829. 2003.
- TALAVERA, K.; NILIUS, B.; VOETS, T. Neuronal TRP channels: thermometers, pathfinders and life-savers. **Trends in Neurosci.**, v.31, n.6, 2008.
- TATTERSALL, G. J.; GERLACH, R.M. Hypoxia progressively lowers thermal *gaping* thresholds in bearded dragons, *Pogona vitticeps*. **J. Exp. Biol.** v. 208, p. 3321-3330, 2005.
- TATTERSALL, G.J., CADENA, V.; SKINNER, M. C. Respiratory cooling and thermoregulatory coupling in reptiles. **Respir. Physiol. Neurobiol.** v. 154, p. 302-318, 2006.
- TREVISANI, M.; SMART, D.; GUNTHORPE, M.J.; TOGNETTO, M.; BARBIERI, M.; CAMPI, B.; AMADESI, S.; GRAY, J.; JERMAN, J.C.; BROUGH, S.J.; OWEN, D.; SMITH,

G.D.; RANDALL, A.D.; HARRISON, S.; BIANCHI, A.; DAVIS, J.B.; GEPPETTI, P. Ethanol elicits and potentiates nociceptor responses via the vanilloid receptor-1. **Nat Neurosci.** v. 5, p. 546-551, 2002.

VAY, L.; GU, C.; MCNAUGHTON, P.A. The thermo-TRP ion channel family: properties and therapeutic implications. **Br J Pharmacol.**, v. 165, p. 787–801, 2012.

VIZIN, R.C.L.; SCARPELLINI, C.S.; ISHIKAWA, D.T.; CORREA, G.M.; SOUZA, C.O.; GARGAGLIONI, L.H.; CARRETTIERO, D.C.; BICEGO, K.C.; ALMEIDA, M.C. TRPV4 activates autonomic and behavioural warmth-defence responses in Wistar rats. **Acta Physiol.**, v. 214, p. 275–289, 2015.

VOETS, T.; DROOGMANS, G.; WISSENBACH, U.; JANSSENS, A.; FLOCKERZI, V.; NILIUS, B. The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels. **Nature.** v. 430, p. 748–754, 2004.

VOETS, T.; NILIUS, B. TRPs Make Sense. **J. Membrane. Biol.**, v. 192, p. 1-8, 2003.

WASSERSTROM, J.A.; VITES, A.M. Activation of contraction in cat ventricular myocytes: effects of low Cd(2+) concentration and temperature. **Am J Physiol.**, v. 277, n. 2, p. H488-H498, 1999.

WATANABE, H.; VRIENS, J.; SUH, S.H.; BENHAM, C.D.; DROOGMANS, G.; NILIUS, B. Heat-evoked activation of TRPV4 channels in a HEK293 cell expression system and in native mouse aorta endothelial cells. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 49, p. 47044–47051, 2002.

WECHSELBERGER, M.; WRIGHT, C.L.; BISHOP, G.A.; BOULANT, J.A. Ionic channels and conductance-based models for hypothalamic neuronal thermosensitivity. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, v. 291, p. R518–R529, 2006.

WENISCH, C.; NARZT, E.; SESSLER, D.I.; PARSCHALK, B.; LENHARDT, R.; KURZ, A.; GRANINGER, W. Mild intraoperative hypothermia reduces production of reactive oxygen intermediates by polymorphonuclear leukocytes. **Anesth Analg.**, v. 4, p. 810-816, 1996.

WILLMER, P; STONE, G.; JOHNSTON I. **Environmental Physiology of Animals.** 2^a ed. Malden: Blackwell Publishing, 2005. 779 p.

Capítulo I

TRPV4 periférico ativa respostas autonômicas e comportamentais de defesa ao calor em ratos Wistar

RESUMO

Neste estudo, foi investigado o envolvimento dos canais sensíveis ao calor – TRPV4 (*in vitro*, sensíveis a uma faixa de temperatura aproximadamente entre 24 e 34°C) – nos mecanismos termorreguladores de ratos. Para tal, os animais foram tratados com antagonista químico seletivo (HC-067047) do canal TRPV4 e a temperatura corporal, o metabolismo, o índice de perda de calor e a temperatura ambiente de preferência foram medidos. O mecanismo comportamental também foi estudado após a aplicação do agonista tóxico RN1747. Nossos dados revelam que o bloqueio intravenoso deste canal com HC-067047 causou um aumento na temperatura corporal nas temperaturas ambientes de 26 e 30°C, mas não a 22 nem a 32°C. A 26°C, a hipertermia induzida pelo tratamento com HC-067047 foi acompanhada por um aumento no consumo de oxigênio (um índice da termogênese). Além disso, ratos quimicamente estimulados com o agonista RN1747 escolheram temperaturas ambientes mais frias e o comportamento de busca pelo frio após estimulação térmica (28-31°C) foi inibido pelo antagonista do canal. Os resultados sugerem, pela primeira vez, que o canal TRPV4 está envolvido no recrutamento de respostas autonômicas e comportamentais de defesa ao calor.

Palavras-chave: tônus vasomotor da cauda, termogênese, gradiente térmico, termorregulação, manipulação de TRPV4, sensor de calor.

ABSTRACT

In this study, we aimed at investigating the involvement of the warmth-sensitive channel – TRPV4 (*in vitro* sensitive to temperatures in the range of approx. 24–34°C) – on the thermoregulatory mechanisms in rats. We treated rats with a chemical selective antagonist (HC-067047) of the TRPV4 channel and measured core body temperature, metabolism, heat loss index and preferred ambient temperature. The behavioral mechanism was also assessed after treatment with topical agonist (RN-1747). Our data revealed that intravenous blockade of this channel with HC-067047 caused an increase in core body temperature at ambient temperature of 26 and 30°C, but not at 22 and 32°C. At 26°C, HC-067047-induced hyperthermia was accompanied by increase in oxygen consumption (an index of thermogenesis). Furthermore, rats chemically stimulated with TRPV4 agonist choose colder ambient temperatures and the cold-seeking behaviour after thermal stimulation (28–31°C) was inhibited by TRPV4 antagonist. Our results suggest, for the first time, that TRPV4 channel is involved in the recruitment of behavioural and autonomic warmth-defence responses to regulate core body temperature.

Keywords: tail vasomotor tone, thermogenesis, thermopreferendum thermoregulation, TRPV4 manipulation, warmth sensor.

LISTA DE ABREVIACOES

$\dot{V}O_2$: consumo de oxigênio;

F_eCO_2 : Frao de entrada de gs carbônico (do *baseline*);

F_eO_2 : Frao de entrada de oxigênio (do *baseline*);

FR_e : Fluxo de entrada do ar;

F_sCO_2 : Fração de saída de gás carbônico;

F_sO_2 : Fração de saída de oxigênio;

i.v.: administração intravenosa.

IPC: ndice de perda de calor;

PVA: pressão de vapor de água (kPa);

T_a : temperatura ambiente;

T_c : temperatura corporal;

T_p : temperatura da pele da cauda.

1. INTRODUÇÃO

A temperatura corporal (Tc) é um dos sinais vitais e a habilidade em regular esta variável é de fundamental importância, pois todas as reações bioquímicas e funções fisiológicas são amplamente dependentes da temperatura (Wenisch et al., 1996; Wasserstrom e Vites, 1999; Aihara et al., 2001). Em animais endotérmicos, tanto os mecanismos autonômicos quanto os comportamentais são recrutados para regular a Tc (Bícego et al., 2007). Neste sentido, redes neuronais independentes, controlada pela Tc e/ou temperatura da pele, que são detectadas por termorreceptores, são usadas por cada termoeffetor (tremor, termogênese sem tremor, controle vasomotor cutâneo; Romanovsky 2007; Morrison e Nakamura 2011). Adicionalmente, a termorregulação comportamental é essencial para a sobrevivência; um exemplo é a procura por uma temperatura ambiente de preferência que é considerada um dos mecanismos mais eficiente, menos energeticamente custoso e mais amplamente difundido em mamíferos (Gordon, 1990; Bicego et al., 2007).

A recente descoberta e os avanços nos estudos dos canais TRPs (*transient receptor potencial*) sensíveis à temperatura contribuíram para a compreensão dos mecanismos de transdução dos sinais térmicos. Neste estudo, nós focamos no TRPV4 que é ativado *in vitro* a temperaturas na faixa de 24-34°C (Güler et al., 2002; Kauer e Gibson, 2009), e também por outros fatores como hiposmolaridade (Liedtke et al., 2000; Strotmann et al., 2000), agonistas químicos (Vincent et al., 2009; Vincent e Duncton 2011) e metabólitos endógenos do ácido araquidônico (Voets et al., 2005). A proteína do TRPV4 está encontrada em alguns lugares compatíveis com sua função termorreguladora, incluindo neurônios sensoriais primários, queratinócitos, células endoteliais, glândulas sudoríparas, neurônios simpáticos e área pré-óptica do hipotálamo (Liedtke et al., 2000; Delany et al., 2001; Güler et al., 2002; Watanabe et al., 2002; Alessandri-Haber et al., 2003). De fato, o TRPV4 tem sido proposto atuar como termorreceptor, pois a remoção genética deste receptor levou camundongos a selecionarem temperaturas mais quentes que os animais controles quando expostos a um gradiente térmico ou quando eles tinham que escolher entre duas temperaturas ambientes (Tas; Lee et al., 2005); no entanto, ainda não havia sido avaliado se este canal é ativado em condições quentes não nocivas *in vivo* em um animal não geneticamente modificado e se ele recruta mecanismos termorreguladores autonômicos e/ou comportamentais para a manutenção da Tc. Então, este estudo investigou se os canais TRPV4 estão envolvidos na termorregulação autonômica e comportamental *in vivo* usando uma

abordagem farmacológica e, para tal, nós avaliamos os efeitos do antagonista e agonista seletivo para o canal sobre a Tc, o índice de perda de calor (IPC), o consumo de oxigênio e a Ta selecionada.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados neste estudo ratos da linhagem Wistar (massa corporal de 290-320g) provenientes da UNESP de Botucatu – SP. Os animais receberam água e ração *ad libitum*, foram condicionados à Ta de $23 \pm 2^\circ\text{C}$ e submetidos a um ciclo claro:escuro de 12:12h. Os experimentos foram realizados entre 8:00 e 17:00h em grupos separados de animais e os protocolos experimentais foram conduzidos de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e tiveram aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal (Protocolo nº 26430/11, 019414/14).

Fármacos

HC-067047 (2-Metil-1- [3- (4-morfolinil) propil] -5-fenil-N- [3- (trifluorometil) fenil] -1H-pirrol-3-carboxamida) é um antagonista seletivo para TRPV4 recentemente descrito (Everaerts et al. 2010a) e adquirido da Tocris Bioscience (Bristol, UK). O HC-067047 foi alíquotado e estocado a -20°C nas concentrações de 1000 ou 5000 $\mu\text{g/mL}$ em 100% de etanol e, no dia do experimento, a alíquota foi diluída em salina estéril de modo a obtermos uma solução a 100 ou 500 $\mu\text{g/mL}$ para administração intravenosa (i.v.; doses: 100 ou 500 $\mu\text{g/kg}$; 1 mL/kg).

RN-1747 ([1-(4-Cloro-2-nitrofenil)sulfonil-4-benzilpiperazina]) é um agonista seletivo para o canal TRPV4 (Vincent et al., 2009) e também comprado da Tocris Bioscience (Bristol, UK). A droga foi dissolvida em 100% de propilenoglicol e a dose utilizada para aplicação tópica (3000 $\mu\text{g/kg}$; foi aplicado 1000 $\mu\text{g/mL/animal}$) foi baseada em resultados prévios do laboratório colaborador.

Procedimentos cirúrgicos

Os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de 100mg/kg de cetamina e 10mg/kg de xilazina e profilaticamente tratados com antibiótico (enrofloxacina 5%, subcutâneo, 0.5mg/kg, Schering-Plough) e analgésico e anti-inflamatório (flunixinina meglumina, intramuscular, 2.5mg/kg, Schering-Plough). A área corporal destinada às cirurgias foram tricotomizadas e limpas com solução de iodo 2% e, em seguida, os animais foram colocados em decúbito dorsal em uma mesa cirúrgica para implantação de uma cânula

intravenosa (jugular). Uma pequena incisão longitudinal foi feita na superfície ventral do pescoço, esquerda à traqueia. A veia jugular esquerda foi exposta, separada dos tecidos conectivos adjacentes e amarrada. Um cateter de silicone (diâmetro interno: 0.5mm; diâmetro externo: 0.9mm) preenchido com salina heparinizada (10U.I/mL) foi inserido na veia cava superior através da veia jugular e ali fixado. A extremidade livre do cateter foi passada sob a pele e exteriorizada pela nuca. O corte foi suturado e o cateter foi lavado com salina heparinizada no dia seguinte à cirurgia e a cada dois dias até o dia do experimento.

Em seguida, os animais foram submetidos a uma laparotomia paramediana para inserção de um sensor armazenador de temperatura (SubCue Dataloggers, Calgary, Canadá) e, em seguida à implantação, os músculos abdominais e a pele foram suturados em camadas. Os animais foram submetidos a um dos protocolos experimentais 3-5 dias depois das cirurgias (ver item “Protocolos experimentais” abaixo).

Medidas de Consumo de Oxigênio

A taxa metabólica foi inferida por meio da medida de consumo de oxigênio em sistema de respirometria aberta. O animal foi colocado em um respirômetro (3L) dentro de uma câmara de temperatura controlada (Fanem, São Paulo, SP, Brasil) que manteve a T_a dentro do respirômetro a 22, 26, 30 ou 32°C de acordo com cada protocolo. Um fluxo contínuo de ar foi mantido na câmara experimental (*pull mode*) a uma taxa de 2000mL/min, mas apenas uma subamostra (180mL/min) deste ar foi enviada aos analisadores de O₂, CO₂ e H₂O (SS4; Sable Systems, NV, USA). A pressão de vapor de água (PVA, kPa) foi a primeira variável analisada (RH300; Sable Systems) e, posteriormente, foi utilizada (juntamente com a pressão barométrica) para corrigir a porcentagem de O₂, CO₂ e o fluxo de ar antes do cálculo do $\dot{V}O_2$. Tal correção se fez necessária porque o ar não foi seco nem antes de entrar no respirômetro nem antes de passar pelos analisadores (Lighton, 2008). Em seguida, a porcentagem de CO₂ (CA-10, Sable Systems) foi analisada e, após, a porcentagem de O₂ e a pressão barométrica foram registradas (PA-10; Sable Systems). Cada 20 minutos de registro foram compostos por 3 minutos de *baseline* (amostra do ar que entrava no respirômetro), 14 minutos do ar que saía do respirômetro e mais 3 minutos de *baseline*. Amostras do *baseline* foram registradas para monitorar a constância da água e da porcentagem de O₂ e CO₂ no ar oferecido ao animal ao longo do experimento e para que o FiO₂, FiCO₂ e FiH₂O fossem calculados. Um distribuidor múltiplo de gases (RM8 Intelligent Multiplexer; Sable Systems) foi utilizado para controlar qual amostra de gás (do respirômetro ou do *baseline*) seria enviada

aos analisadores. Os analisadores foram calibrados semanalmente ou sempre que necessário. O analisador de O₂ foi calibrado usando nitrogênio como “zero” e ar seco (20.95%) como “span”; o analisador de CO₂ foi também calibrado com nitrogênio puro como “zero” e uma mistura de 1% de CO₂ como “span”. Os dados foram coletados a cada segundo por um sistema de aquisição apropriado (EXPEDATA v. 1.4.5; Sable Systems) e o $\dot{V}O_2$ foi determinado usando a seguinte fórmula (Lighton, 2008):

$$\dot{V}O_2 = \frac{FR_e[(F_eO_2 - F_sO_2) - F_eO_2(F_sCO_2 - F_eCO_2)]}{1 - F_eO_2}$$

Onde:

FR_e: Fluxo de entrada do ar;

F_eO₂: Fração de entrada de oxigênio (do *baseline*);

F_sO₂: Fração de saída de oxigênio;

F_eCO₂: Fração de entrada de gás carbônico (do *baseline*);

F_sCO₂: Fração de saída de gás carbônico.

Protocolos experimentais

Os experimentos foram realizados com animais não anestesiados que passaram por um dos protocolos abaixo.

1. Efeito do bloqueio químico do TRPV4 na Tc e nos termofetores autonômicos, termogênese e tônus vasomotor da cauda:

Os animais foram expostos a 31°C por 40 minutos antes da injeção i.v. de HC-067047 (500 µg/kg; 1 mL/kg) ou veículo (salina: etanol, 90%: 10%; 1 mL/kg) de forma a aumentar o fluxo sanguíneo para a pele e garantir que a droga alcançaria os receptores TRPV4 na pele (Almeida et al., 2012). Depois da injeção, os animais foram mantidos a 31°C por mais 15 minutos antes de serem colocados no respirômetro. A Ta no respirômetro foi fixada em 22, 26, 30 ou 32°C, como descrito anteriormente (veja “medida de consumo de oxigênio”). Uma vez colocados no respirômetro, a taxa metabólica e as imagens infravermelho (Flir SC660, Portland, OR, USA) foram registrados por 180 minutos. A Tc foi medida durante 60 minutos antes e 180 minutos após a injeção da droga. A temperatura da cauda foi qualitativamente analisada a partir das imagens infravermelho como um indicador do tônus vasomotor da cauda dos ratos e, então o IPC foi calculado (as imagens foram tiradas a cada 2 minutos; veja “Processamento e análise dos dados”). A dose de HC-067047 foi baseada em experimentos

pilotos (dados não mostrados).

2. Efeito da manipulação do TRPV4 na termorregulação comportamental – gradiente térmico:

Para avaliar a temperatura selecionada pelos animais após os tratamentos, foi utilizado um aparato com dois compartimentos completamente separados por uma parede (cada compartimento consistia de 195 cm de comprimento, 15 cm de largura e 20 cm de altura, Bonther, Ribeirão Preto, Brasil). As paredes do aparato e o assoalho de grade foram feitos de aço inoxidável e o teto feito de uma tampa de acrílico transparente que ajudava a manter a T_a dentro do gradiente. As extremidades foram aquecidas e resfriadas, respectivamente, por uma resistência elétrica (Novus, RS, Brasil) e por um banho de circulação externa com água resfriada e etileno-glicol (Polyscience, Il, EUA). Desse modo, foi gerado um gradiente linear de T_a entre 15 e 35°C (Almeida, et al., 2006a) monitorado por oito termopares distribuídos uniformemente sob o assoalho de grade. Para cada experimento (e para cada compartimento do gradiente) foi construída uma regressão linear entre a temperatura do ar vs distância dos termopares em relação à resistência elétrica para confirmação da linearidade do gradiente térmico formado. Apenas R^2 iguais ou maiores que 0.93 foram aceitos. Uma webcam foi posicionada no topo do gradiente e programada para tirar fotos a cada 4 minutos ao longo do experimento. Baseado nas posições dos animais obtidas pelas fotos e na regressão linear, a temperatura de preferência foi calculada.

Dois animais de cada vez (um em cada compartimento) foram aclimatados por aproximadamente 18 horas no gradiente térmico antes dos tratamentos. Na manhã seguinte ao intervalo de aclimação, os ratos foram colocados individualmente em câmaras climáticas por 40 minutos a 31°C para receberem os tratamentos. Um dos seguintes protocolos foram feitos: no primeiro, depois da injeção i.v. de veículo (salina: etanol; 90%:10%; 1 mL/kg) ou HC-067047 (100 µg/kg; 1 mL/kg), os animais foram termicamente estimulados (Almeida et al., 2006a,b) por meio de confinamento em uma porção (25cm) do gradiente onde a T_a estava entre 28-31°C por 3 horas. No final deste intervalo, as barreiras que confinavam os animais foram retiradas e eles puderam livremente se mover no seu respectivo compartimento. No outro protocolo, os animais foram tratados com veículo (propilenoglicol; 1 mL) ou RN-1747 (1000 µg/mL; 1 mL administrado topicamente no dorso do rato) e colocados novamente no gradiente para livre seleção da temperatura de preferência.

Processamento e análise dos dados

Os dados são mostrados como média \pm EPM. O IPC foi calculado pela seguinte equação:

$$\text{IPC} = T_p - T_a / T_c - T_a$$

Onde:

T_p = temperatura da pele da cauda do rato;

T_a = temperatura ambiente no mesmo momento em que a T_p foi medida;

T_c = temperatura corporal no mesmo momento em que a T_p foi medida.

Este índice tem sido usado para avaliar a resposta vasomotora termorreguladora da cauda de ratos e seu valor varia de 0 a 1, sendo que zero indica vasoconstrição máxima e 1 vasodilatação máxima (Romanovsky et al., 1998, 2002). A T_c ao longo dos experimentos é expressa como variação da T_c basal que, por sua vez, é a média dos últimos 6 registros de T_c antes de todos os tratamentos (meia hora; os registros eram feitos a cada 5 minutos).

Os resultados obtidos foram analisados por ANOVA de duas vias (two way ANOVA de medidas repetidas para testar o efeito do antagonista na T_c e na T_a de preferência bem como o efeito do agonista na T_a de preferência; ou simplesmente two way ANOVA para testar o efeito do antagonista no pico do delta da T_c , no $\dot{V}O_2$ e no IPC) seguido por teste post hoc Holm-Šidák. A variância e a normalidade dos dados foram testadas e os dados foram transformados para rank ou log quando não atendiam aos requisitos da análise paramétrica. Foram consideradas diferenças significativas valores de $P < 0,05$.

3. RESULTADOS

1. *Efeito do bloqueio químico do TRPV4 na Tc e nos termofetores autonômicos, termogênese e tônus vasomotor da cauda:*

Neste protocolo, foi estudado o efeito da administração i.v. do antagonista seletivo de TRPV4, HC-067047, na Tc de ratos expostos a 22, 26, 30 e 32°C de Ta (Fig. 1a-d). A 22 e 32°C, os animais tratados com HC-067047 não apresentaram diferença na Tc comparada com os controles (efeito da interação entre tempo vs tratamento: $F_{1,42} = 0.729$; $P = 0.897$ e $F_{1,42} = 0.392$; $P = 1.000$, respectivamente). Em Tas intermediárias (26 e 30°C), a Tc dos ratos tratados com antagonista foi significativamente maior que a dos animais injetados com veículo (efeito da interação entre tempo vs tratamento: $F_{1,42} = 3.338$; $P < 0.001$ e $F_{1,42} = 2.724$; $P < 0.001$, respectivamente). A tabela 1 mostra o pico que a Tc (maior aumento no delta da Tc) alcançou depois da injeção de veículo ou de HC-067047. A diferença intertratamento (HC-067047 menos veículo) foi significante apenas a Ta de 26°C, indicando que a esta Ta nós tivemos o efeito mais evidente do antagonista.

Devido ao efeito mais forte do bloqueio do TRPV4 na Tc ter sido observado a 26°C, nós selecionamos esta Ta para estudar também os efeitos do antagonista nos termofetores autonômicos. A figura 2a mostra o efeito do bloqueio dos canais TRPV4 no consumo de oxigênio. Estes dados foram usados para criar o gráfico de $\dot{V}O_2$ vs Tc mostrado na figura 2b. Nesta última plotagem, foi observado que os ratos tratados com veículo ocuparam uma pequena área do gráfico ao longo do experimento (ou seja, a Tc e o $\dot{V}O_2$ permaneceram quase constantes durante todo o tempo), ao passo que os animais tratados com antagonista partiram de um ponto muito próximo ao controle, mas se direcionaram pra uma área diferente durante o curso do experimento (efeito da interação entre tratamento vs Tc: $F_{1,3} = 2.988$; $P = 0.037$).

O efeito do bloqueio de TRPV4 no IPC não foi estatisticamente diferente do grupo controle (efeito da interação entre tratamento vs Tc: $F_{1,3} = 2.296$; $P = 0.081$), embora o IPC tenha sido levemente menor nos ratos tratados com antagonista que nos animais tratados com veículo, indicando que estes animais desenvolveram vasoconstrição da cauda (veja Fig. 3a e 3b). Nas figuras 3a e 3b, fica evidente que a temperatura da cauda foi maior nos animais controle que nos tratados com antagonista.

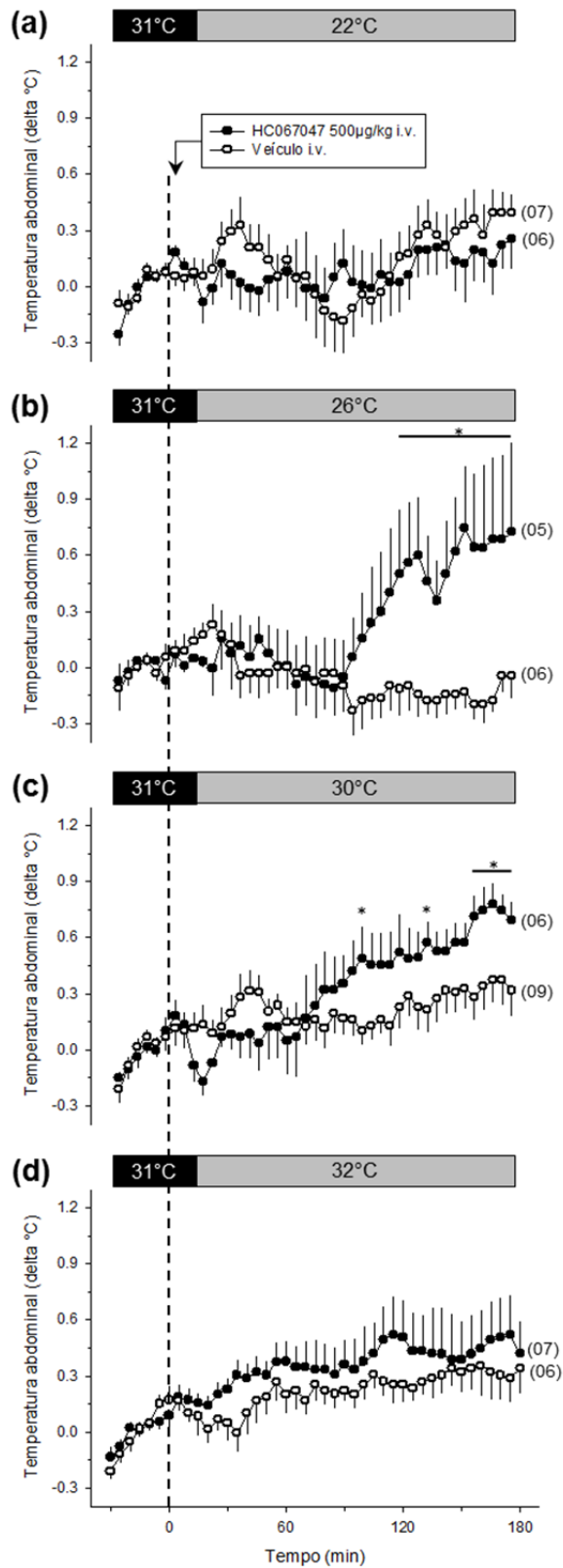


Fig. 1. Efeito da administração i.v. de antagonista de TRPV4 (HC-067047) na Tc a diferentes Tas. Os animais foram expostos às Tas de 22° (a), 26° (b), 30° (c) e 32°C (d). Tc foi significativamente maior nos animais tratados com HC-067047 comparados com os controles quando expostos a 26 e 30°C. Tc basal: (a) $37.3 \pm 0.1^\circ\text{C}$ (veículo) e $37.4 \pm 0.1^\circ\text{C}$ (HC-067047); (b) $37.4 \pm 0.2^\circ\text{C}$ (veículo) e $37.3 \pm 0.2^\circ\text{C}$ (HC-067047); (c) $37.1 \pm 0.1^\circ\text{C}$ (veículo) e $37.5 \pm 0.1^\circ\text{C}$ (HC-067047); (d) $37.3 \pm 0.1^\circ\text{C}$ (veículo) e $37.4 \pm 0.1^\circ\text{C}$ (HC-067047). A seta indica o momento da injeção. Números entre parênteses representam o N experimental. * = pontos onde o efeito da interação foi significativo. Dados são expressos como média \pm EMP.

Tabela 1. Pico do delta da temperatura corporal (Tc) em diferentes temperaturas ambientes (Ta)

Ta (°C)	Tc veículo (delta °C) Pico ± EPM	Tc HC-067047 (delta °C) Pico ± EPM	Diferença Pico; valor de p
22	0.7 ± 0.2	0.6 ± 0.1	-0.1; p= 0.792
26	0.4 ± 0.2	1.1 ± 0.2	0.7; p= 0.009
30	0.7 ± 0.1	0.9 ± 0.2	0.2; p= 0.369
32	0.6 ± 0.2	0.9 ± 0.2	0.3; p= 0.184

Diferença Pico: diferença entre picos (HC-067047 – veículo).

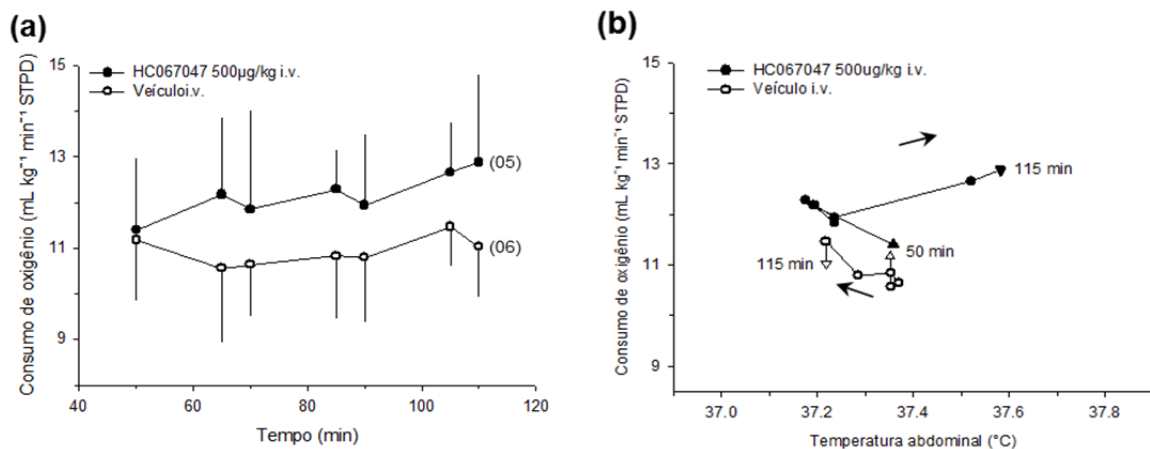


Fig. 2. Efeito da administração i.v. de antagonista de TRPV4, HC-067047, no $\dot{V}O_2$. Painel (a) mostra o $\dot{V}O_2$ ao longo do tempo do experimento e no painel (b) o $\dot{V}O_2$ é plotado *versus* a Tc entre 50 e 110 minutos depois da injeção. A hipertermia induzida por HC-067047 foi acompanhada por aumento no consumo de oxigênio, o que não aconteceu no grupo controle. A direção do tempo é indicada pela direção das setas. Os tempos iniciais e finais são indicados por triângulos regulares ou invertidos, respectivamente. Números em parênteses representam o N experimental. Dados são expressos como média ± EPM.

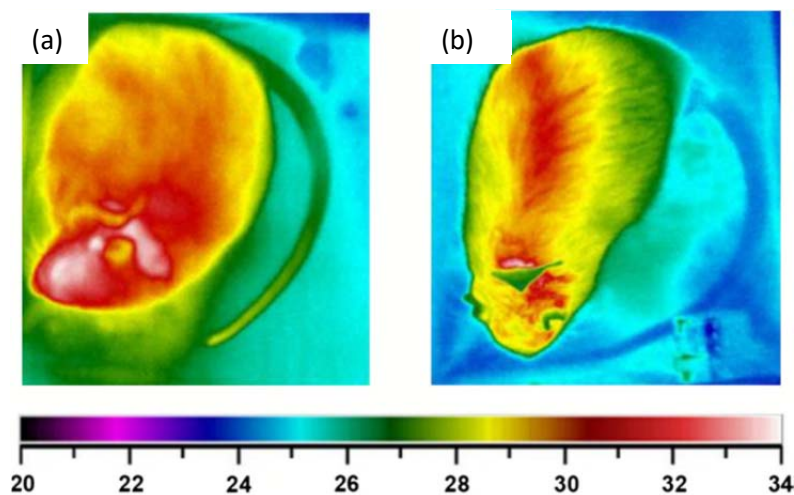


Fig. 3. Efeito da administração i.v. de antagonista de TRPV4, HC-067047, na temperatura da cauda (um índice do tônus vasomotor da cauda). As imagens infravermelho referem-se a animais representativos de diferentes grupos: veículo (a) e HC-067047 (b) durante os experimentos conduzidos a 26°C.

2. Efeito da manipulação do TRPV4 na termorregulação comportamental – gradiente térmico:

A estimulação térmica (28-31°C) levou os animais controle a procurarem por regiões mais frias do gradiente, depois do final do confinamento, que aqueles tratados com antagonista (HC-067047; 100µg/kg; 1mL/kg; efeito do tratamento: $F_{1,10} = 5.09$; $P = 0.048$; efeito do tempo: $F_{1,10} = 3.13$; $P < 0.001$; sem efeito de interação; Fig. 4a). A T_c dos animais tratados com HC-067047 foi maior que a dos animais controle ($37.5 \pm 0.1^\circ\text{C}$ vs $37.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$, respectivamente; efeito da interação entre tratamento vs tempo: $F_{1,10} = 1.44$; $P = 0.01$, dados não mostrados). Neste mesmo sentido, a estimulação química dos canais TRPV4 com agonista (RN-1747; 1000µg/mL; 1mL tópico) causou uma redução na T_a selecionada comparada com os animais tratados com veículo (efeito da interação entre tratamento vs tempo: $F_{1,9} = 4.18$; $P < 0.001$; Fig. 4b), bem como reduziu a T_c ao longo do tempo (T_c foi reduzida $0.7 \pm 0.2^\circ\text{C}$ depois do tratamento com agonista e apenas $0.1 \pm 0.2^\circ\text{C}$ depois do tratamento controle; efeito da interação entre tratamento vs tempo: $F_{1,8} = 1.41$; $P = 0.02$; dados não mostrados).

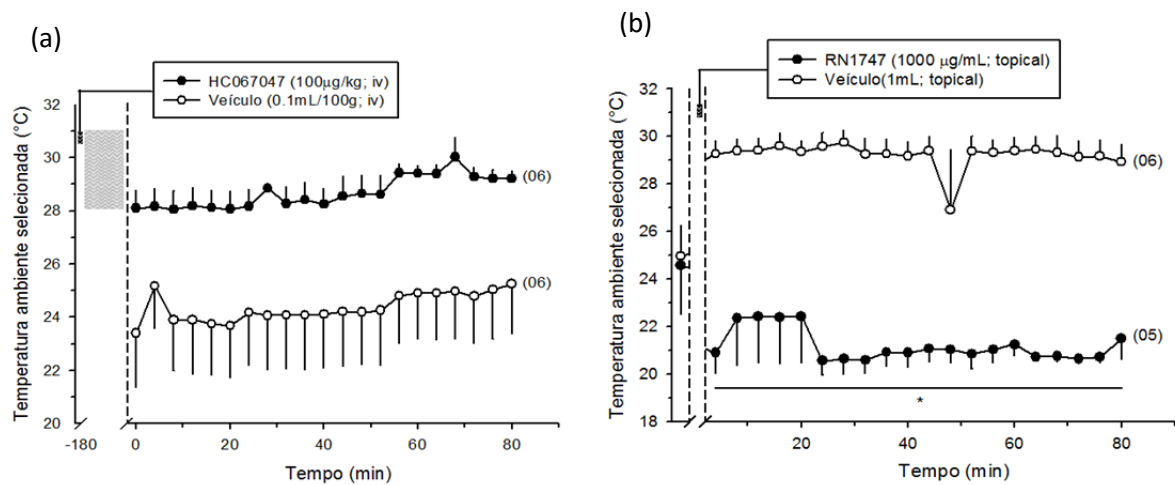


Fig. 4. Efeito da estimulação térmica e química do TRPV4 em ratos expostos ao gradiente térmico. Painel (a) mostra a T_a selecionada pelos animais após o tratamento com veículo ou HC-067047 e o confinamento entre 28 e 31°C por 3 horas (indicado no gráfico pela área cinza). Painel (b) mostra a T_a selecionada por animais tratados com veículo ou agonista de TRPV4 (RN-1747). Números em parênteses representam o N experimental. * = pontos onde há efeito de interação. Dados são expressos como média \pm EPM.

4. DISCUSSÃO

No presente trabalho, nós testamos se a manipulação dos canais TRPV4 sensíveis ao calor altera a Tc e quais termofetores (autonômicos e/ou comportamentais) estão envolvidos nesta resposta. Baseado na faixa de temperatura de ativação destes receptores, *in vitro*, nossa hipótese era que temperaturas moderadas ativariam os canais TRPV4 periféricos *in vivo* que, por sua vez, ativariam respostas de defesa ao calor, regulando a Tc. Os resultados indicam que, nas condições empregadas no presente estudo, os TRPV4 cutâneos são fisiologicamente ativados *in vivo* em Tas entre 26-30°C e parecem estar envolvidos na ativação de ambos os termofetores, autonômicos e comportamentais.

O bloqueio intravenoso deste canal causou um aumento na Tc quando os animais foram expostos a 26°C de Ta. Tal aumento foi acompanhado por um aumento no consumo de oxigênio (um índice da termogênese). Além disso, segundo dados do laboratório colaborador, a estimulação química dos receptores por agonista tópico causou uma redução na Tc que foi influenciada por aumento na vasodilatação da cauda. Estes e outros resultados sobre o efeito do agonista de TRPV4 na Tc são apresentados graficamente e melhores discutidos na publicação encontrada no Apêndice A. Tais resultados (tanto de consumo de oxigênio quanto de IPC) indicam que os TRPV4 modulam a ativação dos dois termofetores autonômicos mais importantes para ratos. Ainda, animais tratados com agonista de TRPV4 apresentaram uma preferência por Tas mais frias quando colocados em um gradiente térmico em comparação aos controles e os animais que foram termicamente estimulados (28-31°C) e tratados com o antagonista deste canal preferiam Tas mais quentes que o grupo veículo, demonstrando que o comportamento de busca pelo frio foi bloqueado após o tratamento com HC-067047. Estes resultados claramente indicam um papel do TRPV4 na ativação de respostas de perda de calor via mecanismo comportamental em ratos.

Embora estudos anteriores tenham sugerido o TRPV4 como um termosensor, o seu papel como termorregulador ainda não havia sido proposto, pois camundongos *knock out* (KO) para V4 apresentam Tc similar àquela dos animais controle em normotermia ou quando são expostos a ambiente frio (Liedtke e Friedman, 2003; Lee et al., 2005). No entanto, resultados negativos com animais KO são difíceis de interpretar, especialmente porque estes animais podem apresentar mecanismos compensatórios (Mogil et al., 2000, Lariviere et al., 2001) e, então, não podíamos excluir a participação dos canais TRPV4 na termorregulação apenas com base nestes trabalhos. De fato, no caso do TRPV1, também nenhuma mudança na

termorregulação foi observada nos estudos com animais KO (Szelényi et al., 2004; Iida et al., 2005) embora, mais recentemente, tenha sido demonstrado que estes canais são importantes para a manutenção da Tc (Steiner et al., 2007). Por meio de ferramentas farmacológicas e, então, alterando a atividade dos canais TRPV4 apenas temporariamente, nosso grupo conseguiu evitar que mecanismos compensatórios acontecessem a longo prazo e fomos assim capazes, pela primeira vez, de mostrar o envolvimento deste receptor na manutenção da Tc em um organismo não geneticamente modificado.

Papel dos TRPV4 quanto a Ta é fixa

Os resultados do laboratório da prof. M. C. Almeida sobre a aplicação tópica do agonista a 26°C de Ta apontavam o envolvimento dos canais TRPV4 na ativação de respostas de perda de calor e na consequente redução da Tc, então, para complementar estes dados, protocolos com o uso do antagonista do canal e sob diferentes Tas (visando uma estimulação térmica dos canais, ao invés de química como foi feito com o uso do agonista) foram realizados (ver Apêndice A). Nestes protocolos, para facilitar que o antagonista alcançasse seus receptores na pele (Patapoutian et al., 2003), os animais, antes de serem submetidos as suas respectivas Tas experimentais, foram expostos a temperaturas moderadas de modo a induzir um aumento no fluxo sanguíneo para a pele como já descrito (Almeida et al., 2012).

Os resultados mostraram que o bloqueio dos receptores TRPV4 causou um aumento na Tc quando os animais foram expostos a 26 ou a 30°C (Fig. 1 e Tabela 1), o que é consistente com nossa hipótese inicial que temperaturas quentes não nocivas ativariam estes canais. Quando estes canais foram bloqueados, as respostas de defesa ao calor não foram ativadas, promovendo a hipertermia. O aumento na Tc não foi visto quando a Ta era 22°C ou 32°C, possivelmente porque estas temperaturas estão fora da faixa de ativação dos canais TRPV4 e sejam detectadas por outros receptores sensíveis à temperatura, como o TRPM8 e V3, respectivamente (Caterina, 2007).

O próximo passo então foi estudar quais termofetores eram ativados e/ou inibidos durante a resposta termorreguladora à manipulação do TRPV4. Com os resultados aqui apresentados (Fig. 2), nós mostramos que a termogênese é modulada pelo V4, pois o consumo de oxigênio foi discreto, mas significativamente aumentado ao longo do tempo após o tratamento com HC-067047 quando comparado ao tratamento com veículo. Estes resultados estão de acordo com estudos que mostram que camundongos KO para TRPV4 e adipócitos

isolados desta mesma linhagem de animal apresentam elevado $\dot{V}O_2$ comparado aos animais e células controle (Kusudo et al., 2012; Ye et al., 2012). No presente estudo, os animais que tiveram seus receptores TRPV4 farmacologicamente bloqueados pelo antagonista consumiram $1.24 \pm 0.2 \text{ mL O}_2/\text{kg}/\text{min}$ a mais que os ratos tratados com veículo. Assumindo que cada mililitro de oxigênio consumido produz 20.3 J de calor (Randall et al., 1997), este pequeno aumento foi suficiente para produzir 1.5 kJ em 60 minutos (entre 50 e 110 minutos; $1.24 \times 60 \times 20.3$), o que é suficiente para aumentar a T_c em 0.7°C em animais de 300g (Fig. 2b; $Q = mc\Delta t$, onde Q é a energia térmica em calorias, m é a massa em gramas, c é o calor específico, considerado 3.47 J para tecidos biológicos e Δt é a variação de temperatura, 0.7°C ; Schmidt-Nielsen 1997; Da Silva e Maia 2013). Quanto ao IPC, embora ele pareça ser menor nos animais tratados com antagonista, ele não foi estatisticamente diferente dos animais controle (Fig. 3). Estes resultados revelam que o bloqueio da sinalização da informação quente não nociva mediada por TRPV4, inativa reposta de defesa do calor, aumentando a T_c .

Papel do TRPV4 quando a T_a pode ser selecionada pelo animal

Os resultados do laboratório colaborador indicavam ativação também dos mecanismos comportamentais depois da estimulação dos TRPV4. Eles demonstraram que animais controle gastavam mais tempo a 32°C que a 26°C quando eles só tinham estas duas T_a s para escolherem, mas os animais tratados com agonista gastavam tempo igual nas duas T_a s, apontando que a preferência por T_a s mais quente foi inexistente após o tratamento com RN 1747 (veja Apêndice A). Para melhor compreender o envolvimento dos TRPV4 na termorregulação comportamental, nós estudamos os ratos em gradiente térmico. No primeiro experimento, os animais foram temporariamente confinados em uma região do gradiente onde a T_a ficava entre 28 e 31°C de modo a verificar o esperado comportamento de busca pelo frio depois da estimulação térmica (Almeida et al., 2006a). De fato, os animais controle preferiram T_a s mais frias que os tratados com antagonista (Fig. 4a). No outro experimento, a estimulação química dos TRPV4 com agonista em animais não confinados e colocados no gradiente levou-os a procurarem por T_a s mais frias que os controles (Fig. 4b). Ambos os resultados claramente indicam que a estimulação dos TRPV4 (tanto térmica quanto química) ativa comportamento de busca pelo frio. Juntos, nossos resultados indicam que se os animais tem a possibilidade de selecionarem uma T_a de preferência, a estimulação dos TRPV4 ativará o mecanismo comportamental, de modo a regular a T_c , o que está de acordo com a ativação prioritária deste tipo de termofetor já que ele é considerado muito eficiente e menos

energicamente custoso que os efetores autonômicos. Por outro lado, quando não é permitido aos animais termorregularem comportamentalmente, a estimulação dos TRPV4 ativará termofetores autonômicos para regulação da Tc. Com estes dados, então, nós mostramos, pela primeira vez, o papel dos TRPV4 periféricos na ativação da perda de calor não evaporativa e a inibição do ganho de calor *in vivo* em ratos.

Perspectivas

Desde que os canais TRPV4 foram caracterizados aproximadamente 10 anos atrás, vários estudos foram desenvolvidos e diversas funções biológicas para estes canais foram propostas, tais como regulação e detecção da osmolalidade no sistema nervoso central (Strotmann et al., 2000; Liedtke & Friedman 2003; Liedtke et al. 2003), termorrecepção em animais KO (Lee et al., 2005), participação em repostas inflamatórias (Vergnolle et al., 2010; Bang et al., 2012; Denadai-Souza et al., 2012; Ye et al., 2012; Poole et al., 2013), nocicepção (Alessandri-Haber et al., 2003, 2005; Nakatsuka e Iwai 2009; Everaerts et al. 2010b), respostas de hiperalgisia (Todaka et al., 2004; Alessandri-Haber et al., 2009; Ding et al., 2010, Wang et al., 2011; Segond von Banchet et al., 2013), entre outros. O presente estudo adiciona ainda a participação dos canais TRPV4 na regulação da Tc em ratos não geneticamente modificados. Recentemente, os canais termoTRP foram sugeridos como um alvo para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Contudo, parece que muitos dos compostos submetidos para testes clínicos ainda estão longe de serem bem sucedidos, em particular, devido à ocorrência de efeitos colaterais (Ferrer-Montiel et al., 2012). A melhor compreensão das funções destes canais é essencial para o desenvolvimento de novas ferramentas que modulem a atividade deles mesmos, mas que causem menos efeitos colaterais. Com este estudo pretendemos contribuir para um melhor conhecimento a respeito das funções deste receptor no sistema termorregulador, fornecendo importantes dados que possam colaborar com o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

-
- AIHARA, H.; OKADA, Y.; TAMAKI, N. The effects of cooling and rewarming on the neuronal activity of pyramidal neurons in guinea pig hippocampal slices. **Brain Res.**; v. 893, p. 36–45. 2001.
- ALESSANDRI-HABER, N.; YEH, J.J.; BOYD, A.E.; PARADA, C.A.; CHEN, X.; REICHLING, D.B.; LEVINE, J.D. Hypotonicity induces TRPV4-mediated nociception in rat. **Neuron.** v. 39, p. 497–511, 2003.
- ALESSANDRI-HABER, N.; JOSEPH, E.; DINA, O.A.; LIEDTKE, W.; LEVINE, J.D. TRPV4 mediates pain-related behavior induced by mild hypertonic stimuli in the presence of inflammatory mediator. **Pain**, v. 118, p. 70–79, 2005
- ALESSANDRI-HABER, N.; DINA, O.A.; CHEN, X.; LEVINE, J.D. TRPC1 and TRPC6 channels cooperate with TRPV4 to mediate mechanical hyperalgesia and nociceptor sensitization. **J Neurosci.**, v. 29, p. 6217–6228, 2009.
- ALMEIDA, M.C.; STEINER, A.A.; BRANCO, L.G.; ROMANOVSKY, A.A. Cold-seeking behavior as a thermoregulatory strategy in systemic inflammation. **Eur J Neurosci.**, v. 23, p. 3359–3367, 2006a.
- ALMEIDA, M.C.; STEINER, A.A.; BRANCO, L.G.; ROMANOVSKY, A.A. Neural substrate of cold-seeking behavior in endotoxin shock. **PLoS ONE**, 1, e1., 2006b.
- ALMEIDA, M.C.; HEW-BUTLER, T.; SORIANO, R.N.; RAO, S.; WANG, W.; WANG, J.; TAMAYO, N.; OLIVEIRA, D.L.; NUCCI, T.B.; ARYAL, P.; GARAMI, A.; BAUTISTA, D.; GAVVA, N.R.; ROMANOVSKY, A.A. Pharmacological blockade of the cold receptor TRPM8 attenuates autonomic and behavioral cold defenses and decreases deep body temperature. **J Neurosci.**, v. 32, p. 2086–2099, 2012.
- BANG, S.; YOO, S.; YANG, T.J.; CHO, H.; HWANG, S.W. Nociceptive and pro-inflammatory effects of dimethylallyl pyrophosphate via TRPV4 activation. **Br J Pharmacol.**, v. 166, p. 1433–1443, 2012.
- BICEGO, K.C.; BARROS, R.C.; BRANCO, L.G. Physiology of temperature regulation: comparative aspects. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.**; v. 147, p. 616–639, 2007.
- CATERINA, M.J. Transient receptor potential ion channels as participants in thermosensation and thermoregulation. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, v. 292, p. R64–R76, 2007.
- DA SILVA, R.G.; MAIA, A.S.C. Thermal balance and thermoregulation. In: _____ **Principles of Animal Biometeorology**, Netherlands: Springer, 2013. p. 75–106.
- DELANY, N.S.; HURLE, M.; FACER, P.; ALNADAF, T.; PLUMPTON, C.; KINGHORN, I.; SEE, C.G.; COSTIGAN, M.; ANAND, P.; WOOLF, C.J.; CROWTHER, D.; SANSEAU, P.; TATE, S.N. Identification and characterization of a novel human vanilloid receptor-like protein, VRL-2. **Physiol Genomics**, v. 4, p. 165–174, 2001.

DENADAI-SOUZA, A.; MARTIN, L.; DE PAULA, M.A.; DE AVELLAR, M.C.; MUSCARA, M.N.; VERGNOLLE, N.; CENAC, N. Role of transient receptor potential vanilloid 4 in rat joint inflammation. **Arthritis Rheum.**, v. 64, p. 1848–1858, 2012.

DING, X.L.; WANG, Y.H.; NING, L.P.; ZHANG, Y.; GE, H.Y.; JIANG, H.; WANG, R.; YUE, S.W. Involvement of TRPV4-NO-cGMP-PKG pathways in the development of thermal hyperalgesia following chronic compression of the dorsal root ganglion in rats. **Behav Brain Res.**, v. 208, p. 194–201, 2010.

EVERAERTS, W.; ZHEN, X.; GHOSH, D.; VRIENS, J.; GEVAERT, T.; GILBERT, J.P.; HAYWARD, N.J.; MCNAMARA, C.R.; XUE, F.; MORAN, M.M.; STRASSMAIER, T.; UYKAL, E.; OWSIANIK, G.; VENNEKENS, R.; DE RIDDER, D.; NILIUS, B.; FANGER, C.M.; VOETS, T. Inhibition of the cation channel TRPV4 improves bladder function in mice and rats with cyclophosphamide-induced cystitis. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 107, p. 19084–19089, 2010a.

EVERAERTS, W.; NILIUS, B.; OWSIANIK, G. The vanilloid transient receptor potential channel TRPV4: from structure to disease. **Prog Biophys Mol Biol.**, v. 103, p. 2–17, 2010b.

FERRER-MONTIEL, A.; FERNÁNDEZ-CARVAJAL, A.; PLANELLS-CASES, R.; FERNÁNDEZ-BALLESTER, G.; GONZÁLEZ-ROS, J.M.; MESSEGUER, A.; GONZALEZ-MUNIZ, R. Advances in modulating thermosensory TRP channels. **Expert Opin Ther Pat.**, v. 22, p. 999–1017, 2012.

GORDON, C.J. Thermal biology of the laboratory rat. **Physiol Behav.**; v. 47, p. 963–991, 1990.

GÜLER, A.D.; LEE, H.; IIDA, T.; SHIMIZU, I.; TOMINAGA, M.; CATERINA, M. Heat-evoked activation of the ion channel, TRPV4. **J Neurosci.**; v. 22, p. 6408–6414, 2002.

IIDA, T.; SHIMIZU, I.; NEALEN, M.L.; CAMPBELL, A.; CATERINA, M. Attenuated fever response in mice lacking TRPV1. **Neurosci Lett.**, v. 378, p. 28–33, 2005.

KAUER, J.A.; GIBSON, H.E. Hot flash: TRPV channels in the brain. **Trends Neurosci.**; v. 32, p. 215–224, 2009.

KUSUDO, T.; WANG, Z.; MIZUNO, A.; SUZUKI, M.; YAMASHITA, H. TRPV4 deficiency increases skeletal muscle metabolic capacity and resistance against diet-induced obesity. **J Appl Physiol.**, v. 7, p. 1223–1232, 2012.

LARIVIERE, W.R.; CHESLER, E.J.; MOGIL, J.S. Transgenic studies of pain and analgesia: mutation or background genotype? **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 297, p. 467–473, 2001.

LEE, H.; IIDA, T.; MIZUNO, A.; SUZUKI, M.; CATERINA, M.J. Altered thermal selection behavior in mice lacking transient receptor potential vanilloid 4. **J Neurosci.**, v. 25, p. 1304–1310, 2005.

LIEDTKE, W.; FRIEDMAN, J.M. Abnormal osmotic regulation in *trpv4*^{-/-} mice. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 100, p. 13698–13703, 2003.

LIEDTKE, W.; CHOE, Y.; MARTI-RENOM, M.A.; BELL, A.M.; DENIS, C.S.; SALI, A.; HUDSPETH, A.J.; FRIEDMAN, J.M.; HELLER, S. Vanilloid receptor-related osmotically

activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. *Cell*, v. 103, p. 525–535, 2000.

LIEDTKE, W.; TOBIN, D.M.; BARGMANN, C.I.; FRIEDMAN, J.M. Mammalian TRPV4 (VR-OAC) directs behavioral responses to osmotic and mechanical stimuli in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, v. 100(Suppl 2), p. 14531–14536, 2003.

LIGHTON, J.R.B. Flow-through respirometry: the equations. In: _____ **Measuring Metabolic Rates. A Manual for Scientists**. New York: Oxford University Press, 2008. p. 96.

MOGIL, J.S.; YU, L.; BASBAUM, A.I. Pain genes?: natural variation and transgenic mutants. *Annu Rev Neurosci.*, v. 23, p. 777–811, 2000.

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

NAKATSUKA, M.; IWAI, Y. Expression of TRPV4 in the stimulated rat oral mucous membrane—nociceptive mechanisms of lingual conical papillae. *Okajimas Folia Anat Jpn.*, v. 86, p. 45–54, 2009.

PATAPOUTIAN, A.; PEIER, A.M.; STORY, G.M.; VISWANATH, V. ThermoTRP channels and beyond: mechanisms of temperature sensation. *Nat Rev Neurosci.*, v. 4, p. 529–539, 2003.

POOLE, D.P.; AMADESI, S.; VELDHUIS, N.A.; ABOGADIE, F.C.; LIEU, T.; DARBY, W.; LIEDTKE, W.; LEW, M.J.; MCINTYRE, P.; BUNNETT, N.W. Protease-activated receptor 2 (PAR2) protein and transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) protein coupling is required for sustained inflammatory signaling. *J Biol Chem.*, v. 288, p. 5790–5802, 2013.

RANDALL, D.; BURGGREN, W; FRENCH, K. Using energy: meeting environmental challenges. In: _____. **Eckert Animal Physiology: Mechanisms and Adaptations**. 4.ed. New York:Freeman Company, 1997. p. 665–723.

ROMANOVSKY, A.A.; SIMONS, C.T.; KULCHITSKY, V.A. “Biphasic” fevers often consist of more than two phases. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*; v. 275, p. R323–R331, 1998.

ROMANOVSKY, A.A.; IVANOV, A.I.; SHIMANSKY, Y.P. Selected contribution: ambient temperature for experiments in rats: a new method for determining the zone of thermal neutrality. *J Appl Physiol.*, v. 92, p. 2667–2679, 2002.

SCHMIDT-NIELSEN, K. Temperature regulation. In: ____ Animal Physiology: adaptation and environment. Cambridge: Cambridge University Press. 1997, p. 241–300.

SEGOND VON BANCHET, G.; BOETTGER, M.K.; KONIG, C.; IWAKURA, Y.; BRAUER, R.; SCHAIBLE, H.G. Neuronal IL-17 receptor upregulates TRPV4 but not TRPV1 receptors in DRG neurons and mediates mechanical but not thermal hyperalgesia. *Mol Cell Neurosci.*, v. 52, p. 152–160, 2013.

STEINER, A.A.; TUREK, V.F.; ALMEIDA, M.C.; BURMEISTER, J.J.; OLIVEIRA, D.L.; L.ROBERTS, J.; BANNON, A.W.; NORMAN, M.H.; LOUIS, J.C.; TREANOR, J.J.;

GAVVA, N.R.; ROMANOVSKY, A.A. 2007. Nonthermal activation of transient receptor potential vanilloid-1 channels in abdominal viscera tonically inhibits autonomic cold-defense effectors. **J Neurosci.**, v. 27, p. 7459–7468, 2007.

STROTMANN, R.; HARTENECK, C.; NUNNENMACHER, K.; SCHULTZ, G.; PLANT, T.D.. OTRPC4, a nonselective cation channel that confers sensitivity to extracellular osmolarity. **Nat Cell Biol**, v. 2, p. 695–702, 2000.

SZELÉNYI, Z.; HUMMEL, Z.; SZOLCS_ ANYI, J.; DAVIS, J.B. Daily body temperature rhythm and heat tolerance in TRPV1 knockout and capsaicin pretreated mice. **Eur J Neurosci.**, v. 19, p. 1421–1424, 2004.

TODAKA, H.; TANIGUCHI, J.; SATOH, J.; MIZUNO, A.; SUZUKI, M. Warm temperature-sensitive transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) plays an essential role in thermal hyperalgesia. **J Biol Chem.**, v. 279, p. 35133–35138, 2004.

VERGNOLLE, N.; CENAC, N.; ALTIER, C.; CELLARS, L.; CHAPMAN, K.; ZAMPONI, G.W.; MATERAZZI, S.; NASSINI, R.; LIEDTKE, W.; CATTARUZZA, F.; GRADY, E.F.; GEPPETTI, P.; BUNNETT, N.W. A role for transient receptor potential vanilloid 4 in tonic-induced neurogenic inflammation. **Br J Pharmacol.**, v. 159, p. 1161–1173, 2010.

VINCENT, F.; DUNCTON, M.A. TRPV4 agonists and antagonists. **Curr Top Med Chem.**, v. 11, p. 2216–2226, 2011.

VINCENT, F.; ACEVEDO, A.; NGUYEN, M.T.; DOURADO, M.; DEFALCO J.; GUSTAFSON, A.; SPIRO, P.; EMERLING, D.E.; KELLY, M.G.; DUNCTON, M.A. Identification and characterization of novel TRPV4 modulators. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 3, p. 490–494, 2009.

VOETS, T.; TALAVERA, K.; OWSIANIK, G.; NILIUS, B. Sensing with TRP channels. **Nat Chem Biol.**, v. 1, p. 85–92, 2005.

WANG, C.; NING, L.P.; WANG, Y.H.; ZHANG, Y.; DING, X.L.; GE, H.Y.; ARENDT-NIELSEN, L. & YUE, S.W. Nuclear factor-kappa B mediates TRPV4-NO pathway involved in thermal hyperalgesia following chronic compression of the dorsal root ganglion in rats. **Behav Brain Res.**, v. 221, p. 19–24, 2011.

WASSERSTROM, J.A.; VITES, A.M. Activation of contraction in cat ventricular myocytes: effects of low Cd(2+) concentration and temperature. **Am J Physiol.**; v. 277, p. H488–H498, 1999.

WATANABE, H.; VRIENS, J.; SUH, S.H.; BENHAM, C.D.; DROOGMANS, G.;NILIUS, B. 2002. Heat-evoked activation of TRPV4 channels in a HEK293 cell expression system and in native mouse aorta endothelial cells. **J Biol Chem.**, v. 277, p. 47044–47051, 2002.

WENISCH, C.; NARZT, E.; SESSLER, D.L.; PARSCHALK, B.; LENHARDT, R.; KURZ, A.; GRANINGER, W. Mild intraoperative hypothermia reduces production of reactive oxygen intermediates by polymorphonuclear leukocytes. **Anesth Analg.** v. 82, p.810–816, 1996.

YE, L.; KLEINER, S.; WU, J.; SAH, R.; GUPTA, R.K.; BANKS, A.S.; COHEN, P.; KHANDEKAR, M.J.; BOSTRÖM, P.; MEPANI, R.J.; LAZNIK, D.; KAMENECKA, T.M.;

SONG, X.; LIEDTKE, W.; MOOTHA, V.K.; PUIGSERVER, P.; GRIFFIN, P.R.; CLAPHAM, D.E.; SPIEGELMAN, B.M. TRPV4 is a regulator of adipose oxidative metabolism, inflammation, and energy homeostasis. *Cell*. v. 151. p.96–110. 2012.

Capítulo II

Participação dos TRPV4 centrais na ativação de respostas de perda de calor em ratos

RESUMO

Recentemente, nosso grupo descreveu, pela primeira vez em animal não geneticamente modificado, que os TRPV4 periféricos são ativados quando a temperatura ambiente (T_a) está entre 26-30°C e modulam a taxa metabólica, o tônus vasomotor da cauda e o mecanismo comportamental de busca pelo frio levando à manutenção da temperatura corporal (T_c). Além da periferia, os TRPV4 também podem ser encontrados na área pré-óptica medial (MPA), região envolvida com ativação das respostas autonômicas de perda de calor durante exposição a T_a s moderadamente altas. Entretanto, não era conhecido o papel dos TRPV4 hipotalâmicos na termorregulação. Então, o objetivo do presente trabalho foi verificar se os TRPV4 da MPA participam do controle da temperatura corporal (T_c) e quais efetores estariam envolvidos nesta resposta. Para este fim, sob duas T_a s diferentes (21 e 28°C), a T_c de ratos adultos foi medida após o bloqueio dos TRPV4 da MPA com um antagonista específico. A taxa metabólica, o índice de perda de calor (IPC) e o mecanismo comportamental de busca pelo frio também foram avaliados após bloqueio dos receptores. A T_c dos animais foi maior após o tratamento com o antagonista (HC-067047; $p < 0.001$) e este resultado foi mais evidente quando a T_a era 28°C. Paralelamente à T_c , o $\dot{V}O_2$ ($p = 0.012$), mas não o IPC ($p > 0.05$) também foi mais elevado nos animais que receberam microinjeção de HC-067047. E o comportamento de busca pelo frio após os animais serem expostos por duas horas a T_a s moderadamente altas, foi inibido após bloqueio dos receptores ($p = 0.01$). Em conjunto, estes resultados mostram que: 1) os TRPV4 da MPA participam da manutenção da T_c quando a T_a é moderadamente elevada e 2) a MPA é importante para a ativação do mecanismo comportamental em ratos, ao contrário do que havia sido sugerido anteriormente.

Palavras-chave: TRPV4, área pré-óptica medial, temperatura corporal, taxa metabólica, termorregulação comportamental

ABSTRACT

Recently, our group has described, in non-genetically modified rats, that peripheral TRPV4 is activated at ambient temperatures (T_a) of 26-30°C and warmth-defence responses are triggered by these receptors. TRPV4 also can be found in medial pre optic area (MPA), region known by being involved with activation of heat loss mechanism. Nevertheless no data was available about the role of hypothalamic TRPV4 in thermoregulation. Then, the aim of this study was to verify if central TRPV4 in the medial preoptic area (MPA) plays a role in the control of body temperature (T_c) and which thermoeffectors are involved in this response. To this end, under two different T_a s (21 e 28°C), the T_c of rats was measured after TRPV4 in MPA were antagonized by HC-067047. Metabolic rate, heat loss index (HLI) and preferred temperature (T_p) were also recorded after central blockage of TRPV4. The antagonism of central TRPV4 caused a further increase in the T_b of rats ($p < 0.001$) exposed to 28°C than to 21°C compared to vehicle-treated animals. The $\dot{V}O_2$ ($p = 0.012$), but not HLI, was also increased by the antagonist. Lastly, the cold seeking behavior observed in control animals after exposition to warm T_a s for 2 hours (28-30°C) was inhibited by the microinjection of the antagonist of TRPV4 ($p = 0.01$). Our results suggest that: 1) central TRPV4 plays a role in the thermoregulation when T_a is warm and 2) MPA is an important site for behavioral thermoregulation, in opposition to what has been suggested formerly.

Key words: TRPV4, medial pre optic area, body temperature, metabolic rate, behavioural thermoregulation.

LISTA DE ABREVIACÕES

-
- $\dot{V}O_2$: taxa metabólica (ml O₂ kg⁻¹ min⁻¹ STPD);
- 3V: terceiro ventrículo;
- APO: área pré-óptica;
- CA: comissura anterior;
- Canais TRP: “*transient receptor potential channels*”;
- DMH: hipotálamo dorso medial;
- F_e: Fluxo de entrada do ar;
- F_eO₂: Fração de entrada de oxigênio;
- F_sO₂: Fração de saída de oxigênio;
- Intra MPA: animais cujo sítio de microinjeção foi localizado dentro da área pré-óptica medial;
- IPC: índice de perda de calor, isto é, o grau de vasodilatação/vasoconstrição;
- LPBd: núcleo parabraquial, parte dorsal;
- LPBl: núcleo parabraquial, parte lateral;
- MnPO: núcleo pré óptico mediano;
- MPA: área pré-óptica medial;
- MPOC: núcleo pré óptico medial, parte central;
- MPOL: núcleo pré óptico medial, parte lateral;
- MPOM: núcleo pré óptico medial, parte medial;
- NMDA: receptor de glutamato dependente de voltagem;
- OX: quiasma óptico;
- Peri MPA: animais cujo sítio de microinjeção foi localizado fora da área pré-óptica medial;
- Ta: temperatura ambiente;
- TC: trajeto da cânula;
- Tc: temperatura corporal;
- Tp: temperatura da pele da cauda.

1. INTRODUÇÃO

É indiscutível a importância da manutenção da temperatura corporal (T_c) dentro de determinados limites, já que ela é uma variável que influencia todos os outros sistemas do organismo. Este controle da T_c depende de uma comunicação sincronizada entre os receptores periféricos, as regiões centrais responsáveis por integrarem a informação e elaborarem as respostas e os órgãos efetores que vão, de fato, responder ao sinal que foi enviado pelos receptores. Ultimamente, estudos foram dedicados à descoberta e descrição da via somatossensorial da termorregulação (Nakamura e Morrison, 2007, 2008, 2010; Nakamura, 2011) e o que se sabe atualmente é que as informações de quente e frio seguem por vias separadas desde a sua detecção na periferia, passagem pela medula espinal e ascensão até o núcleo parabraquial (LPB dorsal ou lateral, se quente ou frio, respectivamente). Do LPB, as informações são enviadas à área pré-óptica (APO), conhecida por ser a principal região envolvida na regulação da T_c e por ter um importante papel integrador de todas as informações térmicas vindas das várias regiões do organismo (Matsuda et al., 1992; Boulant, 1998). Da APO, mais especificamente do núcleo pré-óptico mediano (MnPO), sai uma rede de interneurônios excitatórios ou inibitórios em direção à APO medial (MPA), ativando ou inibindo esta sub-região que, por sua vez, se conecta a outras áreas (hipotálamo dorsomedial, DMH, e núcleo rostral da rafe) responsáveis pelo controle da produção dependente e independente de tremor e pela vasoconstrição (Nakamura e Morrison, 2008 e 2010).

Nos últimos dez anos foram descritos alguns canais catiônicos TRPs (do inglês: *transient receptor potential channels*) que respondem aos mais diversos estímulos, dentre eles a temperatura. Estes canais têm sido sugeridos como sensores de temperatura ambiente (T_a) na periferia e seus estudos certamente contribuiriam pra melhor elucidação da via de termorrecepção. A respeito dos TRPV4, foco deste trabalho, sabe-se que eles são amplamente expressos nos tecidos de mamíferos, podendo ser encontrados, dentre outros lugares, nos queratinócitos e na APO, principalmente na MPA e no MnPO (Güler et al., 2002; Watanabe et al., 2002; Patapoutian et al., 2003; Caterina, 2007). Em relação ao seu papel na termorregulação, é conhecido que eles detectam temperaturas altas não nocivas e que camundongos geneticamente destituídos deste tipo de canal selecionam T_a s mais altas do que os camundongos selvagens, além de apresentarem maior latência no teste de retirada da cauda quando esta é imersa em temperaturas moderadamente altas em comparação aos animais controles (Lee et al., 2005). Recentemente, nosso grupo em colaboração com o grupo da Dra.

Maria Camila Almeida, descreveu em animais não geneticamente modificados a ativação dos TRPV4 periféricos entre Tas de 26-30°C e a modulação da taxa metabólica, do tônus vasomotor da cauda e do mecanismo comportamental decorrente desta ativação (Vizin et al., 2015). Entretanto, não se conhecia o papel dos TRPV4 da MPA no controle da Tc. Baseado em nosso recente estudo e no modelo de Nakamura e Morrison (2010) para ativação de respostas de perda de energia térmica, a presença de TRPV4 na MPA poderia indicar a participação destes receptores nas vias termolíticas frente a estímulos térmicos. Então, no presente trabalho, foi verificado se os TRPV4 da MPA estão envolvidos na termorregulação autonômica e comportamental. Para este fim, primeiramente foi determinada a Tc depois do bloqueio químico dos receptores TRPV4 hipotalâmicos em duas Tas diferentes. Em um segundo momento, a taxa metabólica, o índice de perda de calor (IPC) e o mecanismo comportamental foram também verificados após o bloqueio dos receptores da MPA.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados neste estudo ratos da linhagem Wistar (massa corporal de 290-320g) provenientes da UNESP de Botucatu – SP. Os animais receberam água e ração *ad libitum*, foram acondicionados à Ta de $23 \pm 2^\circ\text{C}$ e submetidos a um ciclo claro:escuro de 12h:12h. Os experimentos foram realizados entre 8:00 e 17:00h em grupos separados de animais e os protocolos experimentais foram conduzidos de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e tiveram aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal (Protocolo n# 019288/14).

Fármaco

HC-067047 (2-Metil-1- [3- (4-morfolinil) propil] -5-fenil-N- [3-(trifluorometil) fenil] -1H-pirrol-3-carboxamida; Tocris Bioscience, Bristol, UK) foi recentemente descrito como um potente e seletivo antagonista para TRPV4 que inibe a ativação deste receptor por vários estímulos, incluindo o calor, hipotonicidade, ácido araquidônico e o agonista 4α -PDD (Everaerts et al. 2010). O antagonista foi dissolvido em 90% de salina estéril e 10% de etanol e as doses utilizadas (1.5; 15 e 75ng/kg; foram injetados 0.5; 5 ou 25ng/50nL/animal de ~ 330g) foram baseadas em nosso estudo prévio (Vizin et al., 2015) e experimentos pilotos.

Cirurgias

Os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de 100mg/kg de cetamina e 10mg/kg de xilazina e profilaticamente tratados com antibiótico (enrofloxacina 5%, subcutâneo, 0.5mg/kg, Schering-Plough) e analgésico e anti-inflamatório (flunixinina meglumina, intramuscular, 2.5mg/kg, Schering-Plough). A área corporal destinada às cirurgias foram tricotomizadas e limpas com Digluconato de Clorexidina 2% (Rioquímica, SP, Brasil) e, em seguida, os animais foram fixados em um estereotáxico (David Kopf, modelo 900, Tujunga, CA, EUA) para a implantação de cânula guia. Uma incisão foi feita no escalpo e o perióstio foi retirado para que um pequeno orifício pudesse ser feito onde a cânula seria implantada. A cânula tinha 15mm de comprimento e 0,7mm de diâmetro externo e foi inserida 2mm acima da MPA (barra do incisivo a -3.3mm; 0,0-0,1mm posterior ao bregma;

0,5mm lateral à linha média, e 6.5mm ventral à superfície do crânio) de acordo com as coordenadas adaptadas do atlas de Paxinos e Watson (2005) e baseadas em estudo prévio (Scarpellini, et al., 2009). Posteriormente, a cânula foi fixada ao crânio por meio de parafuso e cimento acrílico e um mandril foi mantido dentro da mesma até o momento das injeções para prevenir oclusão e infecção.

Após a cirurgia central, os animais foram submetidos a uma laparotomia paramediana para inserção de um sensor armazenador de temperatura (SubCue Dataloggers, Calgary, Canadá) e, em seguida à implantação, os músculos abdominais e a pele foram suturados em camadas. Os animais foram submetidos a um dos protocolos experimentais 6-8 dias depois das cirurgias (ver item “Protocolos experimentais” abaixo).

Microinjeção e procedimento histológico

As microinjeções foram realizadas em ratos não anestesiados utilizando-se uma agulha dental de injeção (Mizzy, 200 µm O.D.) conectada por uma cânula PE-10 a uma seringa Hamilton de 5µL acoplada a uma bomba injetora (modelo 310, Stoelting CO., IL, EUA). Foi utilizada uma agulha 2mm mais longa do que a cânula guia, permitindo contato com a MPA apenas no momento da injeção. O volume injetado foi de 50nL de antagonista ou veículo por 30 segundos sendo a agulha removida da cânula guia apenas 30 segundos após o término da injeção para se evitar refluxo.

Ao final de cada experimento, os animais foram anestesiados e 50nL de uma solução 2% de azul de Evans foi injetada na MPA para confirmar o sítio de microinjeção. Os animais foram então perfundidos através do ventrículo cardíaco esquerdo (o átrio direito foi cortado) com 60mL de salina e 60mL de uma solução de formalina a 10%. Em seguida os animais foram decapitados e os encéfalos removidos da caixa craniana e imersos em solução de formalina a 10% por pelo menos dois dias, sendo, em seguida, processados para a realização dos cortes histológicos. Após a inclusão em parafina, foram feitos cortes de 15µm de espessura, abrangendo toda a extensão da MPA, os quais foram corados pelo método de Nissl. O sítio de microinjeção foi confirmado por observação em microscópio óptico e foram considerados para a análise dos resultados dois grupos de animais: intra MPA, aqueles cujo sítio de microinjeção foi localizado dentro desta região e os que tiveram injeção fora desta região eram contados como peri MPA.

Medidas da Tc e temperatura da pele da cauda (Tp):

Os sensores armazenadores 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 minutos utilizando-se o programa “SubCue temperature datalogger”. Ao final dos experimentos, após a eutanásia dos animais, os sensores foram mais uma vez conectados ao 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 pela obtenção de imagens termográficas (câmera sensível a infravermelho; Flir SC660, OR, USA) e foi usada para calcular o índice de perda de calor (IPC) do animal, isto é, o grau de vasodilatação/vasoconstrição da cauda (janela térmica do rato; Almeida et al., 2006a). O IPC varia de 0 a 1, sendo que zero indica vasoconstrição máxima e 1 vasodilatação máxima, e é calculado de acordo com a fórmula (Romanovsky et al., 2002):

$$IPC = \frac{Tp - Ta}{Tc - Ta}$$

Onde:

Tp = temperatura da pele da cauda do rato;

Ta = temperatura ambiente no mesmo momento em que a Tp foi medida;

Tc = temperatura corporal no mesmo momento em que a Tp foi medida.

A técnica da termografia infravermelha detecta a radiação eletromagnética emitida por um corpo e converte tal radiação em uma imagem colorida de acordo com a intensidade da mesma. Essa técnica tem sido comumente usada na fisiologia termal para mensurar a Tp em endotermos (Romanovsky et al., 2002; Tattersall e Milson, 2003; Almeida, et al., 2006a; Scott et al., 2008; Vizin, et al., 2015) e também em ectotermos (Tattersall et al., 2004, Scarpellini, et al., 2015). A emissividade usada foi 0.95 e o respirômetro foi vedado com um plástico filme que implicou em um erro de 35% na detecção das temperaturas. O erro foi devidamente corrigido antes do cálculo do IPC.

Medidas de Consumo de Oxigênio

A taxa metabólica foi inferida por meio da medida de consumo de oxigênio em sistema de respirometria aberta. O animal foi colocado em um respirômetro (3L) dentro de uma câmara de temperatura controlada (Fanem, São Paulo, SP, Brasil) que manteve a Ta dentro do respirômetro a 21 ou 28°C de acordo com o protocolo estudado. Um fluxo contínuo

de ar foi mantido na câmara experimental (*pull mode*) a uma taxa de 1700 mL/min, mas apenas uma subamostra (180 mL/min) deste ar foi enviada aos analisadores de O₂ e H₂O por um subamostrador de fluxo de ar (SS4; Sable Systems, NV, USA). A pressão de vapor de água foi a primeira variável analisada (RH300; Sable Systems) e, posteriormente, foi utilizada (juntamente com a pressão barométrica) para corrigir a porcentagem de O₂ e o fluxo de ar antes do cálculo do $\dot{V}O_2$. Tal correção se fez necessária porque o ar não foi seco nem antes de entrar no respirômetro nem antes de passar pelo analisador de O₂ (Lighton, 2008). Em seguida, a porcentagem de O₂ e a pressão barométrica foram registradas (PA-10; Sable Systems). Cada 20 minutos de registro foram compostos por 3 minutos de *baseline* (amostra do ar que entrava no respirômetro), 14 minutos do ar que saía do respirômetro e mais 3 minutos de *baseline*. Amostras do *baseline* foram registradas para monitorar a constância da água e da porcentagem de O₂ no ar oferecido ao animal ao longo do experimento e para que a fração de O₂ no ar entrando no respirômetro fosse determinado. Um distribuidor múltiplo de gases (RM8 Intelligent Multiplexer; Sable Systems) foi utilizado para controlar qual amostra de gás (do respirômetro ou do *baseline*) seria enviada aos analisadores. Os analisadores foram calibrados sempre que necessário. O analisador de O₂ foi calibrado usando nitrogênio como “zero” e ar seco (20.95%) como “span” e os dados foram coletados a cada segundo por um sistema de aquisição apropriado (EXPEDATA v. 1.4.5; Sable Systems). O $\dot{V}O_2$ foi calculado com base na taxa de fluxo do ar e na diferença de porcentagem do O₂ na entrada e na saída da câmara (Mortola e Besterman, 2006; Mortola e Toro-Velasquez, 2013):

$$\dot{V}O_2 = F_e(F_eO_2 - F_sO_2)$$

Onde:

F_e : Fluxo de entrada do ar

F_eO_2 : Fração de entrada de oxigênio

F_sO_2 : Fração de saída de oxigênio

Medidas de temperatura de preferência em gradiente térmico

Para avaliar a temperatura selecionada pelos animais após os tratamentos, foi utilizado um aparato com dois compartimentos completamente separados por uma parede (cada compartimento consistia de 195 cm de comprimento, 15 cm de largura e 20 cm de altura, Bonther, Ribeirão Preto, Brasil). As paredes do aparato e o assoalho de grade foram feitos de aço inoxidável e o teto feito de uma tampa de acrílico transparente que ajudava a

isolar a T_a dentro do gradiente. As extremidades foram aquecidas e resfriadas, respectivamente, por uma resistência elétrica (Novus, RS, Brasil) e por um banho de circulação externa com água resfriada e etileno-glicol (Polyscience, Il, EUA). Desse modo, foi gerado um gradiente linear de T_a entre 15 e 35°C (Almeida, et al., 2006a) monitorado por oito termopares distribuídos uniformemente sob o assoalho de grade. Para cada experimento (e para cada compartimento do gradiente) foi construída uma regressão linear entre a temperatura do ar vs a distância dos termopares em relação à resistência elétrica para confirmação da linearidade do gradiente térmico formado. Apenas R^2 iguais ou maiores que 0.93 foram aceitos. Uma webcam foi posicionada no topo do gradiente e programada para tirar fotos a cada 4 minutos ao longo do experimento. Baseado na posição dos animais obtida pelas fotos e na regressão linear, a temperatura de preferência foi calculada.

Protocolos Experimentais

Os experimentos foram realizados com animais não anestesiados que passaram por um dos protocolos abaixo.

1. Efeito da microinjeção intra MPA de antagonista de TRPV4 sobre a T_c de ratos expostos a 28°C:

Um rato de cada vez foi aclimatado a 28°C por cerca de 15 horas (*overnight*) e, em seguida, foi colocado em uma câmara (3L) para registro da T_c pré tratamento. Após 40 minutos, o animal recebeu uma injeção intra MPA de HC-067047 ou veículo e teve sua T_c registrada por mais 200 minutos.

2. Efeito da microinjeção intra MPA de antagonista de TRPV4 sobre T_c de ratos expostos a 21°C:

Esse protocolo foi semelhante ao descrito anteriormente com a diferença que os animais foram aclimatados a 21°C e mantidos a esta temperatura durante todo o experimento.

3. Efeito da microinjeção intra MPA de antagonista de TRPV4 sobre os termofetores autonômicos, termogênese e tônus vasomotor da cauda, a 28°C:

Nos mesmos animais aclimatados a 28°C por 15 horas, do protocolo 1, foram feitas medidas também de $\dot{V}O_2$ e IPC. Os registros pré-tratamento foram realizados durante os 40 minutos de aclimação dentro do respirômetro. Em seguida, o animal recebeu uma injeção

intra MPA de HC-067047 ou veículo e as mesmas variáveis foram monitoradas por mais 200 minutos.

4. Efeito da microinjeção intra MPA de antagonista de TRPV4 sobre a Ta de preferência:

Dois animais de cada vez foram aclimatados por aproximadamente 18 horas no gradiente (*overnight*; um em cada compartimento). Na manhã após o intervalo de aclimação, os ratos foram colocados individualmente em suas caixas por aproximadamente 20 minutos e receberam microinjeção intra MPA de HC-067047 ou veículo. Em seguida, os animais foram retidos por duas horas em uma porção do gradiente (~20cm) na qual a Ta variava de 28 a 30°C. Após a exposição a um ambiente de Ta moderadamente elevada, as barreiras que limitavam os animais foram retiradas e eles puderam selecionar livremente a Ta pelas próximas 4 horas.

Análise dos resultados

Os dados são apresentados como média \pm EPM. Os resultados obtidos foram analisados pelo teste de Kruskal Wallis ou por ANOVA de duas vias de medidas repetidas ou não seguidas por teste *post hoc* Holm-Šidák. A variância e a normalidade dos dados foram testadas e os dados foram transformados para *rank* ou log quando não atendiam aos requisitos da análise paramétrica. Foram consideradas diferenças significativas valores de $P < 0,05$. Os símbolos que denotam diferença estatística (*, # e †) foram utilizados apenas quando o teste *post hoc* foi capaz de detectar uma interação pontual entre os tratamentos.

3. RESULTADOS

Sítios de microinjeção na área pré-óptica medial

Na figura 1A pode ser observada uma fotomicrografia representativa de corte transversal do diencéfalo de um animal do grupo intra MPA. Na figura 1B estão apresentados esquemas de encéfalo de rato na região onde é localizada a MPA, mostrando a extensão das microinjeções do grupo intra MPA.

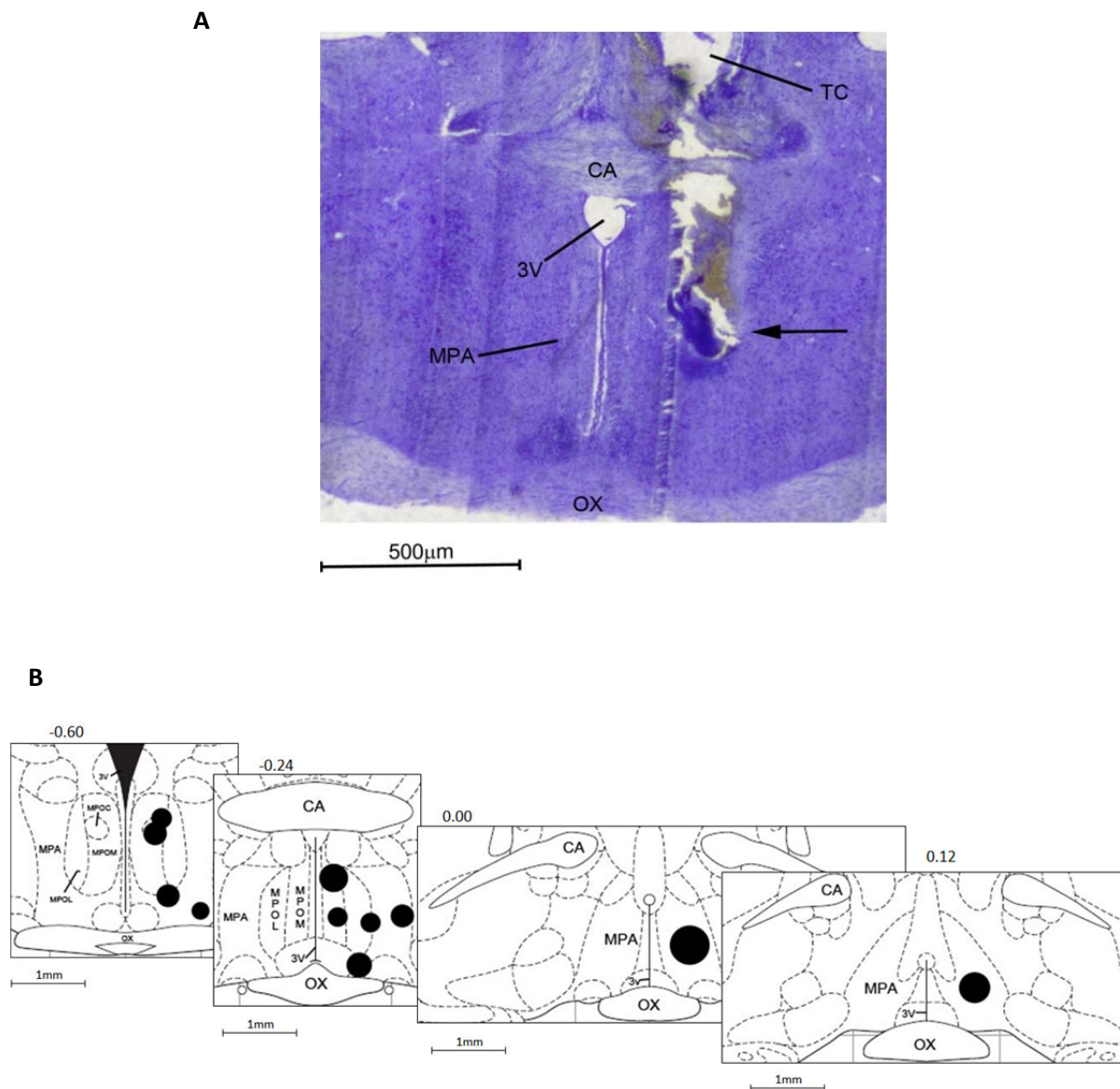


Fig. 1. A) Fotomicrografia de um corte transversal do encéfalo de um animal representativo mostrando o sítio típico de microinjeção (seta) na área pré-óptica medial (MPA). **B)** Figuras esquemáticas demonstrando a localização aproximada das microinjeções do grupo intra MPA. Os valores acima das figuras indicam a distância em milímetros em relação ao bregma. CA: comissura anterior; OX: quiasma óptico; TC: trajeto da cânula; 3V: terceiro ventrículo; MPA: área pré-óptica medial; MPOC: núcleo pré óptico medial, parte central; MPOL: núcleo pré óptico medial, parte lateral; MPOM: núcleo pré óptico medial, parte medial (esquemas adaptados do Atlas de Paxinos e Watson, 2005).

1. Efeito da microinjeção intra MPA de antagonista de TRPV4 sobre Tc de ratos expostos a 28°C

A Tc dos animais expostos a 28°C aumentou após a microinjeção em todos os grupos, como já reportado para injeções na área pré-óptica (Steiner et al., 2002a, 2002b, 2002c; Scarpellini et al., 2009), mas este aumento foi dependente do tratamento recebido. A Tc dos ratos que receberam injeção de 5ng/50nL de HC-067047 intra MPA foi maior ao longo do tempo do que a dos animais que receberam injeção de veículo ou de 0.5ng/50nL do antagonista na mesma região. Entretanto, a Tc não foi diferente do grupo controle quando a injeção de 5ng/50nL de HC-067047 era localizada em regiões adjacentes à MPA (peri MPA; interação entre tempo e tratamento: $p < 0.001$; $F_{3,24}=1.862$; Fig. 2).

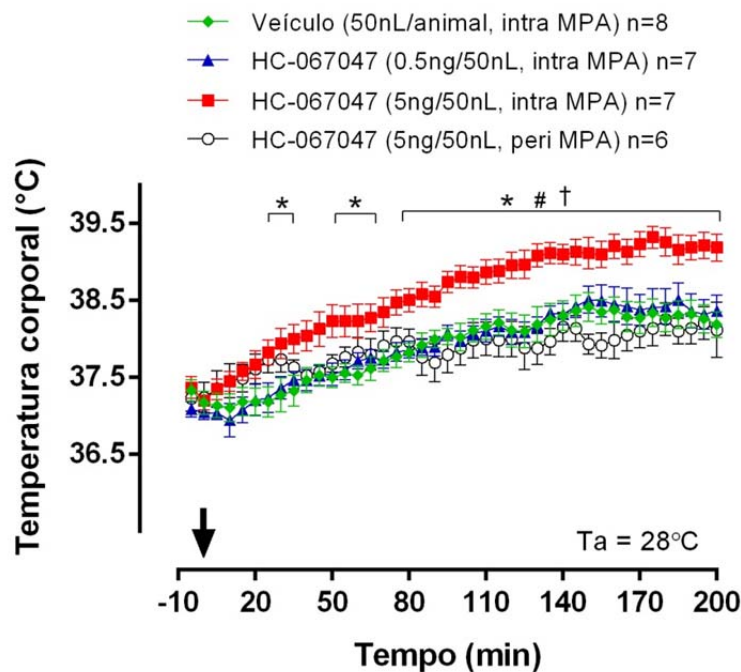


Fig. 2. Efeito da microinjeção de antagonista de TRPV4, HC-067047 (0.5 e 5 ng/50nL), ou veículo na área pré-óptica medial (MPA) sobre a temperatura corporal de ratos expostos a 28°C. A seta indica o momento da microinjeção. Intra MPA: microinjeção na MPA; peri MPA: microinjeção em sítios próximos à MPA. * = $p < 0.05$ para HC-067047 5ng/50nL intra MPA vs veículo; # = $p < 0.05$ para HC-067047 5ng/50nL intra MPA vs HC-067047 0.5ng/50nL; † = $p < 0.05$ para HC-067047 5ng/50nL intra MPA vs HC-067047 5ng/50nL peri MPA. Valores são expressos como média \pm EPM.

2. *Efeito da microinjeção intra MPA de antagonista de TRPV4 sobre Tc de ratos expostos a 21°C:*

A Tc dos animais expostos a 21°C também aumentou após a microinjeção em todos os grupos e este aumento foi dependente do tratamento recebido. Neste protocolo, uma dose ainda maior (75ng/kg; 25 ng/50nL) foi testada, mas seu efeito na Tc não diferiu dos outros grupos (interação entre tempo e tratamento: $p < 0.001$; $F_{3,24} = 1.93$. Fig. 3).

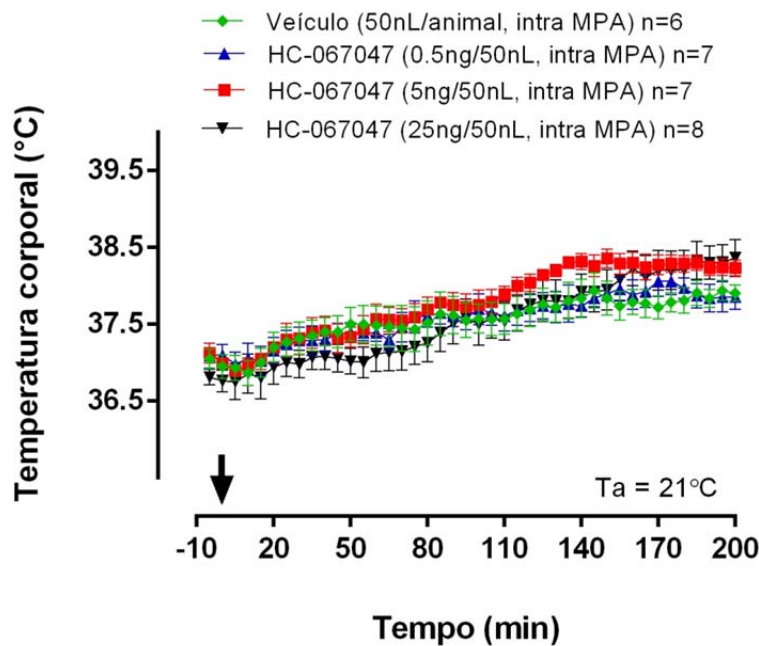


Fig. 3. Efeito da microinjeção de antagonista de TRPV4, HC-067047 (0.5, 5 e 25ng/50nL), ou veículo na área pré-óptica medial (MPA) sobre a temperatura corporal de ratos expostos a 21°C. A seta indica o momento da microinjeção. Intra MPA: microinjeção na MPA. Valores são expressos como média \pm EPM.

3. *Efeito da microinjeção intra MPA de antagonista de TRPV4 sobre os termofetores autonômicos, termogênese e tônus vasomotor da cauda, a 28°C:*

O consumo de oxigênio de todos os animais foi semelhante antes da microinjeção, entretanto o tratamento intra MPA com o antagonista na dose de (15ng/kg; 5ng/50nL) causou um aumento no $\dot{V}O_2$ dos animais até o final do experimento (interação entre tempo e tratamento: $p = 0.012$; $F_{2,19} = 3.851$; Fig. 4A). Quanto ao IPC, o índice não foi alterado por nenhum dos tratamentos, mas foi reduzido conforme a Tc aumentou (efeito da Tc: $p = 0.016$, $F_{2,19} = 2.873$; Fig. 4B). Imagens termográficas representativas do grupo controle e do grupo antagonista (5ng/animal) são apresentadas na figura 5.

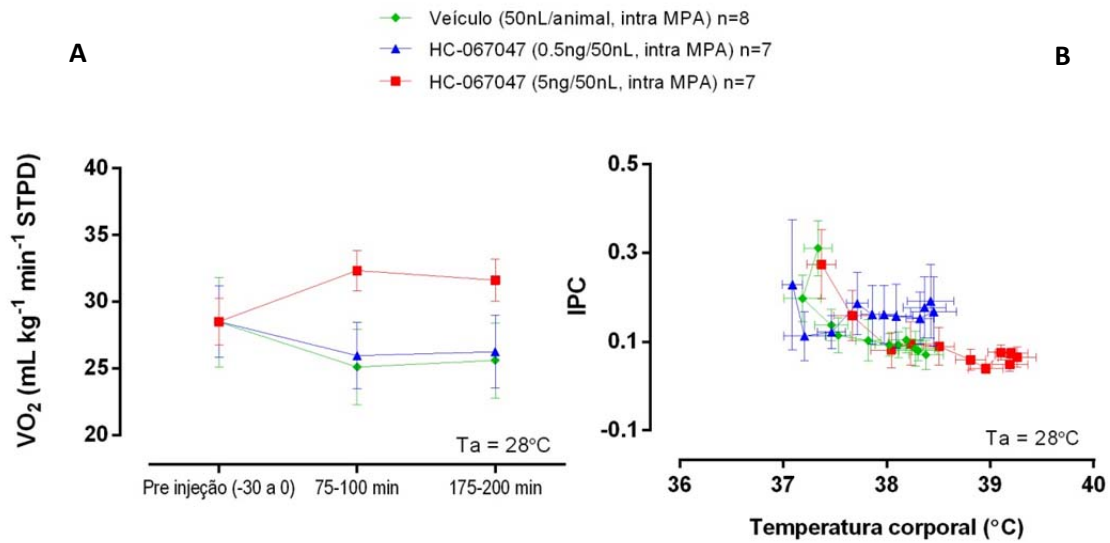


Fig. 4. Efeito da microinjeção de antagonista de TRPV4, HC-067047 (0.5 e 5ng/50nL), ou veículo na área pré-óptica medial (MPA) sobre o consumo de oxigênio (A) e o índice de perda de calor (B) em ratos expostos a 28°C . Intra MPA: microinjeção na MPA. Valores são expressos como média \pm EPM.

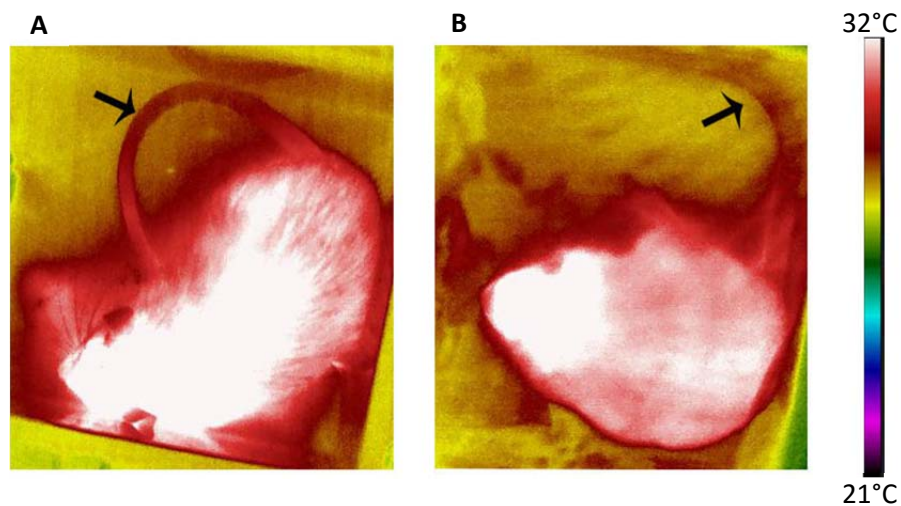


Fig. 5. Imagens termográficas infravermelho representativas do efeito da microinjeção de veículo (A) ou antagonista de TRPV4 (B), HC-067047 (5ng/50nL), na área pré-óptica medial (MPA) sobre a temperatura da cauda (um índice do tônus vasomotor) de ratos expostos a 28°C . As imagens foram registradas aproximadamente 90 minutos após a microinjeção na MPA. Note que as temperaturas da pele da cauda (seta) e do dorso do animal tratado com antagonista (B) parecem mais frias (vasoconstrição) em relação ao controle (A), entretanto este índice não foi alterado pelo tratamento.

4. *Efeito da microinjeção intra MPA de antagonista de TRPV4 sobre a Ta de preferência:*

Após a retenção no gradiente em uma região de temperatura moderada (28-30°C), os animais que receberam injeção de veículo procuraram por regiões mais frias comparados àqueles que tiveram os receptores TRPV4 da MPA antagonizados (HC-067047, 0.5ng/50nL; 1.5ng/kg). Estes últimos permaneceram por quase quatro horas em Tas parecidas às da região da restrição, enquanto os ratos do grupo controle selecionaram Tas próximas a 23°C (interação entre tempo e tratamento: $p = 0.01$. $F_{1,12} = 1.505$. Fig. 6). Uma imagem representativa do gradiente é mostrada na figura 7.

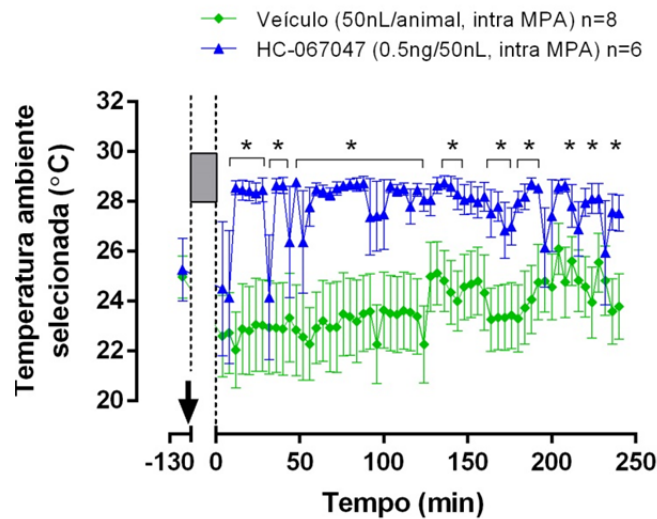


Fig. 6. Efeito da microinjeção de antagonista de TRPV4, HC-067047 (0.5ng/50nL), ou veículo na área pré-óptica medial (MPA) sobre a temperatura ambiente selecionada em ratos após terem sido restritos no gradiente entre 28 e 30°C por duas horas (indicado pela região cinza no gráfico). A seta indica o momento da microinjeção. Intra MPA: microinjeção na MPA. * = $p < 0.05$; Valores são expressos como média \pm EPM.

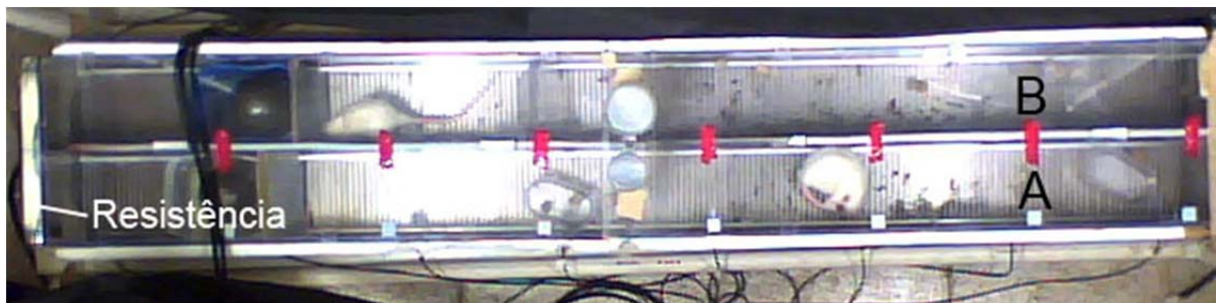


Fig. 7. Foto representativa de um experimento realizado no gradiente térmico para avaliação do efeito da microinjeção de antagonista de TRPV4, HC-067047 (0.5ng/50nL), ou veículo na área pré-óptica medial (MPA) sobre a temperatura ambiente selecionada pelos animais. O rato do compartimento A foi tratado com veículo enquanto o do compartimento B foi tratado com HC-067047. A foto foi tirada cerca de 100 minutos após os animais terem sido liberados da região de restrição. Note que o animal A (veículo) encontra-se em uma região mais fria (mais distante da resistência) comparado ao animal B (HC-067047).

4. DISCUSSÃO

Neste trabalho foi testado se o bloqueio químico dos TRPV4 da área pré-óptica medial alteraria a Tc de ratos e quais termofetores (autonômicos e/ou comportamentais) participariam desta resposta. Recentemente, descrevemos em animais não geneticamente modificados que a ativação dos TRPV4 na periferia acontece quando a Ta está entre 26 e 30°C e que tanto a taxa metabólica é reduzida quanto o IPC é aumentando, além do mecanismo comportamental de busca pelo frio ser ativado por estes receptores (Vizin et al., 2015). Entretanto, não se conhecia o papel dos TRPV4 hipotalâmicos na termorregulação. Com o uso de microinjeção de um antagonista seletivo para este canal (HC-067047, Everaerts et al., 2010) na MPA, demonstramos no presente estudo, pela primeira vez, que os receptores centrais participam da manutenção da Tc quando os animais são expostos a Tas moderadas (28-30°C) também por meio da modulação da taxa metabólica e do mecanismo comportamental.

Papel dos TRPV4 centrais no controle da Tc e os termofetores envolvidos

A Tc de todos os animais foi aumentada após a microinjeção como já era esperado (veja abaixo “*Críticas da metodologia*”), entretanto, no último terço dos experimentos dos protocolos 1 e 2 (135-200 minutos), a Tc dos animais mantidos a 28°C e tratados intra MPA com HC-067047 na dose de 5 ng/animal foi ainda maior, cerca de $0.87 \pm 0.03^\circ\text{C}$ mais alta que a dos animais controle (Fig. 2). Este efeito foi significativamente mais potente que aquele causado pela mesma dose e por outra cinco vezes maior (25 ng/animal) em animais mantidos no frio (teste de Kruskal-Wallis: $p < 0.001$): a 21°C, o HC-067047 5 ng/animal elevou a Tc em apenas $0.45 \pm 0.02^\circ\text{C}$ em relação ao grupo veículo e o HC-067047 25 ng/animal causou um aumento de $0.30 \pm 0.05^\circ\text{C}$ na Tc dos animais comparado ao grupo controle considerando o mesmo intervalo de tempo (Fig. 3).

Estes resultados mostram a participação dos TRPV4 hipotalâmicos na manutenção da Tc quando a Ta é moderadamente alta, respondendo então a primeira pergunta deste trabalho. Já que o efeito do antagonista foi mais evidente a 28°C, esta Ta foi escolhida para a realização dos experimentos do protocolo 3 que visava determinar quais efetores autonômicos (taxa metabólica e tônus vasomotor da cauda) estavam envolvidos no efeito do HC-067047. De forma similar ao descrito para os TRPV4 periféricos (Vizin et al., 2015), o antagonista administrado na MPA elevou a Tc via aumento da taxa metabólica (Fig. 4A) e

inibição do comportamento de busca por Tas mais frias (Fig. 6 e 7). O aumento do consumo de oxigênio induzido pelo bloqueio dos TRPV4 está de acordo com estudos recentes (Kusudo et al., 2012 e Ye et al., 2012) que demonstraram que camundongos *knock out* para TRPV4 e adipócitos isolados desta linhagem de animal apresentam maior $\dot{V}O_2$ comparado aos animais e células controle, respectivamente. É interessante notar que no caso de animais *knock out* todos os canais TRPV4 estão ausentes e não é possível diferenciar quais deles, centrais ou periféricos, estão envolvidos na ativação dos efetores termolíticos. Os resultados do presente estudo, junto com aqueles do nosso trabalho anterior (Vizin et al., 2015; ver capítulo anterior), indicam que ambos, centrais e periféricos, são importantes para as respostas autonômicas e comportamentais de perda de calor.

Em relação ao IPC, apesar da cauda e do dorso dos animais tratados com antagonista parecerem mais vasocontraídos (mais frios; Fig. 5B) comparados ao grupo veículo (Fig. 5A), este índice não foi modificado pelas doses de HC-067047 utilizadas, mas ele foi alterado de forma inversamente proporcional ao aumento da T_c (Fig. 4B). Pode-se então dizer que uma vasoconstrição (redução do IPC) aconteceu no decorrer dos experimentos de forma semelhante em todos os tratamentos, provavelmente como consequência da injeção na MPA.

A respeito do mecanismo comportamental, o bloqueio dos TRPV4 da MPA seguido pela exposição dos animais a Tas entre 28-30°C (por 2 horas) inibiu a busca por Tas mais frias como observado nos animais controle (= mecanismo comportamental de perda de calor. Figuras 6 e 7). Em 2002, Bícego e Branco ao verificarem que sapos cuja APO tinha sido lesada não apresentaram prejuízo no mecanismo comportamental de termorregulação em normotermia, mas exibiram reduzida busca por Tas mais quentes após a indução de febre por LPS, sugeriram que a APO é uma região importante também para o desenvolvimento da febre comportamental em ectotermos. Em contrapartida, Almeida e colaboradores mais tarde (2006b) não encontraram nenhuma diferença no mecanismo comportamental, entre ratos com ou sem lesão na APO, quando eles foram desafiados de quatro formas diferentes: administração de baixa ou alta dose de LPS e aplicação de mentol (agonista de TRPM8, indutor de busca por Tas quentes) ou resiniferatoxina (agonista de TRPV1, indutor de busca por Tas frias). Almeida e colaboradores (2006b) mostraram que, semelhantemente aos animais controle, os lesados buscaram por Tas quentes após tratamento com baixa dose de LPS ou mentol e procuraram Tas frias após receberem tratamento com altas doses de LPS (seguidas por Tas quentes) ou com resiniferatoxina. Estes autores sugeriram então que a APO

seria apenas importante para ativação de mecanismos autonômicos, mas não comportamentais, de controle da Tc, pelo menos em mamíferos. Nos dois trabalhos citados, de sapos e ratos, foi empregada lesão eletrolítica da APO que pode causar lesão não somente dos corpos celulares, mas também de fibras de passagem de neurônios provenientes de outras regiões encefálicas. Os resultados do presente estudo, por outro lado, indicam que, a manipulação farmacológica de receptores específicos na MPA, no caso dos TRPV4, pode revelar a participação dessa região na regulação de mecanismo comportamental, pelo menos de perda de calor.

Modelo proposto para o mecanismo de ação termolítica dos TRPV4 na MPA

De acordo com o modelo da via somatosensorial da termorregulação proposta por Nakamura e Morrison (2010), as informações detectadas na periferia pelos receptores de calor são enviadas ao corno dorsal da medula espinal de onde saem os neurônios de segunda ordem em direção ao núcleo parabraquial dorsal (LPBd) que, por sua vez, envia aferências a interneurônios glutamatérgicos do núcleo pré-óptico mediano (MnPO). Estes interneurônios ativam então os neurônios gabaérgicos da MPA que inibem o a rafe rostral e o hipotálamo dorso medial (DMH). Tal inibição reduz/bloqueia tanto a produção de calor independente quanto a depende de tremor, além de induzir vasodilatação levando, assim, à manutenção da Tc em ambientes quentes (ver esquema página 15). Baseado no modelo citado e nos resultados do presente trabalho, sugerimos então que os TRPV4 estejam localizados nos neurônios gabaérgicos da MPA e que o bloqueio químico deles reduz a taxa de despolarização destes neurônios já que o influxo de cátions por estes receptores está inibido. Desta forma, uma redução na liberação de GABA nos sítios caudais efetores deve ocorrer e então os mecanismos de produção/conservação de calor controlados por estas regiões são desinibidos, aumentando o consumo de oxigênio e, conseqüentemente, a Tc. Quanto ao mecanismo comportamental de busca pelo frio, sua via ainda não é estabelecida, mas pelos resultados aqui obtidos com o bloqueio dos TRPV4 hipotalâmicos e exposição do animal ao gradiente (Fig. 6 e 7), parece que ela também depende das eferências da MPA de forma semelhante aos mecanismos autonômicos. No entanto, estudos ainda são necessários para elucidar a via central do comportamento termorregulador.

Ainda, Shibasaki et al. (2007) demonstraram que os neurônios hipocampais de neonatos de camundongo são significativamente despolarizados a valores próximos ao limiar de ativação dos receptores NMDA (glutamatérgicos) quando mantidos em banho a 37°C

comparados aos neurônios de animais *knock out* para TRPV4. Neste mesmo sentido, um trabalho mais recente *in vitro* (Li et al., 2013), também com fatias de neurônios hipocâmpais de camundongos, mostrou que o antagonista HC-067047 atenuou o aumento na corrente pelo canal NMDA induzida por agonista de V4. Ambos os trabalhos mostram que o influxo de cátions pelos TRPV4 facilita a despolarização induzida por glutamato. Nossa sugestão então é que o bloqueio dos TRPV4, possivelmente localizados dos neurônios gabaérgicos da MPA, tenha comprometido a despolarização destes neurônios pela redução da entrada de cátions (como mencionado) e, principalmente, por dificultar a ação do glutamato vindo das eferências da MnPO. Já que o glutamato teria seu efeito reduzido nos neurônios gabaérgicos (por eles não estarem previamente facilitados), eles não seriam ativados e o GABA, por sua vez, não seria liberado no DMH nem na rafe rostral e então os mecanismos de produção/conservação de calor seriam desinibidos levando ao aumento da taxa metabólica e da Tc (e, talvez, ativação da procura por Tas mais frias), como observado no presente trabalho (Fig. 8, a legenda da figura está na página seguinte – pág. 77).

Ainda de acordo com o modelo de Nakamura e Morrison (2008), em ambiente frio a via somatossensorial é semelhante à descrita acima, com exceção que as aferências da medula espinal chegam ao LPB lateral (LPBl) e que a MnPO envia interneurônios gabaérgicos à MPA, inibindo então esta região, desinibindo o DMH e a rafe rostral e ativando os mecanismos de produção/conservação de calor. Neste sentido, nos nossos experimentos realizados a 22°C, a MnPO possivelmente estava inibindo a MPA, e então o bloqueio do TRPV4 numa região já previamente inibida resultou em um efeito pouco evidente na Tc.

Finalmente, um trabalho *in vitro* de Hori e colaboradores (1999) demonstrou que canais não seletivos para cátions ativados pelo calor modulam a taxa de disparo dos neurônios sensíveis ao calor na APO. Ainda não é possível dizer que os TRPV4 estejam dentre os canais sugeridos por Hori e colaboradores (1999) e que os neurônios sensíveis ao calor sejam os gabaérgicos citados por Nakamura e Morrison (2008, 2010), mas certamente trabalhos neste sentido são necessários e contribuiriam para a melhor compreensão da via sensorial térmica.

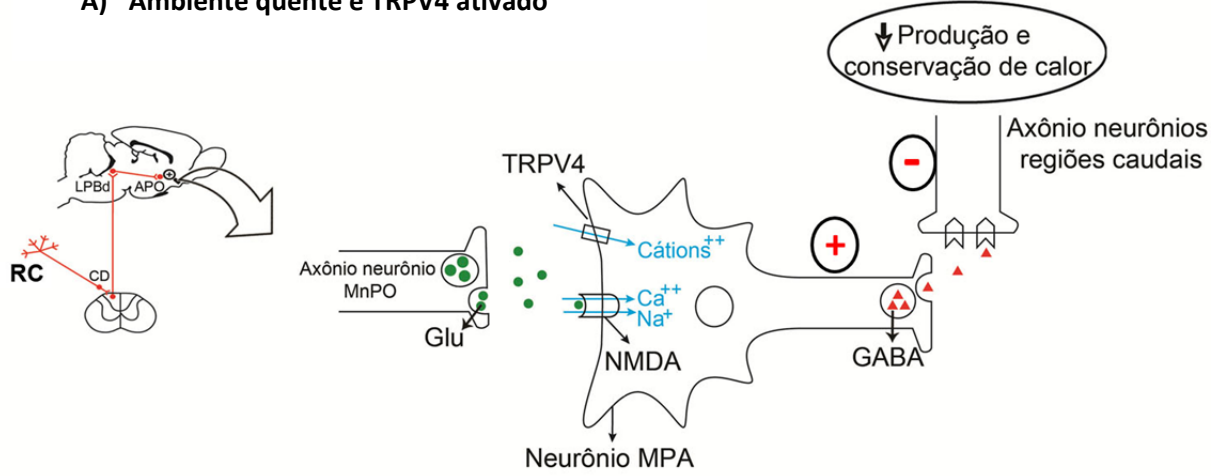
Desta forma, nossos resultados mostram pela primeira vez que o bloqueio dos TRPV4 da MPA aumenta a Tc via modulação da taxa metabólica e do mecanismo comportamental de busca pelo frio, sugerindo que estes receptores participam da manutenção da Tc quando a Ta é relativamente alta e que a MPA é necessária também para ativação da termorregulação comportamental, ao contrário do sugerido anteriormente. Ainda, o presente

trabalho propõe que os TRPV4 estejam localizados nos neurônios gabaérgicos da MPA, modulando a excitabilidade destes neurônios e, por sua vez, alterando a ação do neurotransmissor glutamato liberado pelas eferências do MnPO, de acordo com o modelo proposto por Nakamura e Morrison (2010). No entanto, ainda são necessários estudos para testarem esta hipótese.

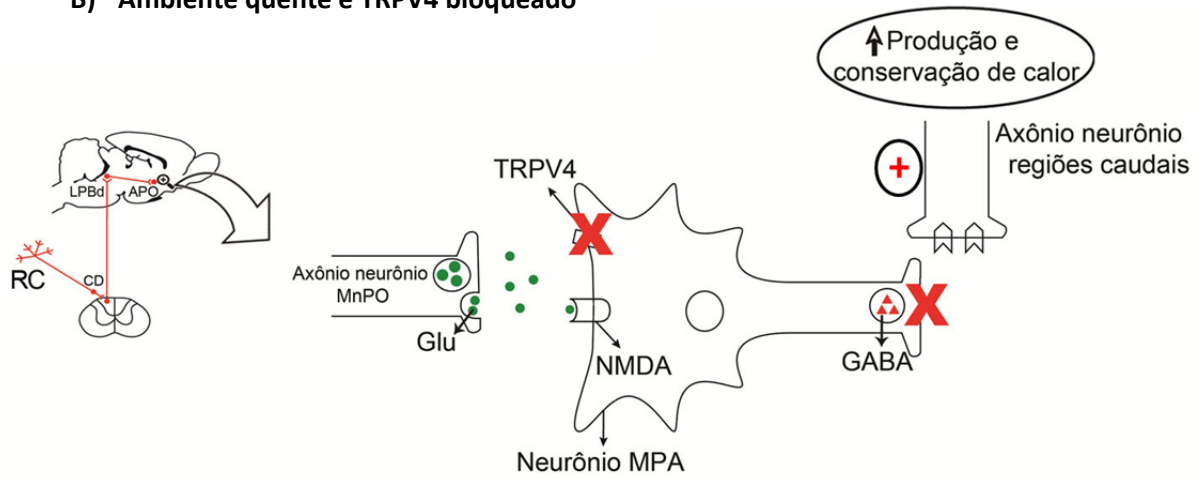
Críticas da metodologia

Apesar das limitações metodológicas, como o aumento da Tc mesmo nos animais controle (Steiner, et al., 2002a, 2002b, 2002c; Scarpellini, et al., 2009), a técnica da microinjeção é amplamente usada e vantajosa. Uma das vantagens é que por meio dela podemos estudar a especificidade de uma região. Por exemplo, no presente trabalho, juntamente com o uso de um volume reduzido (50 nL), a microinjeção nos permite dizer que apenas os receptores TRPV4 da MPA estão envolvidos com o controle da Tc, já que as injeções em regiões adjacentes (peri MPA) não tiveram resultado diferente do grupo controle, o que também sugere que a difusão da droga foi restrita. A respeito do aumento da Tc causado simplesmente pelo contato da agulha com a APO (aparentemente devido ao dano tecidual causado pela agulha), tal limitação, já mostrada em outros trabalhos (Steiner et al., 2002a, 2002b, 2002c; Scarpellini et al., 2009) pode ser contornada comparando-se os efeitos dos tratamentos com o respectivo grupo controle ao invés de compará-los apenas com suas próprias Tcs basais pré tratamento, exatamente como foi feito neste estudo. Ainda, é importante mencionar que, como a APO é altamente sensível à microinjeção, o uso de cânulas bilaterais dificultaria a interpretação dos resultados já que neste caso mesmo a injeção de veículo poderia aumentar a Tc em até 2°C (observações pessoais, dados não publicados), daí a escolha por cânulas unilaterais.

A) Ambiente quente e TRPV4 ativado



B) Ambiente quente e TRPV4 bloqueado



C) Ambiente frio e TRPV4 bloqueado

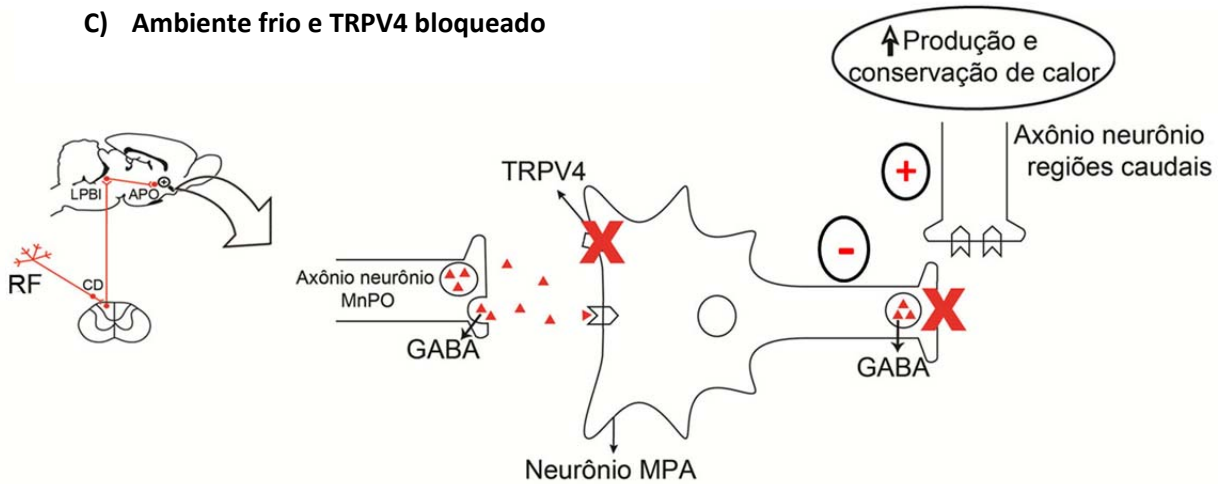


Fig. 8. Esquema do papel do TRPV4 no modelo previamente proposto por Nakamura e Morrison (2010) para a via somatossensorial do controle da Tc. É sugerido que o aquecimento do ambiente seja detectado pelos receptores de calor (RC) localizados nas terminações nervosas livres dos neurônios sensoriais primários e/ou nos queratinócitos. Este sinal é então transmitido ao corno dorsal (CD) da medula espinal e da medula ascendem ao núcleo parabraquial dorsal (LPBd) que, por sua vez, enviam aferências para a APO. Esta via é brevemente esquematizada do lado esquerdo das figuras A e B. Os neurônios do LPBd chegam ao núcleo pré-óptico mediano (MnPO) na APO que enviam aferências glutamatérgicas aos neurônios da área pré-óptica medial (MPA - esquematizado em maior aumento no centro da figura A e B). Quando o TRPV4 possivelmente localizado nos neurônios gabaérgicos da MPA está ativado (A), há um influxo de cátions por este receptor, aumentando o potencial de membrana do neurônio até um valor próximo ao limiar de abertura dos canais para glutamato, NMDA. Quando os canais para glutamato se abrem, um maior influxo de cátions é esperado, levando ao disparo do neurônio gabaérgico (indicado pelo sinal de +) que, por sua vez, inibe os neurônios das regiões caudais (indicado pelo sinal de -) causando uma redução na conservação e na produção de calor e resultando na manutenção da Tc. Em condições ambientais semelhantes, mas com o TRPV4 central bloqueado (B), o influxo de cátions para o neurônio gabaérgico é reduzido e a facilitação neuronal para o glutamato deixa de acontecer. Desta forma, o potencial de ação pode não ser disparado, o GABA provavelmente não é liberado pelo neurônio da MPA e os neurônios das regiões caudais são desinibidos (+), aumentando a produção e a conservação de calor, assim como a Tc. Já em ambientes frios (C), as informações térmicas são detectadas pelos receptores de frio (RF) localizados nas terminações nervosas livres dos neurônios sensoriais primários que enviam os sinais ao CD da medula espinal. Da medula, a informação segue para núcleo parabraquial lateral (LPBl) e de lá para a APO (esquema na lateral esquerda da figura C). O MnPO, quando estimulado pelo LPBl, envia aferências gabaérgicas à MPA, inibindo este neurônio (-) e desinibindo os neurônios das regiões caudais (+), mais uma vez aumentando a produção e a conservação de calor e regulando a Tc. Desta forma, o bloqueio dos canais TRPV4 em neurônios da MPA que já estavam inibidos devido às eferências gabaérgicas do MnPO resulta em discretas alterações da Tc.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

-
- ALMEIDA, M.C.; STEINER, A.A.; BRANCO, L.G.S.; ROMANOVSKY, A.A. Cold-seeking behavior as a thermoregulatory strategy in systemic inflammation. **Eur J. Neurosci.**, v. 23, p. 3359–3367, 2006a.
- ALMEIDA, M.; STEINER, A.A.; BRANCO, L.G.S.; ROMANOVSKY, A.A. Neural substrate of cold-seeking behavior in endotoxin shock. **Plos one** 1(1):e1, 2006b. doi:10.1371/journal.pone.0000001
- BÍCEGO, K.C.; BRANCO, L.G.S. Discrete electrolytic lesion of the preoptic area prevents LPS-induced behavioral fever in toads. **J Exp Biol.** v. 205, p. 3513–3518, 2002.
- BOULANT, J.A. Neural thermal reception and regulation of body temperature. In: Blatteis, C. (Ed.), **Physiology and Pathophysiology of Temperature Regulation**. World Scientific, Singapore, p.93–105, 1998.
- CATERINA, M.J. Transient receptor potential ion channels as participants in thermosensation and thermoregulation. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** v.292. p. R64–R76, 2007
- EVERAERTS, W.; ZHEN, X.; GHOSH, D.; VRIENS, J.; GEVAERT, T.; GILBERT, J.P.; HAYWARD, N.J.; MCNAMARA, C.R.; XUE, F.; MORAN, M.M.; STRASSMAIER, T.; UYKAL, E.; OWSIANIK, G.; VENNEKENS, R.; DE RIDDER, D.; NILIUS, B.; FANGER, C.M.; VOETS, T. Inhibition of the cation channel TRPV4 improves bladder function in mice and rats with cyclophosphamide-induced cystitis. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 107, p. 19084–19089, 2010.
- GÜLER, A.D.; LEE, H.; IIDA, T.; SHIMIZU, I.; TOMINAGA, M.; CATERINA, M. Heat-evoked activation of the ion channel, TRPV4. **J Neurosci.** v. 22, p. 6408–6414, 2002.
- HORI, A.; MINATO, K.; KOBAYASHI, S. Warming-activated channels of warm-sensitive neurons in rat hypothalamic slices. **Neurosci Lett**, v. 275, p. 93-96, 1999.
- KUSUDO, T.; WANG, Z.; MIZUNO, A.; SUZUKI, M.; YAMASHITA, H. TRPV4 deficiency increases skeletal muscle metabolic capacity and resistance against diet-induced obesity. **J Appl Physiol**, v. 7, p. 1223–1232, 2012.
- LEE, H.; IIDA, T.; MIZUNO, A.; SUZUKI, M.; CATERINA, M.J. Altered thermal selection behavior in mice lacking transient receptor potential vanilloid 4. **J Neurosci.** v. 25, p.1304–1310, 2005.
- LI, L.; QU, W.; ZHOU, L.; LU, Z.; JIE, P.; CHEN, L.; CHEN, L.; Activation of transient receptor potential vanilloid 4 increases NMDA-activated current in hippocampal pyramidal neurons. **Front Cell Neurosci.** v.7. 2013.

- LIGHTON, J.R.B. Flow-through respirometry: the equations. In: J.R.B. Lighton (ed.) **Measuring Metabolic Rates. A Manual for Scientists**. Oxford University Press, New York, NY. pp. 100–104. 2008
- MATSUDA, T., HORI T.; NAKASHIMA. T. Thermal and PGE2 sensitivity of the organun vasculosum lamina terminalis region and preoptic area in rat brain slices. **J. Physiol.** v.454, p.197–212, 1992.
- MORTOLA, J.P.; BESTERMAN, A. D. Gaseous metabolism of the chicken embryo and hatchling during post-hypoxic recovery. **Respir Physiol Neurobiol.** v. 156, p. 212–219, 2007
- MORTOLA, J.P.; TORO-VELASQUEZ, P.A. Ventilatory response to hypoxia of the 1-day old chicken hatchling after prenatal cold-induced hypometabolism. **Respir Physiol Neurobiol.**v.188, p. 161– 164, 2013.
- NAKAMURA, K. Central circuitries for body temperature regulation and fever. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** v.301. p. R1207–R1228, 2011.
- NAKAMURA, K.; MORRISON, S.F. A thermosensory pathway mediating heat-defense responses. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 107, p. 8848-8853, 2010
- NAKAMURA, K.; MORRISON, S. F. Preoptic mechanism for cold-defensive responses to skin cooling. **J Physiol.** v. 586 p. 2611–2620, 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.** v. 292, p. R127-R136, 2007.
- PATAPOUTIAN, A.; PEIER, A.M.; STORY, G.M; VISWANATH, V. ThermoTRP channels and beyond: mechanisms of temperature sensation. **Nat Rev Neurosci.** v.4, p. 529–539, 2003.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 5th ed. Elsevier Academic Press, San Diego, CA, 2005.
- ROMANOVSKY, A.A.; IVANOV, A.I.; SHIMANSKY, Y.P. Selected Contribution: Ambient temperature for experiments in rats: a new method for determining the zone of thermal neutrality. **J Appl Physiol.** v. 92, p. 2667–2679, 2002.
- SCARPELLINI, C.S.; BÍCEGO, K.C, TATTERSALL, G.J. Thermoregulatory consequences of salt loading in the lizard *Pogona vitticeps*. **J Exp Biol.** v. 218. p. 1166-1174. 2015.
- SCARPELLINI, C.S.; GARGAGLIONI, L.H.; BRANCO, L.G.S.; BÍCEGO, K.C. Role of preoptic opioid receptors in the body temperature reduction during hypoxia. **Brain Res.** v. 1286. p. 66-74. 2009.

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. **J Exp Biol**. v. 211, p. 1326-1335, 2008.

SHIBASAKI, K.; SUZUKI, M.; MIZUNO, A.; TOMINAGA, A. Effects of Body Temperature on Neural Activity in the Hippocampus: Regulation of Resting Membrane Potentials by Transient Receptor Potential Vanilloid 4. **J Neurosci**. v. 27. p. 1566 –1575. 2007.

STEINER, A.A.; ROCHA, M.J.A.; BRANCO, L.G.S. A neurochemical mechanism for hypoxia-induced anapnoea. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. v. 283. p. 1412-1422, 2002a.

STEINER, A.A.; RODRIGUES, J.A.; McCANN, S.M.; BRANCO, L.G. Antipyretic role of the NO-cGMP pathway in the anteroventral preoptic region of the rat brain. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. v. 282. p. 584-593. 2002b.

STEINER, A.A.; RODRIGUES, J.A.; BRANCO, L.G. Role of preoptic second messenger systems (cAMP and cGMP) in the febrile response. **Brain Res**. v. 944 p. 135-145. 2002c.

TATTERSALL, G.; MILSON, W.K.; ABE, A.; BRITO, S.; ANDRADE, D. The thermogenesis of digestion in rattlesnakes. **J Exp Biol**, v. 207, p.579-585, 2004.

TATTERSALL, G. J.; MILSON, W. K. Transient peripheral warming accompanies the hypoxic metabolic response in the golden-mantled ground squirrel. **J Exp Biol**, v. 206, p. 33–42, 2003.

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

WATANABE, H.; VRIENS, J.; SUH, S.H.; BENHAM, C.D.; DROOGMANS, G.; NILIUS, B.. Heat-evoked activation of TRPV4 channels in a HEK293 cell expression system and in native mouse aorta endothelial cells. **J Biol Chem**. v. 277, p.47044–47051, 2002.

YE, L.; KLEINER, S.; WU, J.; SAH, R.; GUPTA, R.K.; BANKS, A.S.; COHEN, P.; KHANDEKAR, M.J.; BOSTRÖM, P.; MEPANI, R.J.; LAZNIK, D.; KAMENECKA, T.M.; SONG, X.; LIEDTKE, W.; MOOTHA, V.K.; PUIGSERVER, P.; GRIFFIN, P.R.; CLAPHAM, D.E.; SPIEGELMAN, B.M. TRPV4 is a regulator of adipose oxidative metabolism, inflammation, and energy homeostasis. **Cell**. v. 151. p.96–110. 2012.

Capítulo III

Consequências termorreguladoras do aumento da osmolalidade plasmática em lagartos *Pogona vitticeps*

RESUMO

Alguns estudos demonstraram que a desidratação aumenta o limiar de temperatura para o ofego e diminui a preferência térmica de lagartos. No entanto, não é conhecido se respostas termorreguladoras como o *shuttling* (movimento de vai e vem entre áreas de menor e maior radiação solar) e o *gaping* (abertura da boca, semelhante ao ofego, sugerido como mecanismo de perda evaporativa de água) são influenciados da mesma forma pela falta de água. *Shuttling* é considerado um dos comportamentos termorreguladores mais efetivos ao passo que o *gaping* tem sido proposto prevenir o superaquecimento encefálico em lagartos. Neste estudo, nós avaliamos o efeito de injeções de salina hipertônica, um método usado para aumentar a osmolalidade plasmática, no *shuttling* e no *gaping* in *Pogona vitticeps*. Então, foi determinada a temperatura ambiente superior e inferior de escape (TaSE e TaIE, respectivamente), a porcentagem de tempo em que o animal ficava em *gaping*, a taxa metabólica ($\dot{V}O_2$), a perda evaporativa de água (PEA) durante intervalos de *gaping* e não-*gaping* e a efetividade evaporativa do *gaping* ($PEA/\dot{V}O_2$). Em todos os experimentos foram usadas injeções de salina isotônica (154mmol/L) e hipertônicas (625, 1250 ou 2500mmol/L). Apenas a concentração mais alta de salina hipertônica alterou o TaSE e TaIE, mas este efeito parece ter sido resultado da menor predisposição do animal em se movimentar, ao invés de uma redução direta nos *set-points* termorreguladores. Por outro lado, a porcentagem de tempo gasta em *gaping* foi proporcionalmente reduzida de acordo com a concentração de salina; $\dot{V}O_2$ também foi reduzido depois da injeção hipertônica. Imagens termográficas revelaram temperaturas da superfície da cabeça mais frias que as do corpo durante *gaping*; no entanto, esta diferença foi inibida depois do aumento nos níveis corpóreos de sal. Nossos dados sugerem que a $PEA/\dot{V}O_2$ é aumentada durante o *gaping*, possivelmente contribuindo para o aumento da transferência de calor do lagarto para o ambiente e desempenhando um papel importante no resfriamento da cabeça ou do encéfalo.

Palavras-chave: *gaping*, *shuttling*, taxa metabólica, perda evaporativa de água, resfriamento encefálico.

ABSTRACT

Previous research has demonstrated that dehydration increases the threshold temperature for panting and decreases the thermal preference of lizards. Conversely, it is unknown whether thermoregulatory responses such as shuttling and *gaping* are similarly influenced. Shuttling, as an active behavioural response, is considered one of the most effective thermoregulatory behaviours, whereas *gaping* has been proposed to be involved in preventing brain over-heating in lizards. In this study we examined the effect of salt loading, a proxy for increased plasma osmolality, on shuttling and *gaping* in *Pogona vitticeps*. Then, we determined the upper and lower escape ambient temperatures (UETa and LETa), the percentage of time spent *gaping*, the metabolic rate ($\dot{V}O_2$), the evaporative water loss (EWL) during *gaping* and non-*gaping* intervals and the evaporative effectiveness ($EWL/\dot{V}O_2$) of *gaping*. All experiments were performed under isotonic (154mmol l⁻¹) and hypertonic saline injections (625, 1250 or 2500mmol l⁻¹). Only the highest concentration of hypertonic saline altered the UETa and LETa, but this effect appeared to be the result of diminishing the animal's propensity to move, instead of any direct reduction in thermoregulatory set-points. Nevertheless, the percentage of time spent *gaping* was proportionally reduced according to the saline concentration; $\dot{V}O_2$ was also decreased after salt loading. Thermographic images revealed lower head than body surface temperatures during *gaping*; however this difference was inhibited after salt loading. Our data suggest that a $EWL/\dot{V}O_2$ is raised during *gaping*, possibly contributing to an increase in heat transfer away from the lizard, and playing a role in head or brain cooling.

Key words: *gaping*, shuttling, metabolic rate, evaporative water loss, brain cooling

LISTAS DE ABREVIACOES

CF	compartimento frio do <i>shuttle box</i> ;
CQ	compartimento quente do <i>shuttle box</i> ;
DVAe	densidade do vapor de água de entrada ($\mu\text{g H}_2\text{O ml}^{-1}$);
DVAs	densidade do vapor de água de saída ($\mu\text{g H}_2\text{O ml}^{-1}$);
Fe	fluxo de entrada (ml min^{-1});
FeCO ₂	fra�o de entrada de gás carbônico;
FeH ₂ O	fra�o de entrada do vapor de �gua;
FeO ₂	fra�o de entrada de oxigênio;
FsCO ₂	fra�o de saída de gás carbônico;
FsH ₂ O	fra�o de saída do vapor de �gua;
FsO ₂	fra�o de saída de oxigênio;
i.p.	inje�o intra peritoneal;
PC	produ�o de calor (J min^{-1});
PEA	perda evaporativa de água ($\text{mg H}_2\text{O min}^{-1}$);
RES	resfriamento encefálico seletivo;
STP	condi�es padrões de temperatura e pressão;
Ta	temperatura ambiente;
TaIE	temperatura ambiente inferior de escape (quando o lagarto saiu do compartimento frio em dire�o ao quente);
TaSE	temperatura ambiente superior de escape (quando o lagarto saiu do compartimento quente em dire�o ao frio);
Tc	temperatura corporal;
TEC	transferência evaporativa de calor (J min^{-1});
Tscabeça	temperatura da superfície da cabeça do lagarto;
Tscorpo	temperatura da superfície corporal do lagarto;
$\dot{V}O_2$	taxa metabólica ($\text{ml O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ STP}$);
PEA/ $\dot{V}O_2$	efetividade evaporativa do <i>gaping</i> (mg mL^{-1}).

1. INTRODUÇÃO

Todas as variáveis fisiológicas são direta ou indiretamente influenciadas pela temperatura corporal (Tc); desta forma, a manutenção da Tc é vital para o funcionamento fisiológico e bioquímico de um organismo. No entanto, a Tc não apenas influencia, mas também pode ser influenciada por outras variáveis ou sistemas fisiológicos. Considerando que os mecanismos termolíticos (perda de calor) mais eficientes são dependentes de água, como o ofego, o *gaping*, o suor e a salivação, é compreensível que o sistema osmorregulador seja um dos fatores que afetem a Tc. A ativação dos mecanismos evaporativos de perda de energia térmica leva à perda de água e, caso esta água não seja repostada, o animal pode entrar em um estado de desidratação. Durante este estado, o sistema osmorregulador é estimulado e, conseqüentemente, os efeitores que restabelecem os fluídos corporais são ativados, provavelmente inibindo aqueles efeitores termolíticos dependentes de água (McKinley et al., 2008). Como uma consequência do decréscimo na perda evaporativa de água (PEA), um aumento na Tc é esperado. De fato, a interação entre osmorregulação e termorregulação tem sido demonstrada para quase todos os grupos de vertebrados (Schmidt-Nielsen et al., 1957; Parmenter e Heatwole, 1975; Kleinhaus et al., 1985; Preest e Pough, 1989) e o aumento esperado na Tc durante a desidratação foi encontrado para muitas espécies de mamíferos, incluindo humanos, camelos, ungulados africanos, cabras, cães e ovelhas (Schmidt-Nielsen et al., 1957; Taylor, 1970; Baker, 1989; Baker e Turlejska, 1989; Jessen et al., 1998; McKinley et al., 2008). Anfíbios e répteis também têm suas preferências térmicas influenciadas pelo estado de hidratação (Malvin e Wood, 1991; O'Connor e Tracy, 1992; Ladyman e Bradshaw, 2003; Bradshaw et al., 2007), embora nestes casos, a Tc é reduzida pela seleção comportamental de ambientes com temperaturas mais frias. Evidências sobre o controle central da interação entre estes dois sistemas (osmorregulador e termorregulador) foram encontradas, em 1984, por Silva e Boulant quando eles descreveram que a atividade de neurônios sensíveis à temperatura em *slices* hipotalâmicos de ratos era alterada pela perfusão com salina hipertônica: alguns neurônios sensíveis ao aumento de temperatura eram excitados ao passo que outros eram inibidos pelo estímulo hipertônico.

Outros efeitos da osmorregulação na regulação da Tc foram encontrados em répteis, especialmente em animais de deserto ou que vivem em ambientes áridos. Parmenter e Heatwole (1975) demonstraram que um lagarto da família agamidae, *Pogona barbatus* (anteriormente, *Amphibolurus barbatus*), tem o limiar de ofego aumentado quando está

desidratado; o mesmo resultado foi observado por Dupré e Crawford (1986) em iguanas desidratadas (*Dipsosaurus dorsalis*). Nestes casos, era esperado que a T_c aumentasse já que o mecanismo de perda de energia térmica, no caso o ofego, é ativado apenas em temperaturas ambientes (T_a) mais elevadas. No entanto, estudos com a serpente *Notechis scutatus* (Ladyman e Bradshaw, 2003) e com o lagarto *Ctenophorus ornatos* (Bradshaw et al., 2007) demonstraram que estes animais selecionam T_a s mais baixas quando a água corporal é reduzida. Todos os estudos mencionados indicam que a água corporal é conservada à custa de uma fina manutenção da T_c quando os dois sistemas estão competindo.

Apesar do fato do estado de hidratação influenciar dois importantes termofetores em lagartos (ofego e a escolha pela T_a de preferência), não é claro se este estado modifica *set-points* termorreguladores para múltiplos termofetores, como o *shuttling* e o *gaping*. *Shuttling* em lagartos é uma forma ativa de termorregulação que consiste na procura por áreas mais ou menos quentes levando à regulação da T_c , sendo então, considerado um mecanismo comportamental relevante para ectotermos em geral, pois uma T_a ótima é raramente encontrada no campo. Tal comportamento é também muito bem descrito em laboratório (Berk e Heath, 1975; Barber e Crawford, 1979; Cadena e Tattersall, 2009a) e seu estudo tem sido considerado uma boa ferramenta para a compreensão da termorregulação e de seus custos em reptilianos (Cadena e Tattersall, 2009a). Quanto ao *gaping*, ele é descrito por uma abertura da cavidade bucal proporcional ao aumento da T_a , provavelmente aumentando a PEA e então contribuindo para a prevenção do superaquecimento encefálico (Spotila et al., 1977; Tattersall et al., 2006). Apesar de também envolver abertura bucal em resposta ao aumento da T_a , o ofego difere do *gaping* principalmente por duas características: no primeiro há aumento da frequência respiratória e diminuição do volume corrente, enquanto que no *gaping* aparentemente não há alteração na ventilação (Tattersall et al., 2006); e, o ofego normalmente tem início em T_a s extremas ou próximas a letais, enquanto o *gaping* geralmente se inicia em temperaturas próximas à T_a de preferência (Heatwole et al., 1973), possivelmente contribuindo para uma regulação fina da T_c (Tattersall e Gerlach, 2005). O *gaping* já foi descrito in *Pogona vitticeps*, uma espécie de lagarto da família Agamidae, naturalmente encontrado na Austrália central que, no campo, tem preferência por T_a s próximas a 33°C (Melville e Schulte, 2001). Em laboratório, já foi descrito para esta espécie que conforme a T_a aumenta, o tempo gasto em *gaping* é elevado (Tattersall e Gerlach, 2005), sugerindo, então, que a possível PEA induzida pelo *gaping* é aumentada de acordo com o aquecimento do ambiente. Além disso, o limiar para o *gaping* é diminuído durante a hipóxia (uma condição

conhecida por reduzir o *set point* da termorregulação e, então, ativar os mecanismos de perda de energia térmica em Tc mais baixas), reforçando a ideia de que o *gaping* atua como um mecanismo de perda de energia térmica (Tattersall e Gerlach, 2005). Além do *gaping*, os lagartos *P. vitticeps* também apresentam um comportamento de *shuttling* muito bem definido (Cadena e Tattersall, 2009a,b) e, por serem animais de deserto, provavelmente sofrem alguma hipernatremia plasmática sazonal como descrito para outros répteis australianos da família agamidae (Bradshaw e Shoemaker, 1967). Todas estas características fazem destes lagartos uma espécie ideal para estudar os fatores que podem influenciar o *gaping* e o *shuttling*. Desta forma, nós avaliamos: 1) o efeito da redução na disponibilidade de água corporal no *shuttling* e no *gaping*, dois termofatores extremamente importantes da regulação da Tc em lagartos de forma a verificar se a hiperosmolalidade afeta o controle termorregulador e, 2) a efetividade do *gaping* para a PEA quando os animais são expostos a altas Tas. Para tal, injeções de salina hipertônica foram usadas como um meio de induzir o decréscimo na disponibilidade de água corpórea (Rice, 1982; Baker e Dawson, 1985; Dupré e Crawford, 1986; Nagashima et al., 2001; Konishi et al., 2003; Bradshaw et al., 2007) e foi predito que: 1) animais tratados com injeções de salina hipertônica se movimentariam das áreas mais frias para as mais quentes e/ou das mais quentes para as mais frias no *shuttle box* em Tas mais baixas já que a hipersomolalidade tem sido associada com a diminuição da preferência térmica em ectotermos; 2) a porcentagem de tempo gasto em *gaping* seria menor depois das injeções de salina hipertônica e 3) o *gaping* seria uma relevante fonte de PEA.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Dezenove animais (9 fêmeas e 10 machos, *Pogona vitticeps* Ahl 1926; massa corporal: 200-500 g) foram aleatoriamente usados em quatro diferentes protocolos. Os lagartos eram acomodados em terrários que continham uma lâmpada de 40 W para termorregulação, uma lâmpada UV como fonte para síntese de vitamina D e enriquecidos com um tubo pequeno e opaco e abrigos feito de papelão. Os animais eram mantidos em ciclo claro:escuro de 12:12h (luzes acesas às 8am) e alimentados três vezes por semana com uma combinação de vegetais e frutas e duas vezes por semana com insetos (baratas), mas eles ficavam em jejum por, no mínimo, 48 horas antes dos experimentos. Os lagartos também recebiam um banho morno antes e depois de todos os experimentos e um banho extra uma vez por semana como forma de garantir que eles estavam hidratados, já que eles tinham a oportunidade de beber água durante o banho. O número de animais que bebiam água após os tratamentos foi contado para comparação do efeito dos tratamentos com as diferentes concentrações de solução salina. Os mesmos animais foram usados em quase todos os protocolos, mas eles tiveram, no mínimo, 14 dias de intervalo entre os experimentos. Todos os experimentos foram feitos entre 8:30 e 16:30 h e todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Uso e Cuidado Animal da Brock University (protocolo #12-11-01).

Injeções

Os lagartos receberam uma injeção isovolêmica (1 mL/100g) intra-peritoneal (i.p.) de salina isotônica (154mmol/L) ou hipertônica (625, 1250 e 2500mmol/L) de modo a induzir aumentos na osmolaridade plasmática estimados em 5, 10 e 20%, respectivamente. As três concentrações de salina hipertônica foram baseadas em estudo prévios (Konishi et al., 2003; Ford e Bradshaw, 2006) e em cálculos matemáticos (75% de água corporal, 50% de fluido extracelular e rápida mistura do sal com o plasma) assumindo que a osmolalidade basal para esta espécie era 308 mmol/L (Smits e Kozubowski, 1984).

Concentração plasmática

Para avaliar a concentração plasmática, amostras de sangue foram coletadas da veia caudal dos lagartos 1 hora após os tratamentos (injeções iso ou hipertônicas; 154, 625, 1250 ou 2500 mmol/L). O sangue foi coletado em tubos de vidro para microhematócrito e

centrifugado por 2 minutos para separação do plasma. O plasma foi estocado a 0°C e alíquotas de 10 µL (triplicatas) foram analisadas em um osmômetro (Vapro vapor pressure, Wescor, Inc, Logan, UT, USA).

Shuttle box

O *shuttle box* (Cadena e Tattersall, 2009a,b) era feito de uma caixa de madeira (119 x 61 x 45 cm) com dois compartimentos separados por uma divisória transparente. Havia uma abertura (11.5 x 14 cm) na parte inferior da divisória que conectava os dois compartimentos e possibilitava que o animal se movesse de um lado para o outro (comportamento de *shuttling*). As paredes eram posicionadas em forma de funil de modo a guiar os animais em direção à abertura da divisória, facilitando então o movimento de *shuttling*. Uma tampa transparente foi colocada no topo da caixa para ajudar a manter a temperatura interna e evitar qualquer interferência externa no comportamento do animal. Câmeras foram colocadas acima da tampa do *shuttle box* para contínua monitoração, mas nenhum dado foi coletado a partir delas.

No primeiro protocolo feito no *shuttle box*, um compartimento estava sempre 10°C mais quente que o outro, de forma que um foi chamado de CQ “compartimento quente” e o outro de CF “compartimento frio”. A temperatura dentro do *shuttle box* foi controlada por um pedal localizado no chão, logo abaixo da abertura que conectava os dois compartimentos. Pisando neste pedal, os lagartos regulavam a T_a e, conseqüentemente, suas próprias temperaturas corporais. Os animais eram colocados no CQ no início dos experimentos de modo a prevenir um longo intervalo de letargia se colocados no CF, já que estes animais tinham saído a pouco tempo da fase de repouso (fase escura) e as luzes dentro de seus terrários tinham sido acesas há cerca de 30 minutos, então suas T_{cs} ainda eram relativamente baixas.

Uma vez que os animais eram colocados no CQ, a temperatura em ambos os compartimentos automaticamente aumentava 0.7°C/min (Cadena e Tattersall, 2009a), mas sempre mantendo 10°C de diferença entre eles. A temperatura aumentava até que o animal se direcionasse para o CF, acionando o pedal e ativando o sistema de resfriamento. Neste momento, ambos os compartimentos eram resfriados a 0.7°C/min até que o animal voltasse ao CQ. A temperatura máxima permitida no CQ foi de 43°C e a mínima permitida no CF foi 10°C, como uma medida de segurança para os animais e porque estes valores estão além dos limites previamente conhecidos para a termorregulação nesta espécie (Cadena e Tattersall, 2009a).

Os sistemas de aquecimento e resfriamento eram controlados por sistemas eletrônicos automatizados produzidos na universidade (Brock University, Electronics Shop, St Catharines, ON, CA). A Ta foi medida por um termômetro em cada compartimento e registrada (bem como a localização do animal, CQ ou CF) pelo mesmo sistema eletrônico a cada 30 segundos ou sempre que o animal se movia de um lado para o outro. A Ta dentro do CQ quando o animal se movia do CQ para o CF foi chamada de TaSE (temperatura ambiente superior de escape) e a Ta dentro do CF quando o animal voltava do CF para o CQ foi nomeada TaIE (temperatura ambiente inferior de escape). Ao longo de um experimento, várias TaSE e TaIE eram registradas, indicando a frequência do *shuttling*. As Tas de escape refletem de forma acurada as mudanças na Tc desta espécie, sendo então, um método apropriado para descrever o comportamento termorregulador dos lagartos (Cadena e Tattersall, 2009a).

No segundo protocolo feito no *shuttle box* não havia diferença entre as temperaturas dos compartimentos. Ambos os lados tiveram a Ta fixa a 34°C (Ta de preferência em laboratório para esta espécie; Cadena e Tattersall, 2009a) ao longo de todo o experimento e, então, foi registrado o número total de movimentos espontâneos entre os compartimentos produzidos sem estímulo termorregulador (veja abaixo).

Protocolo 1: O objetivo deste protocolo foi examinar se o controle termorregulador era alterado em lagartos com alta concentração corpórea de sal. As primeiras 3 horas depois do animal ser colocado no *shuttle box* foram consideradas como *shuttling* exploratório normalmente exibido durante a habituação a um novo ambiente e, então, não foram usadas para as análises (Cadena e Tattersall, 2009a). Depois deste intervalo, os animais receberam uma injeção intraperitoneal (i.p.) de salina isotônica (154 mmol/L) ou hipertônica (1250 ou 2500 mmol/L) e foram colocados novamente no *shuttle box*, por mais 4 horas, no mesmo compartimento em que eles estavam antes das injeções. A análise dos resultados levou em conta as TaSE e TaIE e o número de *shuttles* que aconteceram após as injeções. Para este experimento, 11 animais foram injetados com todas as três concentrações de salina.

Protocolo 2: Este protocolo foi proposto de modo a examinar se as injeções salinas interferiam na predisposição natural dos animais em se moverem e se comportarem espontaneamente. Neste experimento, os animais receberam uma injeção i.p. de solução salina (154 ou 2500 mmol/L) no início da manhã e foram imediatamente colocados no *shuttle box*. A razão pela qual a injeção foi feita de manhã foi aproveitar a tendência natural dos animais em explorar o novo ambiente. Estudos anteriores mostraram que após o intervalo exploratório, os lagartos geralmente param o *shuttling* inteiramente quando não há estímulo termorregulador

(Cadena e Tattersall, 2009a). O experimento durou 4 horas e apenas o número de *shuttling* foi analisado. Quatorze animais foram utilizados neste protocolo e todos receberam ambas as concentrações de salina.

Gaping

Os lagartos foram colocados em uma caixa de acrílico (24 x 24 x 40 cm) que tinha três dos quatro lados cobertos com papel pardo para reduzir o reflexo dos animais nas paredes. Em cima da caixa foi colocada uma câmera de imagem termográfica (Mikron 7515, Oakland, NJ, USA) que, juntamente com o respectivo software MikroSpec RT[®] (Mikron), foram usados para monitorar a temperatura da superfície da cabeça (Tscabeça) e a do corpo (Tscorpo). Duas imagens termográficas representativas usadas para calcular a Tscabeça e a Tscorpo podem ser observadas nas figuras 4a e 4b. A caixa de acrílico foi posicionada em uma câmara com temperatura controlada (Thermo Forma, Marietta, OH, USA) de modo que a Ta dentro da caixa fosse mantida dentro de uma faixa estreita (37-39°C: suficientemente alta para induzir *gaping* nesta espécie; Tattersall e Gerlach, 2005). Uma webcam foi incorporada à parede interna da câmara de temperatura controlada, em frente ao único lado da caixa de acrílico que não estava coberto com papel. Imagens dos lagartos foram coletadas pela webcam a cada 10 segundos (HandyAvi; Tempe, AZ, USA) e usadas para avaliar a porcentagem de tempo gasta em *gaping*. Estes experimentos foram conduzidos para avaliar se a salina hipertônica influenciava o comportamento de *gaping* dos lagartos. A câmera de termografia permitiu que a Tscorpo fosse monitorada e quando ela alcançava no mínimo 37°C (normalmente 3-4 horas após os animais serem colocados dentro da caixa de acrílico) os lagartos recebiam uma injeção i.p. de solução salina (154, 625, 1250 ou 2500 mmol/L) e eram colocados novamente na caixa para observação pelas próximas 3.5 horas. A injeção i.p. aconteceu antes que a câmara de temperatura controlada atingisse seu equilíbrio térmico completo porque este processo era bem lento. A porcentagem de tempo gasta em *gaping* foi analisada a partir das imagens da webcam (a porcentagem do tempo foi estimada em intervalos de 30 minutos) antes e após a injeção. Onze animais foram usados neste protocolo para cada concentração da solução salina.

Consumo de oxigênio

O consumo de oxigênio e a perda evaporativa de água (PEA) foram inferidos por meio de um sistema de respirometria aberta. O animal foi colocado em um respirômetro

cilíndrico (2.8 L) dentro de uma câmara de temperatura controlada (Sable Systems, Las Vegas, NV, USA) que manteve a T_a dentro do respirômetro a 37.5°C . Um fluxo contínuo de ar seco foi mantido na câmara experimental (*pull mode*) a uma taxa de 1000 mL/min, mas apenas uma subamostra (180 mL/min) deste ar foi enviada aos analisadores de H_2O , CO_2 e O_2 (FlowBat-8; Sable Systems, NV, USA). O ar foi seco por meio do uso de tubos Nafion que extraía o vapor de água a partir de um sistema de contracorrente (nitrogênio puro foi usado para extrair o vapor de água). A densidade do vapor de água (DVA, $\mu\text{g/mL}$) foi a primeira variável analisada (RH200; Sable Systems) e, posteriormente, foi utilizada para calcular a perda evaporativa de água (PEA). Então, a porcentagem de CO_2 (CA-2A, Sable Systems) e, finalmente, a porcentagem de O_2 foram registradas (FC-1B; Sable Systems). Uma amostra de *baseline* (o ar que entrava no respirômetro) foi registrada por 5 minutos a cada 25 minutos de registro do ar que saía do respirômetro. Amostras do *baseline* foram registradas para monitorar a constância da água e da porcentagem de O_2 e CO_2 no ar oferecido ao animal ao longo do experimento e para que a FiO_2 , FiCO_2 e FiH_2O fossem calculadas. Um distribuidor múltiplo de gases (RM8 Intelligent Multiplexer; Sable Systems) foi utilizado para controlar qual amostra de gás (do respirômetro ou do *baseline*) seria enviada aos analisadores. Os dados foram coletados a cada segundo por um sistema de aquisição apropriado (AcqKnowledge v.3.8.1, BIOPAC Systems, Goleta, CA, USA). A temperatura dentro da câmara onde ficava o respirômetro foi monitorada por um termopar (TC-2000; Sable Systems, Las Vegas, NV, USA) e a temperatura do animal foi medida usando um sensor armazenador de temperatura (iButtons DS1922L, Maxim Integrate, San Jose, CA), fixado a sua superfície ventral com fita médica (Transpore, 3M). Os analisadores foram calibrados semanalmente ou sempre que necessário. O analisador de O_2 foi calibrado diariamente antes dos experimentos, usando nitrogênio como “zero” e ar seco (20.95%) como “span”; o analisador de CO_2 foi também calibrado com nitrogênio puro como “zero” e uma mistura de 1% de CO_2 como “span” e, por último, o analisador de H_2O foi também calibrado usando nitrogênio puro como “zero” e o valor estimado da DVA usado como “span” foi obtido borbulhando-se ar em um recipiente com água de temperatura conhecida (Dossat e Horan, 2001). O $\dot{V}O_2$ (ml O_2 /min STP) e a PEA (mg H_2O /min) foram calculadas usando as seguintes equações (Lighton, 2008):

$$\dot{V}O_2 = FR_e \left[F_e O_2 - \left(F_s O_2 \frac{1 - F_e O_2 - F_e CO_2 - F_e H_2O}{1 - F_s O_2 - F_s CO_2 - F_s H_2O} \right) \right] \quad (1)$$

$$PEA = \frac{[FR_e (DVA_e - DVA_s)]}{1000} \quad (2)$$

Onde:

FR_e : Fluxo de entrada do ar;

F_eO_2 : Fração de entrada de oxigênio (do *baseline*);

F_sO_2 : Fração de saída de oxigênio;

F_eCO_2 : Fração de entrada de gás carbônico (do *baseline*);

F_sCO_2 : Fração de saída de gás carbônico;

F_eH_2O = Fração de entrada do vapor de água (do *baseline*);

F_sH_2O = Fração de saída do vapor de água;

DVA_e = Densidade do vapor de água de entrada ($\mu\text{g H}_2\text{O/mL}$);

DVA_s = Densidade do vapor de água de saída ($\mu\text{g H}_2\text{O/mL}$);

Assumindo que 1 mL de oxigênio consumido produz 20 J de calor e que para cada miligrama de água evaporada, 2.5 J são dissipados, então a produção de calor (PC, J/min) e a transferência evaporativa de calor (TEC; J/min) também foram calculadas (Randall et al., 1997):

$$PC = \dot{V}O_2 \times 20 \quad (3)$$

$$TEC = PEA \times 2.5 \quad (4)$$

O objetivo destes experimentos era examinar as mudanças globais no consumo de oxigênio e na perda de água corporal durante intervalos espontâneos de *gaping* e não-*gaping*, antes e depois de injeções de salina isotônica (154 mmol/L) ou hipertônica (625 mmol/L). Neste protocolo, os animais também eram colocados na caixa de acrílico dentro da câmara com temperatura controlada até que a T_{scorpo} alcançasse 37°C (monitorada com a câmara termográfica). Em seguida, os animais eram transferidos para o respirômetro de vidro e colocados dentro de outra câmara com temperatura controlada conectada ao sistema de respirometria. O consumo de oxigênio e a PEA foram registrados por 90 minutos antes das injeções, então uma das concentrações de solução salina (154 ou 625 mmol/L) foi aplicada e as variáveis foram novamente registradas por mais 90 minutos. A porcentagem do tempo gasto em *gaping* foi analisada durante os últimos 30 minutos antes da transferência para o

respirômetro e durante todo o tempo que os animais estiveram dentro do respirômetro (=180min; dados não mostrados). A temperatura da superfície ventral dos animais foi registrada durante todo o experimento por meio dos sensores armazenadores citados acima. Oito animais foram usados neste protocolo para cada concentração da solução salina.

Análise estatística

Todos os resultados são apresentados como média \pm EPM. A osmolalidade plasmática estimada e os valores encontrados foram analisados por regressão linear e a proporção de lagartos que beberam água depois dos tratamentos foi analisada usando teste de qui-quadrado. Protocolo 1: anova de duas vias de medidas repetidas (fatores: direção – TaSE ou TaIE – e tratamento) foi usada para comparar o efeito dos tratamentos na TaSE e TaIE e anova de uma via de medidas repetidas foi usada para comprar o número de *shuttles* entre os tratamentos. Protocolo 2: os resultados foram analisados usando teste *t* pareado para comparar o número de *shuttles* entre os tratamentos.

Anova de duas vias de medidas repetidas foi utilizada para analisar o efeito das concentrações de solução de salina, ao longo do tempo, na porcentagem de tempo gasto em *gaping*, na Tscabeça, na Tscorpo e na diferença entres estas duas últimas variáveis (Tscabeça – Tscorpo). Teste *t* pareado foi usado para comparar PEA e $PEA/\dot{V}O_2$ entre intervalos de *gaping* e não-*gaping* e o respectivo teste para dados não paramétricos (Wilcoxon signed-rank test) foi usado para comparar os dados de $\dot{V}O_2$ (tabela 1). Apenas intervalos de *gaping* maiores que 15 segundos foram utilizados para a determinação do $\dot{V}O_2$ e dos valores de PEA. Teste *t* também foi feito para analisar o efeito da injeção salina na %PEA e na % $\dot{V}O_2$ (valores pós-injeção comprados com pré-injeção) e o respectivo teste para dados não paramétricos (Mann–Whitney rank sum) foi utilizado para analisar os dados de $PEA/\dot{V}O_2$ (tabela 2).

Sempre que a anova de medidas repetidas resultou em efeitos ou interações significativos, o teste *pos hoc* de Holm–Šidák foi feito para verificar onde estavam as diferenças. Os resíduos foram testados para variância e normalidade. Os dados foram transformados para log ou *rank* quando não atendiam às premissas para análises paramétricas. Diferenças foram consideradas significantes quando $p \leq 0,05$. Todas as análises foram feitas em um software adequado.

3. RESULTADOS

Osmolalidade plasmática e consumo de água

Os aumentos na osmolalidade plasmática foram muito similares àqueles preditos por nossos cálculos matemáticos. As concentrações de salina hipertônica, 625, 1250 e 2500mmol/L aumentaram a osmoconcentração plasmática em aproximadamente 7, 12 e 22%, respectivamente, comparado com o grupo controle (154mmol/L), resultando em uma alta relação linear entre a osmolalidade plasmática medida e os valores esperados ($r^2=0,95$; $p<0,001$; $y=1,0886x - 4,4073$; dados não mostrados). A proporção de animais que consumiram água foi altamente influenciada pela quantidade de sal dos tratamentos recebidos (χ^2 (3, $N=114$) =45,65, $p< 0,001$). Dos animais controle (154mmol/L) apenas 5 dos 38 animais beberam água após os experimentos (13%); para a concentração de 625mmol/L, 6 de 19 consumiram água (31%); para a concentração de 1250mmol/L, 14 de 22 animais beberam água (63%) e para a concentração mais alta (2500mmol/L), 31 de 35 beberam água (88%).

Efeito das injeções de salina hipertônica no comportamento de shuttling

A injeção de 1250 mmol/L de salina hipertônica não teve efeito na temperatura ambiente superior de escape (TaSE; $p=0,882$) nem na inferior de escape (TaIE; $p=0,357$) comparado aos animais controle (Fig. 1a). No entanto, a concentração mais alta (2500 mmol/L) aumentou a TaSE e diminuiu a TaIE (interação direção vs tratamento: $p<0,001$; $F_{2,30}=18,116$; Fig. 1a) além de diminuir o número de *shuttles* (efeito do tratamento: $p=0,01$; $F_{2,30}=5,463$; Fig. 1b) em relação à injeção de salina isotônica.

Para verificar se o aumento nos níveis de sal corpóreo afetava a predisposição ao movimento, um experimento similar foi feito no *shuttle box* a Ta constante de 34°C. Neste protocolo, apenas a concentração mais alta de salina hipertônica e a controle foram usadas porque a outra concentração (1200 mmol/L) não teve efeito na TaSE nem na TaIE (Fig. 1a). A injeção de salina hipertônica reduziu a quantidade de *shuttles* exploratórios ($p=0,004$; Fig. 1c)

Efeito das injeções de salina hipertônica no gaping

O aumento no nível de sal plasmático diminuiu a pré-disposição para o *gaping* nos lagartos de forma dose e tempo dependente (interação de tempo vs tratamento: $p< 0,001$. $F_{3,40} = 5,498$; Fig. 2a,b). As duas concentrações mais altas de salina hipertônica (1250 e 2500 mmol/L) reduziram o *gaping*, no mínimo, em 90% ao final dos experimentos comparado com

os valores obtidos pré-tratamento ao passo que a menor concentração utilizada (625 mmol/L) diminuiu o *gaping* em 50% (Fig. 2a).

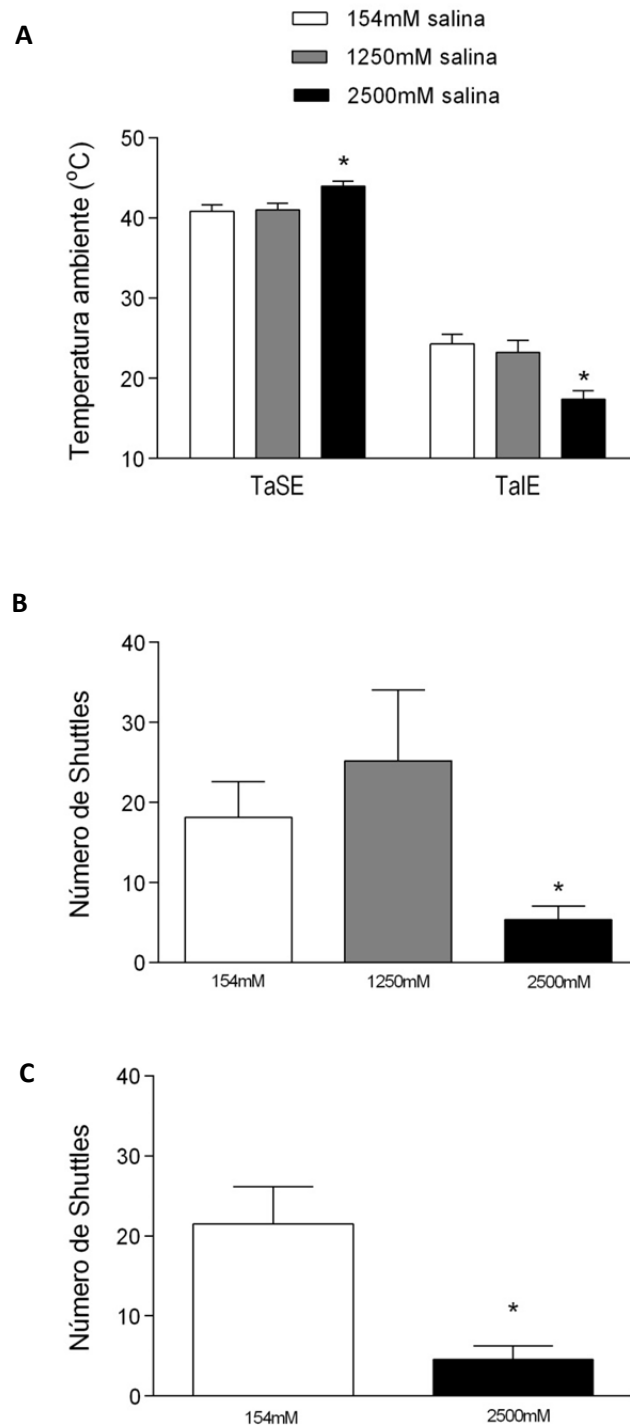


Figura 1. Efeito da injeção de salina hipertônica na T_aSE e T_aIE e no número de *shuttles* no lagarto *Pogona vitticeps*. (A) T_aSE, temperatura ambiente média na qual o animal saiu do compartimento quente. T_aIE, temperatura ambiente média na qual o animal saiu do compartimento frio. (B) Número de *shuttles* quando os animais eram colocados no *shuttle box* com temperaturas ambientes variáveis. Resultados de A e B são do protocolo 1. Número de animais = 11 para todos os grupos. (C) Número de *shuttles* quando os compartimentos do *shuttle box* tinham temperatura ambiente constante (34°C; protocolo 2). Número de animais = 14 para todos os grupos. *p<0,05, efeito do tratamento.

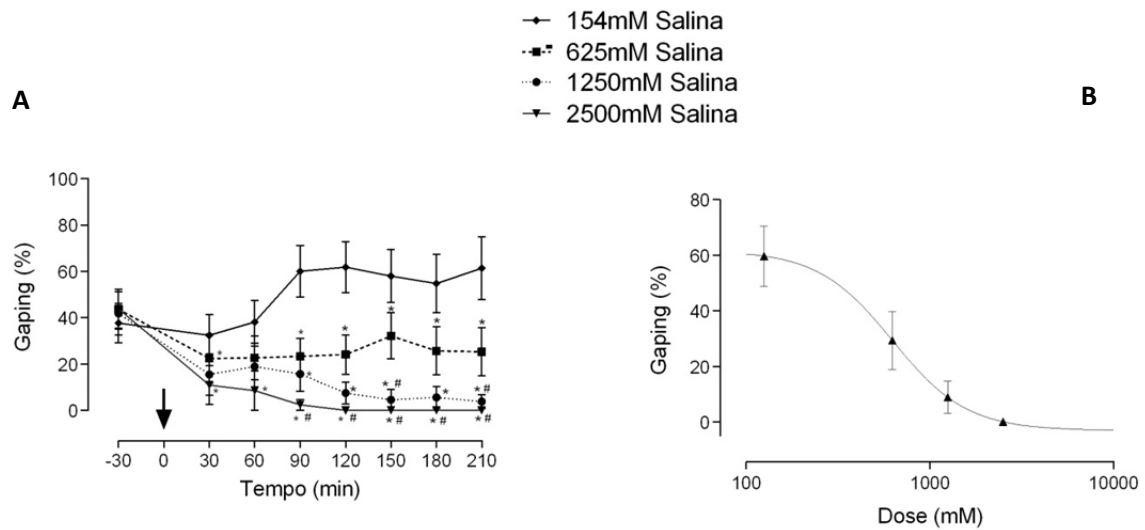


Figura 2. Efeito (A) e dose resposta (B) da injeção de salina hipertônica na porcentagem de tempo gasto em *gaping* em *P. vitticeps* expostos a 37–39°C. A seta indica o momento da injeção. N=11 para todos os tratamentos. *p<0,05 comparado com a concentração controle. ‡p<0,05 comparado com o grupo 625 mmol/L.

Efeito das injeções de salina hipertônica nas temperaturas da superfície da cabeça e do corpo

As temperaturas das superfícies do corpo (T_{scorpo}) e da cabeça ($T_{\text{scabeça}}$) foram registradas durante os experimentos de *gaping* do protocolo descrito acima (Fig. 3a-c). A $T_{\text{scabeça}}$ aumentou significativamente após a injeção com a concentração mais alta de salina hipertônica (2500 mmol/L) comparada com o grupo controle e o grupo 625 mmol/L; o aumento na $T_{\text{scabeça}}$ dos animais tratados com injeções de 625 mmol/L foi maior que o dos animais controle (interação tempo vs tratamento: $p=0,003$; $F_{2,17}=2,57$; Fig. 3a). O aumento no nível de sal plasmático após o tratamento com a concentração mais alta causou um aumento na T_{scorpo} dos lagartos comparado com os controles (interação tempo vs tratamento: $p=0,002$; $F_{2,17}=2,78$; Fig. 3b), mas não houve diferença entre os tratamentos 625 e 2500 mmol/L.

Além disso, o grupo controle e os animais tratados com a concentração mais baixa de salina hipertônica (625 mmol/L) exibiram uma $T_{\text{scabeça}}$ significativamente mais baixa que a T_{scorpo} comparado com aqueles animais que receberam injeção com a maior concentração de salina hipertônica (2500 mmol/L; efeito do tratamento: $p=0,005$; $F_{2,17}=7,362$; efeito do tempo: $p=0,192$; $F_{2,17}=1,449$; sem efeito de interação: $p=0,559$; $F_{2,17}=0,901$; Fig. 3c e Fig. 4a, b). Os animais que receberam o tratamento de 2500 mmol/L tiveram a $T_{\text{scabeça}}$ e a T_{scorpo} muito semelhantes após as injeções (Fig. 3c e 4b).

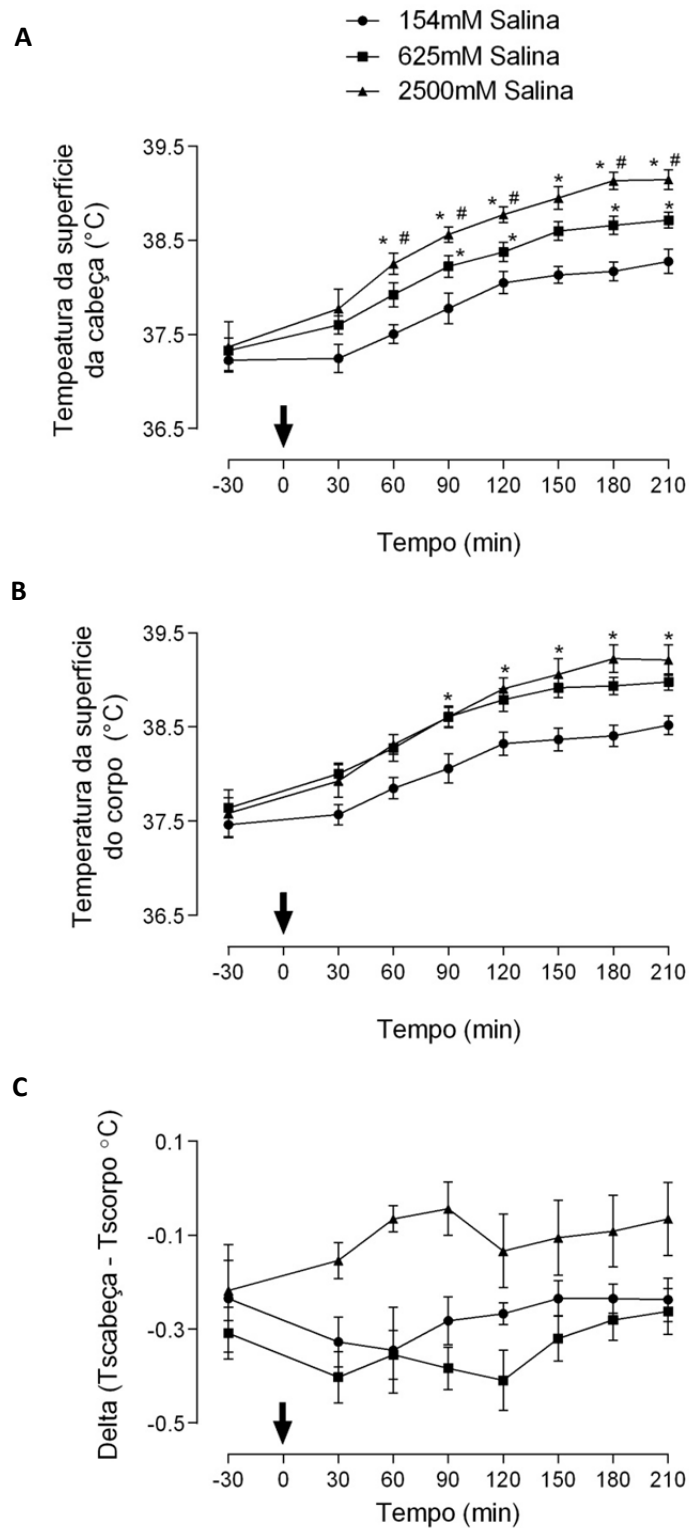


Figura 3. Efeito da injeção de salina hipertônica na (A) temperatura da superfície da cabeça e na (B) temperatura da superfície do corpo ao longo do tempo. (C) Diferença entre as temperaturas superficiais da cabeça e do corpo. N= 11 (154 mmol/L), N= 4 (625 mmol /L) e N=5 (2500 mmol/L). Efeito da interação para A e B (fatores: tempo vs tratamento): *p<0,05 comparado com o grupo controle; ‡p<0,05 comparado com o grupo 625 mmol /L. Em C, o grupo 2500 mmol/L foi diferente dos outros grupos (efeito do tratamento: p<0,05; sem interação entre os fatores).

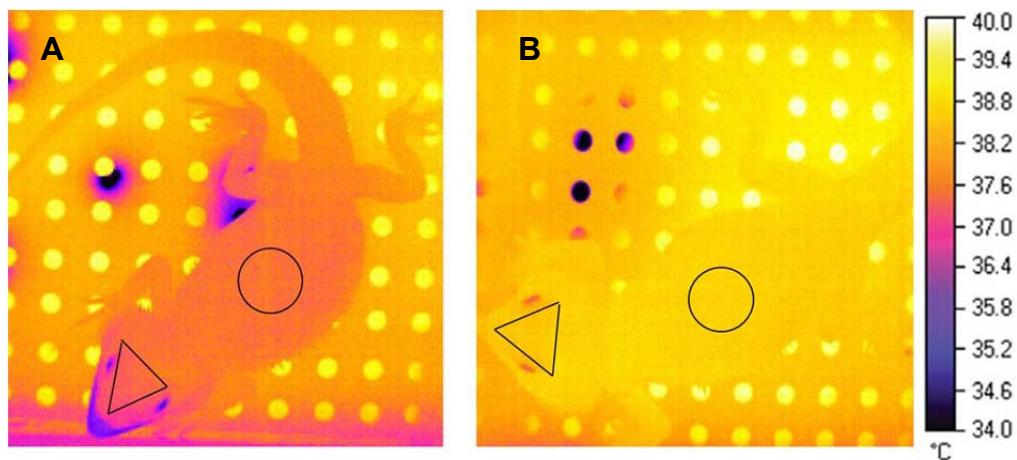


Figura 4. Imagens termográficas representativas registradas depois das injeções de salina no *P. vitticeps*. (A) Animal controle (154 mmol/L). (B) Animal injetado com salina hipertônica (2500 mmol/L). Ambas as imagens foram registradas 125 minutos após a injeção de salina quando o animal controle apresentava *gaping* em aproximadamente 60% do tempo e o animal que recebeu injeção de salina hipertônica não tinha nenhum *gaping*. Note a temperatura mais fria ao redor da boca em A. A temperatura da superfície da cabeça foi calculada na área indicada pelo triângulo e a temperatura da superfície do corpo foi calculada a partir do círculo como indicado nas imagens.

Efetividade do gaping para a PEA e efeito das injeções de salina hipertônica no metabolismo e na PEA

Para verificar a efetividade do *gaping* em relação à PEA, a taxa metabólica ($\dot{V}O_2$) e a PEA foram medidas durante intervalos espontâneos de *gaping* e não-*gaping* [a produção de calor (PC) e a transferência evaporativa de calor (TEC) foram calculados baseados nos valores de $\dot{V}O_2$ e PEA; veja material e métodos]. Já que os intervalos de *gaping* menores que 15 segundos não foram considerados para estas análises (veja material e métodos), apenas animais controle (154 mmol/L) foram levados em conta para estas comparações (entre *gaping* vs não-*gaping*); os animais que receberam injeção de salina hipertônica apresentaram episódios de *gaping* muito breves para considerarmos que as diferenças no $\dot{V}O_2$ e na água produzidos seriam adequadamente detectadas pelo sistema.

Embora a PEA não foi diferente entre os intervalos de *gaping* e não-*gaping* ($p=0,706$), uma redução significativa no $\dot{V}O_2$ ($p=0,023$) contribuiu para um aumento geral na efetividade evaporativa do *gaping* ($PEA/\dot{V}O_2$; $p=0,01$; tabela 1). A T_c dos animais foi $37,7 \pm 0,06^\circ\text{C}$ ao longo de todo o experimento. Quanto ao efeito da injeção de salina hipertônica

(625 mmol/L) no $\dot{V}O_2$ e na PEA, a concentração de 625 mmol/L diminuiu o $\dot{V}O_2$ ($p=0,025$), no entanto, porque a PEA tendeu a ser menor após a injeção ($p=0.12$), a $PEA/\dot{V}O_2$ não foi afetada pelo aumento no nível de sal corpóreo ($p=0,195$) quando comparados aos efeitos da injeção de salina isotônica nas mesmas variáveis (Tabela 2).

Tabela 1. Efeito do *gaping* na PEA, $\dot{V}O_2$ e $PEA/\dot{V}O_2$ em lagartos *P. vitticeps*.

<i>Intervalo</i>	<i>PEA</i>	<i>TEC</i>	$\dot{V}O_2$	<i>PC</i>	$PEA/\dot{V}O_2$	<i>TEC/PC</i>
Não- <i>gaping</i>	5.87±0.65	14.69±1.63	0.97±0.14	19.46±2.8	6.90 ± 1.13	0.86±0.14
<i>Gaping</i>	6.07±0.43	15.18±1.06	0.73±0.09*	14.52±1.83	9.10 ± 1.03*	1.14±0.13

Os resultados aqui apresentados (média ± e.p.m.) são dos lagartos (n=8) que receberam injeção de salina isotônica. * $p<0,05$ = diferença entre intervalos com *gaping* e sem *gaping*.

Tabela 2. Alteração (%) na PEA, $\dot{V}O_2$ e $PEA/\dot{V}O_2$ depois das injeções de salina isotônica e hipertônica em lagartos *P. vitticeps*

Tratamento	%PEA	% $\dot{V}O_2$	% $PEA/\dot{V}O_2$
154 mM	-5.11 ± 8.3	-12.96 ± 8.1	16.1 ± 21.3
625 mM	-22.7 ± 6.9	-40.9 ± 7.5*	48.1 ± 25.4

Os valores foram calculados baseados nas alterações pós-injeção comparados com os valores pré-injeção; N= 7 (154mmol/L) e N=8 (625mmol/L); * $p<0,05$ = diferença entre tratamentos.

4. DISCUSSÃO

No presente trabalho, injeções de salina hipertônica foram usadas como forma de induzir um desafio osmótico nos animais. Esta metodologia foi considerada adequada devido ao aumento linear na osmolalidade plasmática e à proporcional disposição ao consumo de água por parte dos animais em relação aos tratamentos recebidos. Após as injeções, era esperado que aqueles lagartos que receberam tratamento hipertônico e foram expostos ao *shuttle box* saíssem do CF em direção ao CQ e do CQ para o CC em Tas mais frias, ou seja, os animais teriam reduzidas TaIE e TaSE comparado aos animais controle, refletindo uma redução geral nas suas Tcs após a desidratação. De fato, estudos anteriores mostraram que ratos (Konishi et al., 2007), sapos (Malvin e Wood, 1991), lagartos (Crowley, 1987; Bradshaw et al., 2007) e serpentes (Ladyman e Bradshaw, 2003) selecionam Tas mais frias quando a disponibilidade de água é reduzida. No entanto, no presente trabalho, a concentração mais alta de salina hipertônica (2500mmol/L) alterou ambas as TaIE e a TaSE dos animais, mas em direções opostas (Fig. 1a) e diminuiu o número de *shuttles* (Fig. 1B). Uma menor TaIE e uma maior TaSE sugere que ou a preferência térmica do animal foi diminuída e aumentada ao mesmo tempo ou que o aumento na osmolalidade afetou a predisposição do animal em se mover (Fig. 1b) e não o *set-point* termorregulador.

No experimento seguinte, foi testado o *shuttling* em um ambiente isotérmico (*shuttle box* a 34°C) e foi observado que a concentração de 2500mmol/L reduziu o número de *shuttles* (Fig. 1c), indicando que o aumento no nível corpóreo de sal realmente afetou a tendência ao movimento e não a termorregulação *per se*. Neste mesmo sentido, já foi descrito que lagartos das famílias agamidae e iguanidae abandonam todas as atividades e não termorregulam quando eles estão desnutridos ou em situações de extrema redução na disponibilidade de água (Bradshaw, 1997), um comportamento similar ao observado no presente estudo. Ainda não é conhecido se a redução no *shuttling* depois do aumento na osmolalidade plasmática é devido a uma redução na motivação ao movimento ou a uma inibição fisiológica da função neuromuscular. Baseado nos nossos resultados, nós sugerimos que a concentração mais alta de solução salina usada no presente trabalho foi alta o suficiente para inibir qualquer resposta termorreguladora que envolva locomoção. Por outro lado, a concentração intermediária (1250mmol/L), que reduziu 90% do *gaping*, não alterou a TaIS, TaSE nem o número de *shuttles*, indicando que há diferentes limiares para a influência da osmolalidade nestas respostas termorreguladoras e que a conservação de água pode acontecer

mesmo durante uma desidratação moderada sem que os *set-points* termorreguladores para o *shuttling* sejam alterados.

O efeito do sal no *gaping* confirmou nossa hipótese: este comportamento foi reduzido pelas injeções de salina hipertônica de acordo com a concentração recebida (Fig. 2a,b), o que é interessante porque, como mencionado, a concentração de 1250mmol/L não afetou a termorregulação no *shuttle box*, mas causou uma enorme redução no *gaping*. Mesmo a concentração mais baixa utilizada (625mmol/L) foi capaz de diminuir o *gaping* em 50%. Embora considerada uma resposta diferente do *gaping*, a frequência do ofego e seu limiar de temperatura também foram alterados pela desidratação em endotermos, tais como aves (Arad, 1983; Maloney and Dawson, 1998) e ovelhas (McKinley et al., 2008). Os efeitos da desidratação sugerem que os termofetores dependentes de água (*gaping/ofego*) sejam mais sensíveis aos níveis de sal na corrente sanguínea que os termofetores “secos”, como o comportamento de vai e vem entre ambientes mais ou menos quentes (*shuttling*). Desta forma, a redução do *gaping* induzida pelo aumento do nível corporal de sal parece ser uma estratégia para a economia de água. Baseado nestes resultados, o esperado era que o *gaping* fosse uma fonte significativa de perda evaporativa de calor nesta espécie.

Embora nenhuma diferença entre os intervalos de *gaping* e não-*gaping* foi detectada na PEA *per se*, o $\dot{V}O_2$ foi reduzido em 25% durante o *gaping*. Uma redução ainda maior no $\dot{V}O_2$ e um aumento de cerca de 10 vezes na frequência respiratória (= ofego) foi descrita em ovelhas quando elas eram expostas ao calor moderado (40°C por 2–3 h). Tal declínio no $\dot{V}O_2$ foi associado a um decréscimo no fluxo sanguíneo dos músculos esqueléticos e nos órgãos internos acompanhados por um aumento no fluxo sanguíneo para regiões periféricas (Hales, 1973; Hales e Brown, 1974). De fato, o *gaping* tem sido observado no nosso laboratório em animais muito calmos e que não demonstram nenhum movimento ativo concomitante com o *gaping*. Tal redução no movimento simultaneamente com um possível aumento no fluxo sanguíneo para a região bucal poderia ter contribuído para o decréscimo geral no $\dot{V}O_2$ observado em nossos animais. Apesar da PEA não ter sido alterada pelo *gaping*, a redução no $\dot{V}O_2$ causou um aumento na taxa $PEA/\dot{V}O_2$ (tabela 1) indicando que este mecanismo realmente contribui para a perda evaporativa de energia térmica quando consideramos que ele causa uma redução no metabolismo (a perda evaporativa de energia corresponde a 86% da PC total durante intervalos de não-*gaping*, aumentando para 114% durante o *gaping*; tabela 1). Como mencionado, Bradshaw (1997) demonstrou que lagartos da família agamidae (*Ctenophorus ornatus*) têm seus comportamentos normais de

termorregulação inibidos quando enfrentam hipernatremia associada com desidratação crônica no campo. O presente trabalho além de corroborar os achados de Bradshaw (1997), providencia mais evidências de que diante de um estresse osmótico, o sistema osmorregulador parece ser preservado (afinal o *gaping*, uma fonte de PEA, foi inibido) à custa do sistema termorregulador. Como dito acima na metodologia, apenas os animais injetados com salina isotônica foram considerados para as análises do potencial evaporativo do *gaping* (tabela 1) porque depois do tratamento com salina hipertônica, os lagartos apresentavam eventos de *gaping* muito curtos o que não era adequado para nossas análises. Embora tais registros após as injeções de salina hipertônica não fossem ideais para esta finalidade, eles eram consistentes para avaliar o efeito geral do sal no metabolismo (tabela 2). A injeção de salina hipertônica (625mmol/L) diminuiu o $\dot{V}O_2$ comparado com o efeito da injeção isotônica. A taxa metabólica também foi reduzida em camelo, gatos e cabras desidratadas (Schmidt-Nielsen et al., 1967; Doris e Baker, 1981; Dmi'el, 1986). A PEA tendeu a ser menor nos animais tratados com salina hipertônica, o que está de acordo com a redução no tempo gasto em *gaping* após as injeções (Fig. 2a,b), mais uma vez, então, sugerindo que o *gaping* normalmente contribui para a perda evaporativa de água e é reduzido quando a osmolalidade plasmática é aumentada. Devido à redução no $\dot{V}O_2$ e a tendência da PEA em ser menor, a taxa $PEA/\dot{V}O_2$ não foi significativamente alterada (tabela 2).

As origens neurológicas para a interação entre o sistema osmorregulador e termorregulador são encontradas no hipotálamo. Foi descrita que, em gatos, a termossensibilidade dos neurônios hipotalâmicos é reduzida durante a desidratação, diminuindo então a perda evaporativa de calor (Doris e Baker, 1981). Além disso, elevadas concentrações de sódio no fluido cerebrospinal reduz a taxa de suor em macacos (*Erythrocebus patas*; Owen et al., 1989) e a frequência respiratória (=ofego) em coelhos (Turlejska e Baker, 1986). Em ovelhas, o efeito inibitório da salina hipertônica no ofego foi abolido pela lesão da *lâmina terminalis*, uma região que inclui os osmorreceptores hipotalâmicos e o núcleo pré-óptico mediano (McKinley et al., 2008) que, por sua vez, está envolvido com a regulação dos termofetores em mamíferos (Nakamura e Morrison, 2010). Assim, em muitos vertebrados, a termorregulação está conectada ao estado osmorregulador diretamente por meio dos neurônios centrais. Vias similares podem ter sido ativadas em nossos lagartos ou, em outras palavras, o aumento no nível corpóreo de sal pode ter aumentado a concentração encefálica de sódio, alterado a termossensibilidade dos neurônios e contribuído para a redução na porcentagem de tempo gasto em *gaping*.

Todos os lagartos do protocolo de *gaping* demonstraram um aumento na Tscabeça ao longo do tempo devido ao lento processo de equilíbrio térmico entre o animal e a câmara de temperatura controlada. No entanto, a Tscabeça dos animais que receberam injeção da salina mais concentrada (2500mmol/L) foi ainda maior comparado aos animais controle (Fig. 3a e 4) – o mesmo padrão foi observado para a Tscorpo (Fig. 3B e Fig. 4). É interessante notar que a diferença entre Tscabeça e Tscorpo foi maior naqueles animais tratados com salina isotônica ou com a menor concentração de solução salina (625mmol/L) que nos lagartos que receberam injeção da maior concentração de solução salina (Fig. 3C e Fig. 4). Assim, no mesmo nível de osmolalidade plasmática (2500mmol/L) que o *gaping* é completamente suprimido, as Tscabeça e Tscorpo se igualam, o que pode ter importantes consequências para a manutenção das temperaturas craniais e funções encefálicas, indicando que o *gaping* pode ser um mecanismo de resfriamento encefálico (Tattersall et al., 2006), apesar das mudanças relativamente pequenas na PEA causadas por este comportamento (tabela 1).

Um mecanismo chamado “resfriamento encefálico seletivo” (RES) é ativado em mamíferos quando eles enfrentam reduzida disponibilidade de água corpórea (Caputa et al., 1976; McConaghy et al., 1995; Jessen, 2001; Mitchell et al., 2002). O RES é definido como “temperatura encefálica menor que a temperatura do sangue arterial” (IUPS Thermal Commission, 2001), o que acontece geralmente quando o sangue da carótida é resfriado durante sua ascensão ao encéfalo (Willmer et al., 2005). Se o encéfalo está mais frio, a PEA não é ativada porque os neurônios sensíveis ao calor não são estimulados. Neste sentido, tem sido proposto que o RES não é apenas um mecanismo de proteção neural, mas também uma estratégia para conservação de água.

Uma combinação de resfriamento respiratório e um sistema de contracorrente vascular cerebral podem contribuir e levar a um resfriamento encefálico nos lagartos quando eles são expostos a altas T_a s (Tattersall et al., 2006). O *gaping* claramente contribui para a evaporação da água nas vias aéreas superiores e na cavidade bucal (Fig. 4), o que pode ter sido suficiente para resfriar o sangue da carótida no seu caminho ao encéfalo. Quando a T_a é baixa ou igual à selecionada naturalmente pelos animais, o sangue encefálico volta à periferia pela veia jugular interna e então, por causa da sua proximidade com a artéria carótida interna, o calor é transferido para esta artéria, mantendo o encéfalo aquecido (Oelrich, 1956; Heath, 1964, 1966). Já em altas T_a s, é sugerido que a veia jugular interna seja contraída e então o sangue encefálico retorna para a periferia pela jugular externa que se encontra relativamente

afastada da artéria carótida. Neste caso, o calor não é transferido para o sangue carotídeo, mas ao invés, é levado na direção oposta ao encéfalo, contribuindo para o resfriamento do mesmo (Heath, 1964; Tattersall et al., 2006). É possível que estes dois mecanismos (resfriamento respiratório e mecanismo de contracorrente vascular) tenham mantido o encéfalo mais frio quando os lagartos apresentavam no mínimo 50% de *gaping* (Fig. 3c), mas o resfriamento não foi preservado quando o *gaping* foi abolido após os tratamentos com salina hipertônica (Fig. 3c). Os mesmos mecanismos evaporativos/não- evaporativos também podem ter contribuído para resfriarem a cabeça em um pequeno lagarto lacertídeo (*Podarcis muralis*) quando eles foram aquecidos, embora esta hipótese ainda precisa ser experimentalmente testada (Sannolo et al., 2014).

Há importantes diferenças entre o RES em mamíferos e em répteis. Em mamíferos, o RES pode ser observado quando a água não está disponível. Mamíferos hidratados (cabras e ovelhas), mesmo quando expostos a altas T_a s raramente apresentam RES, mas animais desidratados exibem RES mais frequente e em maior grau, corroborando a ideia de que tal mecanismo é ativado pelo sistema osmorregulador e pode não ter função termorreguladora nestes animais (Jessen et al., 1998; Fuller et al., 2007). Por outro lado, nos *Pogona vitticeps*, o resfriamento da cabeça (e por inferência, do encéfalo) aconteceu quando a água estava disponível (isto é, quando os animais apresentaram *gaping*. Fig. 4a e 3c) e, no sentido oposto, o resfriamento foi diminuído quando a água não estava disponível, ou seja, quando o *gaping* foi abolido (após injeções de 2500mmol/L de salina. Fig. 4b e 3c). Além disso, o nível de *gaping* apresentada pelos lagartos *P. vitticeps*, quando estão hidratados, é aumentado conforme a T_a é elevada, bem como a diferença entre $T_{scabeça}$ e T_{scorpo} (Tattersall and Gerlach, 2005), mas esta diferença foi reduzida quando os animais foram desidratados à mesma T_a (Fig. 2a). Assim, parece que não é o sistema de osmorregulação que ativa o resfriamento encefálico em lagartos, mas sim o de termorregulação; consequentemente, o RES deve funcionar como um mecanismo protetor do encéfalo. Apesar do RES ser ativado pelo sistema termorregulador, quando os lagartos enfrentam reduzida disponibilidade de água, a água corporal ainda é conservada à custa da termorregulação, similar ao que acontece em mamíferos. Embora um estudo prévio já tenha mostrado que o *gaping* é um termofetor efetivo para o *Alligator mississippiensis*, (Spotila et al., 1977), o presente trabalho é o primeiro a mostrar que o *gaping* pode funcionar como um mecanismo de resfriamento local (encefálico) para lagartos de deserto, baseado no fato que a desidratação

reduziu o *gaping* e aumentou a Tscabeça, eliminando a diferença entre a Tscabeça e Tscorpo (Fig. 3).

Concluindo então, nós demonstramos que uma concentração intermediária de salina hipertônica (1250mmol/L) pode afetar os mecanismos de PEA, mas não afeta os mecanismos não relacionados à água. O fato de o *gaping* ser mais sensível aos níveis corpóreos de sal que o *shuttling*, pode ser uma importante resposta para a economia de água durante um período de desidratação natural, enquanto os mecanismos termorreguladores não dependentes de água ainda podem acontecer. No entanto, quando a água está disponível, o *gaping* pode desempenhar um papel de mecanismo de resfriamento local que é importante para evitar o superaquecimento encefálico nestes lagartos, como aquele que pode acontecer quando estão termorregulando expostos ao sol.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

-
- ARAD, Z. Thermoregulation and acid-base status in the panting dehydrated fowl. **J. Appl. Physiol. Respir. Environ. Exerc. Physiol.**, v. 54, p. 234-243, 1983.
- BAKER, M.A. Effects of dehydration and rehydration on thermoregulatory sweating in goats. **J. Physiol.**, v. 417, p. 421-435, 1989.
- BAKER, M.A.; DAWSON, D.D. Inhibition of thermal panting by intracarotid infusion of hypertonic saline in dogs. **Am. J. Physiol.**, v. 249, p. R787-R791, 1985.
- BAKER, M.A.; TURLEJSKA, E. Thermal panting in dehydrated dogs: effects of plasma volume expansion and drinking. **Pflügers Arch.**, v. 413, p. 511-515, 1989.
- BARBER, B.J.; CRAWFORD, E.C. Dual threshold control of peripheral temperature in the lizard *Dipsosaurus dorsalis*. **Physiol. Zool.**, v. 52, p. 250-263, 1979.
- BENTLEY, P.J. Studies on the water and electrolyte metabolism of the lizard *Trachysaurus rugosus* (Gray). **J. Physiol.**, v. 145, p. 37-47, 1959.
- BERK, M.L.; HEATH, J.E. An analysis of behavioral thermoregulation in the lizard, *Dipsosaurus dorsalis*. **J. Therm. Biol.**, v.1, p. 15-22, 1975.
- BOUÂOUDA, H.; ACHÂABAN, M.R.; OUASSAT, M.; OUKASSOU, M.; PIRO, M.; CHALLET, E.; EL ALLALI, K.; PÉVET, P. Daily regulation of body temperature rhythm in the camel (*Camelus dromedarius*) exposed to experimental desert conditions. **Physiol. Rep.**, v. 2, p. e12151, 2014.
- BRADSHAW, S.D. Homeostasis in Desert Reptiles. Berlin: Springer, 1997, 232 p.
- BRADSHAW, S.D.; SHOEMAKER, V.H. Aspects of water and electrolyte changes in a field population of *Amphibolurus lizards*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 20, p. 855-865, 1967.
- BRADSHAW, D.; LADYMAN, M.; STEWART, T. Effect of hypernatraemia and the neurohypophysial peptide, arginine vasotocin (AVT) on behavioural thermoregulation in the agamid lizard, *Ctenophorus ornatus*. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v. 150, p. 34-40, 2007.
- CADENA, V.; TATTERSALL, G.J. The effect of thermal quality on the thermoregulatory behavior of the bearded dragon *Pogona vitticeps*: influences of methodological assessment. **Physiol. Biochem. Zool.**, v. 82, p. 203-217, 2009a.
- CADENA, V.; TATTERSALL, G.J. Decreased precision contributes to the hypoxic thermoregulatory response in lizards. **J. Exp. Biol.**, v. 212, p. 137-144, 2009b.
- CAPUTA, M.; KADZIELA, W.; NAREBSKI, J. Significance of cranial circulation for the brain homeothermia in rabbits. I. The brain-arterial blood temperature gradient. **Acta Neurobiol. Exp. (Wars)**, v. 36, p. 613-623, 1976.
- CROWLEY, S.R. The effect of desiccation upon the preferred body temperature and activity level of the lizard *Sceloporus undulatus*. **Copeia**, v. 1987, p. 25-32, 1987.

DMI'EL, R. Selective sweat secretion and panting modulation in dehydrated goats. **J. Therm. Biol.**, v. 11, p. 157-159, 1986.

DORIS, P.A.; BAKER, M.A. Hypothalamic control of thermoregulation during dehydration. **Brain Res.**, v. 206, p. 219-222, 1981.

DOSSAT, R.J.; HORAN, T.J. (2001). Psychrometric properties of air. In: _____ **Principles of Refrigeration**. New York: Prentice Hall, 2001. pp. 57-70.

DUPRÉ, R.K.; CRAWFORD, E.C. Elevation of the panting threshold of the desert iguana, *Dipsosaurus dorsalis*, during dehydration: potential roles of changes in plasma osmolality and body fluid volume. **J. Comp. Physiol. B.**, v. 156, p. 377-381, 1986.

FORD, S. S.; BRADSHAW, S. D. Kidney function and the role of arginine vasotocin in three agamid lizards from habitats of differing aridity in Western Australia. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v. 147, p. 62-69, 2006.

FULLER, A.; MEYER, L.C.R.; MITCHELL, D.; MALONEY, S.K. Dehydration increases the magnitude of selective brain cooling independently of core temperature in sheep. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 293, p. R438-R446, 2007.

HALES, J.R.S. Effects of exposure to hot environments on the regional distribution of blood flow and on cardiorespiratory function in sheep. **Pflügers Arch.**, v. 344, p. 133-148, 1973.

HALES, J.R.S.; BROWN, G.D. Net energetic and thermoregulatory efficiency during panting in the sheep. **Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.**, v. 49, p. 413-422, 1974.

HEATH, J.E. Head-body temperature differences in horned lizards. **Physiol. Zool.**, v. 37, p. 273-279, 1964.

HEATH, J.E. Venous shunts in the cephalic sinuses of horned lizards. **Physiol. Zool.**, v. 39, p. 30-35, 1966.

HEATWOLE, H.; FIRTH, B.T.; WEBB, G.J.W. Panting thresholds of lizards-I. Some methodological and internal influences on the panting threshold of an Agamid, *Amphibolurus muricatus*. **Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.**, v.46, p. 799-826, 1973.

IUPS THERMAL COMMISSION. Glossary of terms for thermal physiology. **Jpn. J. Physiol.**, v. 51, p. 245-280, 2001.

JESSEN, C. Selective brain cooling in mammals and birds. **Jpn. J. Physiol.**, v. 51, p. 291-301, 2001.

JESSEN, C.; DMI'EL, R.; CHOSHNIAK, I.; EZRA, D.; KUHNEN, G. Effects of dehydration and rehydration on body temperatures in the black Bedouin goat. **Pflügers Arch.** v. 436, p. 659-666, 1998.

KLEINHAUS, S.; PINSHOW, B.; BERNSTEIN, M.H.; DEGEN, A.A. Brain temperature in heat-stressed, water deprived desert phasianids: sand partridge (*Ammoperdix heyi*) and chukar (*Alectoris chukar sinaica*). **Physiol. Zool.**, v. 58, p. 105-116, 1985.

KONISHI, M.; NAGASHIMA, K.; ASANO, K.; KANOSUE, K. Attenuation of metabolic heat production and cold-escape/warm-seeking behaviour during a cold exposure following systemic salt loading in rats. **J. Physiol.**, v. 551, p. 713-720, 2003.

KONISHI, M.; KANOSUE, K.; KANO, M.; KOBAYASHI, A.; NAGASHIMA, K. The median preoptic nucleus is involved in the facilitation of heat-escape/coldseeking behavior during systemic salt loading in rats. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 292, p. R150-R159, 2007.

LADYMAN, M. BRADSHAW, D. The influence of dehydration on the thermal references of the Western tiger snake, *Notechis scutatus*. **J. Comp. Physiol. B.**, v. 173, p. 239-246, 2003.

LIGHTON, J.R.B. Flow-through respirometry: the equations. In: _____ Measuring Metabolic Rates. A Manual for Scientists. New York: Oxford University Press, 2008, pp. 100-104.

MALONEY, S.K.; DAWSON, T.J. Changes in pattern of heat loss at high ambient temperature caused by water deprivation in a large flightless bird, the Emu. **Physiol. Zool.**, v. 71, p. 712-719, 1998.

MALVIN, G. M.; WOOD, S.C. Behavioral thermoregulation of the toad, *Bufo marinus*: effects of air humidity. **J. Exp. Zool.**, v. 258, p. 322-326, 1991.

McCONAGHY, F.F.; HALES, J.R.S.; ROSE, R.J.; HODGSON, D.R. Selective brain cooling in the horse during exercise and environmental heat stress. **J. Appl. Physiol.**, v. 79, p. 1849-1854, 1995.

McKINLEY, M.J.; MCALLEN, R M.; WHYTE, D.; MATHAI, M.L. Central osmoregulatory influences on thermoregulation. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 35, p. 701-705, 2008.

MELVILLE, J.; SCHULTE, J.A. Correlates of active body temperatures and microhabitat occupation in nine species of central Australian agamid lizards. **Aust. Ecol.**, v. 26, p. 660-669, 2001.

MITCHELL, D., MALONEY, S.K.; JESSEN, C.; LABURN, H.P.; KAMERMAN, P.R.; MITCHELL, G.; FULLER, A. Adaptive heterothermy and selective brain cooling in arid-zone mammals. **Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.**, v. 131, p. 571-585, 2002.

NAGASHIMA, K.; NAKAI, S.; KONISHI, M.; SU, L.; KANOSUE, K. Increased heat-escape/cold-seeking behaviour following hypertonic saline injection in rats. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 280, p. R1031-R1036, 2001.

NAKAMURA, K.; MORRISON, S. F. A thermosensory pathway mediating heat-defense Responses. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 107, p. 8848-8853, 2010.

O'CONNOR, M. P.; TRACY, C.R. Thermoregulation by juvenile toads of *Bufo woodhousei* in the field and in the laboratory. **Copeia** v. 1992, p. 865-876, 1992.

OELRICH, T.M. The anatomy of the head of *Ctenosaura pectinate* (Iguanidae). **Mus. Zool. Univ. Mich. Misc. Publ.**, v. 94, p. 1-122, 1956.

OWEN, M.D., MATTHES, R.D.; GISOLFI, C.V. Effect of cerebrospinal fluid hyperosmolality on sweating in the heat-stressed patas monkey. **J. Appl. Physiol.**, v. 67, p. 128-133, 1989.

PARMENTER, C.J.; HEATWOLE, H. Panting thresholds of lizards. IV. The effect of dehydration on the panting threshold of *Amphibolurus barbatus* and *Amphibolurus muricatus*. **J. Exp. Zool.**, v. 191, p. 327-332, 1975.

PREEST, M.R.; POUGH, F.H. Interaction of temperature and hydration on locomotion of toads. **Funct. Ecol.**, v. 3, p. 693-699, 1989.

RANDALL, D.; BURGGREN, W; FRENCH, K. Using energy: meeting environmental challenges. In: _____. **Eckert Animal Physiology: Mechanisms and Adaptations**. 4.ed. New York:Freeman Company, 1997. p. 665–723.

RICE, G. E. Plasma arginine vasotocin concentrations in the lizard *Varanus gouldii* (Gray) following water loading, salt loading, and dehydration. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v. 47, p. 1-6, 1982.

SANNOLO, M.; MANGIACOTTI, M.; SACCHI, R.; SCALI, S. Keeping a cool mind: head–body temperature differences in the common wall lizard. **J. Zool.**, v. 293, p. 71-79, 2014.

SCHMIDT-NIELSEN, K.; SCHMIDT-NIELSEN, B.; JARNUM, S. A.; HOUP, T.R. Body temperature of the camel and its relation to water economy. **Am. J. Physiol.**, v. 188, p. 103-112, 1957.

SCHMIDT-NIELSEN, K.; CRAWFORD, E.C.; JR NEWSOME, A.E.; RAWSON, K.S.; HAMMEL, H.T. Metabolic rate of camels: effect of body temperature and dehydration. **Am. J. Physiol.**, v. 212, p. 341-346, 1967.

SILVA, N.L.; BOULANT, J.A. Effects of osmotic pressure, glucose, and temperature on neurons in preoptic tissue slices. **Am. J. Physiol.**, v. 247, p. R335-R345, 1984.

SPOTILA, J. R.; TERPIN, K. M.; DODSON, P. Mouth gaping as an effective thermoregulatory device in alligators. **Nature**, v. 265, p. 235-236, 1977.

TATTERSALL, G.J.; GERLACH, R.M. Hypoxia progressively lowers thermal gaping thresholds in bearded dragons, *Pogona vitticeps*. **J. Exp. Biol.**, v. 208, p. 3321-3330, 2005.

TATTERSALL, G. J.; CADENA, V; SKINNER, M. C. Respiratory cooling and thermoregulatory coupling in reptiles. **Respir. Physiol. Neurobiol.**, v. 154, p. 302-318, 2006.

TAYLOR, C. R. Dehydration and heat. Effects on temperature regulation of East African ungulates. **Am. J. Physiol.** v. 219, p. 1136-1139, 1970.

TURLEJSKA, E.; BAKER, M.A. Elevated CSF osmolality inhibits thermoregulatory heat loss responses. **Am. J. Physiol.** v. 251, p. R749-R754, 1986.

WILLMER, P.; STONE, G.; JOHNSTON, I. Temperature and its Effects. In: _____ **Environmental Physiology of Animals**. Malden: Blackwell Publishing, 2005, pp. 209-210.

Apêndices

Apêndice A

**“TRPV4 activates autonomic and behavioural warmth
defence responses in Wistar rats”**

TRPV4 activates autonomic and behavioural warmth-defence responses in Wistar rats

R. C. L. Vizin,^{1,*} C. da S. Scarpellini,^{2,3,4,*} D. T. Ishikawa,¹ G. M. Correa,^{2,4} C. O. de Souza,¹ L. H. Gargaglioni,^{2,4} D. C. Carrettiero,^{1,5} K. C. Bicego^{2,4} and M. C. Almeida^{1,5}

¹ Graduate Program on Neuroscience and Cognition, Universidade Federal do ABC (UFABC), São Bernardo do Campo, SP, Brazil

² Department of Animal Morphology and Physiology, College of Agricultural and Veterinary Sciences, São Paulo State University, Jaboticabal, SP, Brazil

³ Joint UFSCar-UNESP Graduate Program of Physiological Sciences, Sao Carlos, SP, Brazil

⁴ National Institute of Science and Technology in Comparative Physiology (INCT – Fisiologia Comparada), Jaboticabal, SP, Brazil

⁵ Natural and Humanities Science Center, Universidade Federal do ABC (UFABC), São Bernardo do Campo, SP, Brazil

Received 6 January 2015,
revision requested 10 February
2015,
revision received 16 February
2015,
accepted 26 February 2015
Correspondence: M. C. Almeida,
Natural and Humanities Sciences
Center (CCNH), Universidade
Federal do ABC (UFABC), Rua
Arcturus, 03, Jardim Antares, São
Bernardo do Campo, SP 09606-
070, Brazil.
E-mail: camila.almeida@ufabc.edu.br
and
K. C. Bicego, Department of
Animal Morphology and
Physiology, College of Agricultural
and Veterinarian Sciences, São
Paulo State University, Via de
Acesso Prof. Paulo D. Castellane, s/
n, Bairro Rural, Jaboticabal, SP
14884-900, Brazil.
E-mails: keniacb@yahoo.com.br;
keniacb@fcav.unesp.br

*These authors contributed
equally to this work.

See Editorial Commentary:
Garami, A. and Romanovsky, A. A.
The transient receptor potential
vanilloid-4 channel: detecting body
temperatures that drive defences
against mild warmth. *Acta Physiol*
214, 154–156.

Abstract

Aim: In this study, we aimed at investigating the involvement of the warmth-sensitive channel – TRPV4 (*in vitro* sensitive to temperatures in the range of approx. 24–34 °C) – on the thermoregulatory mechanisms in rats.

Methods: We treated rats with a chemical selective agonist (RN-1747) and two antagonists (RN-1734 and HC-067047) of the TRPV4 channel and measured core body temperature, metabolism, heat loss index and preferred ambient temperature.

Results: Our data revealed that chemical activation of TRPV4 channels by topical application of RN-1747 on the skin leads to hypothermia and this effect was blocked by the pre-treatment with the selective antagonist of this channel. Intracerebroventricular treatment with RN-1747 did not cause hypothermia, indicating that the observed response was indeed due to activation of TRPV4 channels in the periphery. Intravenous blockade of this channel with HC-067047 caused an increase in core body temperature at ambient temperature of 26 and 30 °C, but not at 22 and 32 °C. At 26 °C, HC-067047-induced hyperthermia was accompanied by increase in oxygen consumption (an index of thermogenesis), while chemical stimulation of TRPV4 increased tail heat loss, indicating that these two autonomic thermoeffectors in the rat are modulated through TRPV4 channels. Furthermore, rats chemically stimulated with TRPV4 agonist choose colder ambient temperatures and cold-seeking behaviour after thermal stimulation (28–31 °C) was inhibited by TRPV4 antagonist.

Conclusion: Our results suggest, for the first time, that TRPV4 channel is involved in the recruitment of behavioural and autonomic warmth-defence responses to regulate core body temperature.

Keywords tail vasomotor tone, thermogenesis, thermopreferendum thermoregulation, TRPV4 manipulation, warmth sensor.

The core body temperature (T_c) is one of the vital signs and the ability to regulate T_c is of fundamental importance, as all biochemical reactions and physiological functions are widely dependent on temperature (Wenisch *et al.* 1996, Wasserstrom & Vites 1999, Aihara *et al.* 2001). In endothermic animals, both autonomic and behavioural mechanisms are recruited for regulating T_c (Bícego *et al.* 2007). In this regard, independent neuronal networks, controlled by T_c and/or skin temperature (T_{sk}), which are detected by the thermoreceptors, are used by each thermoeffector (e.g. shivering, non-shivering thermogenesis, cutaneous vasomotor control) (Romanovsky 2007, Morrison & Nakamura 2011). In addition, behavioural thermoregulation is essential for survival, like finding a temperature of preference – one of the most efficient, energetically less expensive and widespread mechanism in mammals (Gordon 1990, Bícego *et al.* 2007).

The recent discovery and advances in the study of the temperature-sensitive transient receptor potential channels ('TRP') have contributed to our understanding of the transduction mechanisms of thermal signals. In this study, we focused on the TRPV4, which is activated *in vitro* at temperatures in the range of approx. 24–34 °C (Güler *et al.* 2002, Kauer & Gibson 2009), and also by other factors such as hypo-osmolarity (Liedtke *et al.* 2000, Strotmann *et al.* 2000), chemical agonists (Vincent *et al.* 2009, Vincent & Dunton 2011) and endogenous arachidonic acid metabolites (Voets *et al.* 2005). Consistent with their thermosensitivity *in vitro*, the TRPV4 protein was located at some anatomical locations compatible with thermoregulatory function, including primary sensory neurones, keratinocytes, endothelial cells, sweat glands, sympathetic neurones and preoptic area of the hypothalamus (Liedtke *et al.* 2000, Delany *et al.* 2001, Güler *et al.* 2002, Watanabe *et al.* 2002, Alessandri-Haber *et al.* 2003). In fact, TRPV4 has been proposed to act as thermoreceptor as genetic ablation of TRPV4 lead mice to select warmer temperatures than control animals when exposed to a thermal gradient or when they had to choose between two T_{as} (Lee *et al.* 2005); however, whether this channel is activated in warmth conditions *in vivo* in a non-genetically modified animal and whether it recruits autonomic and/or behavioural thermoregulatory mechanisms had not been assessed. Thus, this study aimed at investigating whether TRPV4 channels are involved in the autonomic and behavioural thermoregulation *in vivo* using a pharmacological approach. To this end, we evaluated the effects of selective TRPV4 agonist and antagonists on T_c , heat loss index (HLI), oxygen consumption and selected ambient temperature.

Materials and methods

Ethics approval

All the procedures were approved and are in accordance with the local ethics committee from Federal University of ABC (CEUA/UFABC, Protocol number 001/2010) and from Sao Paulo State University (CEUA/FCAV, Protocol Number 26430/11, 019414/14), and efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering. This study conforms with Good Publication Practice in Physiology 2013 Guidelines for Acta Physiologica (Persson 2013).

Animals

Experiments were run in two different facilities: 152 male Wistar rats (8–10 weeks old; weight 290–320 g) were obtained from ICB/USP and from UNESP Botucatu. All of them were housed in a room with 12/12-hour light–dark cycle (lights on at 7 am), controlled temperature (22 ± 2 °C) and 60% of humidity with free access to food and water. Each experiment was conducted in separated groups of animals. All experiments were conducted from 9 am to 4 pm.

Drugs

RN-1747 ([1-(4-Chloro-2-nitrophenyl)sulfonyl-4-benzylpiperazine]) is a selective TRPV4 channel agonist (Vincent *et al.* 2009) that was purchased from Tocris Bioscience (Bristol, UK). A stock solution of RN-1747 (25 mg mL⁻¹) in 50% ethanol and 50% propylene glycol was prepared, aliquoted and stored at –20 °C. On the day of experiment, the stock was diluted to make a working solution of RN-1747 in different concentrations: 100 µg mL⁻¹ in vehicle containing 25% ethanol, 25% propylene glycol and 50% saline for intravenous administration (i.v.); 500 or 1000 µg mL⁻¹ in propylene glycol for topical administration. For intracerebroventricular (i.c.v.) administration, the RN-1747 was injected directly by stock solution aliquot. RN-1734 ([2,4-Dichloro-N-isopropyl-N-(2-isopropylaminoethyl) benzenesulfonamide]) (Vincent *et al.* 2009) and HC-067047 ([2-Methyl-1-[3-(4-morpholinyl)propyl]-5-phenyl-N-[3-(trifluoromethyl) phenyl]-1H-pyrrole-3-carboxamide]) (Everaerts *et al.* 2010b) are two selective TRPV4 channel antagonists, both purchased from Tocris Bioscience. HC-067047 was chosen over RN-1734 for experiments 2 and 4 as it is more potent and presents a better selectivity for TRPV4 than RN-1734 (Vincent *et al.* 2009, Everaerts *et al.* 2010b). A stock solution of RN-1734 (25 mg mL⁻¹) in 50% ethanol and 50% propylene glycol was prepared, aliquoted and

stored at -20°C . On the day of experiment, the stock was diluted in propylene glycol to make a working solution of RN-1734 $100\ \mu\text{g mL}^{-1}$ for topical administration. HC-067047 was aliquoted and stored at -20°C at a concentration of 1000 or $5000\ \mu\text{g mL}^{-1}$ in 100% ethanol. On the day of experiment, the aliquot was diluted in sterile saline to make a working solution of HC-067047 100 or $500\ \mu\text{g mL}^{-1}$ for i.v. administration.

Surgical procedures

Animals were anesthetized with ketamine–xylazine (100 and $10\ \text{mg kg}^{-1}$ intraperitoneal respectively). The body area designated for the procedure was shaved and cleaned with polyvidone iodine solution (100% polyvidone iodine equivalent to 1% of active iodine). The animals were prophylactically treated with antibiotic (enrofloxacin 5%, subcutaneous; $0.5\ \text{mg kg}^{-1}$) and, immediately after surgery, with analgesic anti-inflammatory (flunixin meglumine, intramuscular; $2.5\ \text{mg kg}^{-1}$). Animals were used for the experimental measurements 3–7 days after surgical procedures, depending on which surgery was performed, to ensure that any inflammatory process resulting from the surgical procedure was resolved. The animals were submitted to one or more of the following surgical procedures.

Implantation of temperature-measuring device. Each rat was implanted with a miniature temperature datalogger (SubCue Dataloggers, Calgary, AB, Canada) into the peritoneal cavity via midline laparotomy to record abdominal temperature. After implantation of the device, the abdominal muscles and skin were sutured in layers.

Intravenous catheterization. A small longitudinal incision was made on the ventral surface of the neck, left of the trachea. The left jugular vein was exposed, freed from its surrounding connective tissue and ligated. A silicone catheter (inner diameter, 0.5 mm; outer diameter, 0.9 mm) filled with heparinized ($10\ \text{IU mL}^{-1}$) saline was passed into the superior vena cava through the jugular vein and secured in place with ligatures. The free end of the catheter was knotted, tunnelled under the skin to the nape of the neck and exteriorized. The wound was sutured, and the catheter was flushed with heparinized saline ($10\ \text{IU mL}^{-1}$) the day after surgery and every other day until the day of the experiment.

Intracerebroventricular cannulation. Each rat was fixed to a stereotaxic apparatus (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA) with the incisor bar set at

$3.3\ \text{mm}$ ventral to the interaural line. The scalp was incised over the sagittal suture, the periosteum was excised, two supporting microscrews were driven into the skull, and a small hole was drilled in the skull $0.8\ \text{mm}$ posterior to bregma and $1.5\ \text{mm}$ lateral to the midline. A 22-gauge steel guide cannula (14 mm long) was fixed into a manipulator used to insert the cannula into the brain through the bone hole. The tip of the cannula was placed just dorsal to the roof of the right lateral ventricle ($3.0\ \text{mm}$ from the skull surface). The cannula was secured to the supporting microscrews with acrylic cement and released from the manipulator. A 28-gauge stylet was inserted into the guide cannula to prevent clogging. After the end of the experiment, the position of the cannula in lateral ventricle was confirmed with injection of Evan's blue dye.

Oxygen consumption

Oxygen consumption was obtained by flow-through respirometry. The animal was placed in a respirometer (total volume: 3 L) inside a temperature-controlled environmental chamber (Fanem, Sao Paulo, SP, Brazil). The T_a inside the respirometer varied according to the protocol (22, 26, 30 or 32°C). The incurrent air was pulled into the respirometer at a rate of $2000\ \text{mL min}^{-1}$, but only a subsample of this air was pulled through the H_2O , CO_2 and O_2 analysers at $180\ \text{mL min}^{-1}$ (SS4; Sable Systems, Las Vegas, NV, USA). The water vapour pressure (WVP; kPa) was the first parameter analysed (RH300; Sable Systems) and this record (and barometric pressure as well, kPa) was later used to correct the percentage of O_2 , CO_2 and flow rate as the incurrent air was not dry (Lighton 2008). Then, the CO_2 percentage was analysed (CA-10; Sable Systems) and, finally, the O_2 percentage and barometric pressure were recorded (PA-10; Sable Systems). Each 20 min of recording was composed of 3 min of baseline, sample of incurrent air, 14 min of respirometer's excurrent air and three other minutes of baseline. Baseline was taken to ensure that the water, O_2 and CO_2 in the air offered to the animal remained constant over the experiment, and to provide the estimates of FiO_2 , FiCO_2 and FiH_2O . One gas flow distributor (RM8 Intelligent Multiplexer; Sable Systems) was used to control which gas sample (from respirometer or baseline) entered the analysers. All data were collected using a data-acquisition system (EXPEDATA v. 1.4.5; Sable Systems) collecting values every second.

The analysers were calibrated every week or whenever necessary. The O_2 analyser was calibrated using nitrogen as a zero value and dried air (20.95%) as span; the CO_2 analyser was also calibrated with pure nitrogen as a zero value and a certified, pre-mixed gas

source (1% CO₂) as a span value. The $\dot{V}O_2$ was calculated using the following equation (Lighton 2008):

$$\dot{V}O_2 = \frac{FR_i[(F_iO_2 - F_eO_2) - F_iO_2(F_eCO_2 - F_iCO_2)]}{1 - F_iO_2}$$

where, FR_i = incurrent flow rate; F_iO_2 = incurrent fractional concentration of oxygen (from baseline); F_eO_2 = excurrent fractional concentration of oxygen; F_iCO_2 = incurrent fractional concentration of carbon dioxide (from baseline); F_eCO_2 = excurrent fractional concentration of carbon dioxide.

Experimental designs

Experiment 1. Effect of chemical stimulation of TRPV4 on T_c . The animals were habituated individually for 2 h at 26 °C in a temperature-controlled chamber (Eletrolab; Sao Paulo, SP, Brazil). After this period, rats were treated with the selective agonist of TRPV4 channel RN-1747 by one of the three routes described below.

Intravenous—Animals were treated with RN-1747 (100 $\mu\text{g kg}^{-1}$; 1 mL kg^{-1}) or vehicle (ethanol : propylene glycol : saline, 25 : 25 : 50% respectively; 1 mL kg^{-1}). T_c was recorded for 60 min before and 180 min after drug injection; during this period, rats were kept at the same temperature in which they were habituated. The experimenter did not have any contact with the animals during the i.v. infusion. To this end, rats were equipped with a harness, connected to a tether and a swivel (Covance Infusion Harness; Instech Laboratories, Plymouth Meeting, PA, USA). The infusion was performed using a pump (Harvard Apparatus, USA) at an infusion rate of 0.08 mL min^{-1} .

Topical—Animals were treated with RN-1747 (500 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 1 mL administered at the skin of the back of the rat) or vehicle (propylene glycol) at the same volume of the drug. T_c was recorded for 60 min before and 180 min after drug application. To confirm whether the observed effect was due to the stimulation of TRPV4 channels, another group of animals were, after a period of habituation, pre-treated 30 min before administration of the agonist (or the vehicle), with a selective antagonist of TRPV4 channels, RN-1734, at a concentration of 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (3 mL administered at the skin of the animals) or vehicle (control). The volume of antagonist was bigger than the agonist to ensure that all area of administration of the agonist was blocked by the antagonist.

Intracerebroventricular—Animals were treated with RN-1747 (10 $\mu\text{g kg}^{-1}$; 4 $\mu\text{L kg}^{-1}$) or vehicle (ethanol : propylene glycol, 50% : 50%; 4 $\mu\text{L kg}^{-1}$). T_c

was recorded for 60 min before and 180 min after drug injection. The infusions were performed with a 24-gauge needle attached to a polyethylene tube (PE10) and connected with a 5.0 μL Hamilton syringe. The system was controlled by an infusion pump at a rate of 0.8 μL per min. The animal remained free in its cage during the infusion.

Experiment 2. Effect of chemical blockade of TRPV4 on T_c and autonomic thermoeffectors, thermogenesis and tail vasomotor tone. Animals were exposed to 31 °C for 40 min before i.v. injection of HC-067047 (500 $\mu\text{g kg}^{-1}$; 1 mL kg^{-1}) or vehicle (saline : ethanol, 90% : 10%; 1 mL kg^{-1}) in order to increase blood flow to the skin and guarantee that the drug would reach the TRPV4 receptors on the skin (Almeida *et al.* 2012). After injection, the animals were kept at 31 °C for 15 more minutes before being placed at the respirometer chamber. T_a at the chamber was set to 22, 26, 30 or 32 °C, as described before (Oxygen consumption). Once placed in the respirometer, metabolic rate and infrared images (Flir SC660, Portland, OR, USA) were recorded for 180 min. T_c was measure during 60 min before and 180 min after the drug injection. The tail temperature was qualitatively analysed from infrared images as an indicator of tail vasomotor tone of the rats, so the HLI, could be calculated (images were taken at 2 min interval; see Data processing and analysis). HC-067047 dose was based on pilot experiments (data not shown).

Experiment 3. Effect of TRPV4 stimulation on tail vasomotor tone. Animals were habituated at 26 °C of T_a and then were topically treated with RN-1747 (500 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 1 mL) or vehicle (propylene glycol; 1 mL), as described above. Using an infrared camera (Flir, A300 – Series), images from the animals were taken at 5-min interval before and after the treatments and the HLI was calculated as well.

Experiment 4. Effect of TRPV4 manipulation on the behavioural thermoregulation. Two-temperature preference assay—The animals were habituated, 1 day before the experiments, to the experimental conditions. On the day of experiments, animals were individually habituated for 2 h at 26 °C, treated with RN-1747 (500 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 2 mL per rat administered at the skin of the back and abdominal region of the rat) or vehicle (propylene glycol; 2 mL per rat) and, 15 min after the treatment, they were placed on the apparatus for selection between two temperatures. The apparatus (Bonther, Ribeirao Preto, SP, Brazil) consisted of two temperature-controlled aluminium plates, surrounded by acrylic barriers (length: 27.5 ×

width: 38.0 × height: 30.0 cm). In this apparatus, animal can freely cross from one plate to the other through an inverted U opening in the acrylic surface that separates the two plates. In one of the chambers, the floor was kept at 26 °C (thermoneutral – the reference temperature) and the floor temperature of the other chamber was maintained at 18 °C (subneutral temperature) or 32 °C (supraneutral temperature). The animals were placed on each side of the camera alternately, the animal position in the apparatus was recorded by a camera for 20 min, and the video was further analysed. The chambers were cleaned between animals. Temperature preference was expressed as percentage of time spent on each T_a . The number of animal crossings between the two environments was used as an exploratory behaviour rate.

Thermal gradient assay—This apparatus consisted of two parallel lanes (length: 195.0 × width: 15.0 × height: 20.0 cm each; Bonther) completely separated by a wall. The gradient's walls and grid floor were constructed of stainless steel. An acrylic lid was positioned on the top of each lane to help to maintain the T_a inside the thermal gradient. A webcam positioned at the top of the apparatus was used to take pictures of animal's position every 4 min over the experiment. One end of the gradient was cooled down with a mixture of water and ethylene glycol constantly circulated by a cooling pump (PolyScience, Niles, IL, USA). The other end was equipped with a temperature-controlled heating source (Novus, Porto Alegre, RS, Brazil). There were eight thermocouples inside each lane, evenly distributed under the grid floor, which were used to record air temperature along the apparatus. By heating one end and cooling down the other one, the lanes presented a linear thermal gradient with the hottest temperature 35 °C and the coolest 15 °C. The linear regression between air temperature and the distance of thermocouples to the heating source was calculated for each experiment, and only R^2 equal to or higher than 0.93 was accepted. Based on the position of the rats obtained from the images from the webcam and on the linear regression, the temperature selected by rats was calculated. Two animals at a time were acclimatized for approx. 18 h in the thermal gradient before the treatments. In the morning after the acclimation period, rats were placed individually in climatic chambers for 40 min at 31 °C for treatments. One of two following protocols was performed. In the first one, after i.v. injection of vehicle (saline : ethanol; 90% : 10%; 1 mL kg⁻¹) or HC-067047 (100 µg kg⁻¹; 1 mL kg⁻¹), animals were thermally stimulated (Almeida *et al.* 2006a,b) by confinement to a portion (25 cm) of T_a of 28–31 °C delimited by Plexiglas barriers inside the

thermal gradient for 3 h. At the end of this period, the barriers were removed and rats were allowed to move freely in their channel. In the other protocol, animals were treated with vehicle (propylene glycol; 1 mL) or RN-1747 (1000 µg mL⁻¹; 1 mL administered topically at the skin of the back of the rat) and placed back in the thermal gradient.

Data processing and analysis

Data are expressed as mean ± SEM. HLI was calculated by the following equation:

$$HLI = \frac{T_{tail} - T_a}{T_c - T_a}$$

where T_a is the ambient temperature, T_{tail} is the skin tail temperature, and T_c is the abdominal temperature. This index has been used to assess the thermoregulatory vasomotor response of the rat tail and its value varies from 0 to 1, indicating full vasoconstriction or vasodilation respectively (Romanovsky *et al.* 1998, 2002). Abdominal temperature was used as an index of T_c and is expressed as the variation from basal T_c , which is the average of the last 6–12 T_c measurements (0.5- to 1-h period) taken at 5-min intervals before all treatments.

Two-way repeated-measures ANOVA followed by the post-test of Holm-Sidak was used to test the effects of TRPV4 agonist and antagonists on T_c and on the selection of T_a in the gradient assay. The effects of TRPV4 antagonist on peak of delta T_c , oxygen consumption and HLI were analysed by two-way ANOVA followed by the post-test of Holm-Sidak. The effects of TRPV4 agonist on HLI were analysed by linear regression. The selection of T_a in two-temperature preference assay and the number of animal crossings were analysed by Student's *t*-test. Residuals were tested for unequal variance and normality. Differences were considered to be significant when $P < 0.05$. The data were analysed using SIGMA PLOT software 11.0 (Systat Software Inc, San Jose, CA, USA).

Results

Experiment 1. Effect of TRPV4 stimulation on T_c

Animals treated i.v. with the selective TRPV4 agonist (RN-1747; 100 µg kg⁻¹; 1 mL kg⁻¹) showed no significant difference in T_c compared to the control group ($F_{1,42} = 0.348$; $P = 1.000$; effect of treatment vs. time; Fig. 1a). However, a significant decrease in T_c of animals treated with the agonist was observed when the treatment was applied topically, compared to control ($F_{1,42} = 1.786$; $P = 0.002$; effect of treatment vs. time; Fig. 1b). Both experiments were carried out at a T_a of 26 °C.

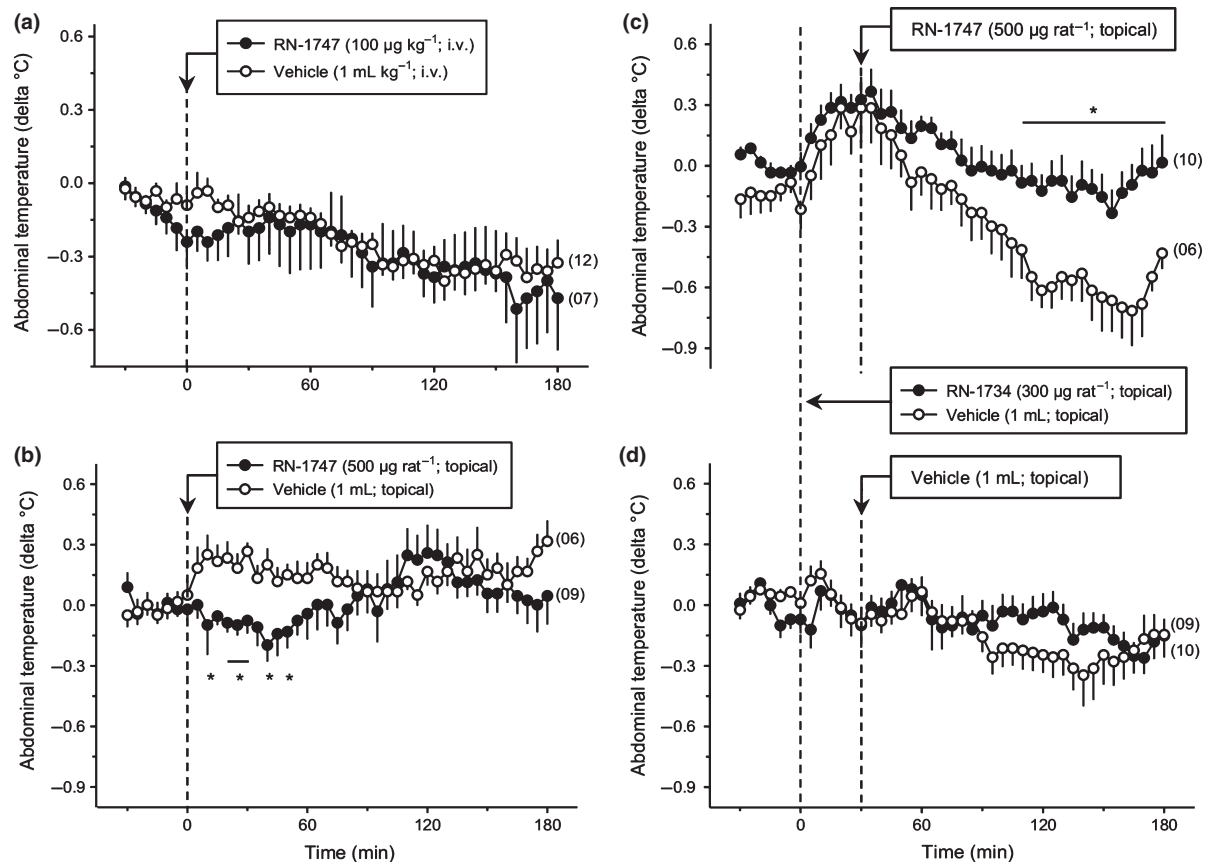


Figure 1 Effect of peripheral TRPV4 agonist (RN-1747) on T_c . Panels (a) and (b) depict, respectively, i.v. and topical administration of RN-1747 or vehicle. Panel (c) depicts the effect of pre-treatment with TRPV4 antagonist or vehicle on hypothermia induced by the agonist. Panel (d) shows the effect of pre-treatment with TRPV4 antagonist or vehicle on T_c when vehicle is applied to the skin. Topical application of RN-1747 promotes hypothermia when compared to vehicle, which disappeared when animals were pre-treated with the TRPV4 antagonist RN-1734. T_c is demonstrated as variation from basal T_c (ΔT_c). Basal T_c : (a) 37.8 ± 0.1 °C (vehicle) and 37.8 ± 0.2 °C (RN-1747); (b) 37.2 ± 0.1 °C (vehicle) and 37.2 ± 0.1 °C (RN-1747); (c) 37.0 ± 0.2 °C (vehicle pre-treated) and 36.7 ± 0.1 °C (RN-1734 pre-treated); (d) 37.3 ± 0.1 °C (vehicle pre-treated) and 37.2 ± 0.1 °C (RN-1734 pre-treated). T_a was maintained at 26 °C for this experiment. Arrows indicate the time of injections and topical applications. Numbers in parenthesis depict experimental n . *Shows points with significant interaction effect, that is effect of treatment vs. time. Data are expressed as mean \pm SEM.

To check whether the RN-1747-induced reduction on T_c was indeed caused by specific stimulation of TRPV4 channels, we blocked the channels by pre-treating the animals with a selective TRPV4 antagonist (RN-1734; 300 μg per rat; Fig. 1c,d). The prior antagonist treatment significantly inhibited RN-1747-induced hypothermia ($F_{1,42} = 1.482$; $P = 0.028$; effect of treatment vs. time). The pre-treatment with vehicle or RN-1734 (300 μg per rat) followed by vehicle treatment showed that there is no significant difference between groups ($F_{1,42} = 1.263$; $P = 0.127$; effect of treatment vs. time; Fig. 1d).

The next experiment was designed to check whether the RN-1747-induced decrease of T_c was caused by peripheral or central TRPV4 stimulation. The i.c.v. treatment with RN-1747 (10 μg kg^{-1} ; 4 μL kg^{-1})

resulted in a significant increase in T_c when compared to the control group ($F_{1,42} = 2.351$; $P < 0.001$; effect of treatment vs. time), as depicted in Figure 2.

Experiment 2. Effect of TRPV4 blockade on T_c thermogenesis and tail vasomotor tonus

Next, we studied the effect of the i.v. administration of the selective TRPV4 antagonist HC-067047 on T_c in conscious rats exposed to 22, 26, 30 and 32 °C of T_a (Fig. 3a–d). At 22 and 32 °C, HC-067047-treated animals did not present a difference in the T_c compared to controls ($F_{1,42} = 0.729$; $P = 0.897$ and $F_{1,42} = 0.392$; $P = 1.000$ respectively; effect of treatment vs. time). At intermediate T_a (26 and 30 °C), T_c of HC-067047-treated rats was significantly higher

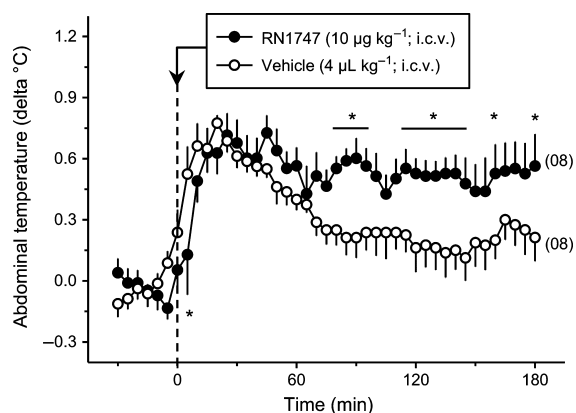


Figure 2 Effect of i.c.v. administration of TRPV4 agonist (RN-1747) on T_c . The RN-1747 treatment promoted T_c increase compared with control group. T_c is demonstrated as variation from basal T_c (delta T_c). Basal T_c : 37.3 ± 0.1 °C (vehicle) and 37.4 ± 0.1 °C (RN-1747). The animals were exposed at 26 °C of T_a . Arrows indicate the time of injection. Numbers in parenthesis depict experimental n . *Shows points with significant interaction effect, that is effect of treatment vs. time. Data are expressed as mean \pm SEM.

than vehicle-injected rats ($F_{1,42} = 3.338$; $P < 0.001$ and $F_{1,42} = 2.724$; $P < 0.001$ respectively; effect of treatment vs. time). Table 1 shows the peak T_c (higher increase of the delta T_c) reached after the injection of vehicle or HC-067047. The intertreatment difference (HC-067047 minus vehicle) was significant only at 26 °C of T_a , indicating that at this T_a we have the strongest effect of the antagonist treatment.

Because the strongest effect of the TRPV4 blockade on T_c was observed at 26 °C of T_a , we selected this temperature for observing the results related to the study of the autonomic thermoeffectors recruited in the response to TRPV4 manipulation. Figure 4a depicts the effect of the blockade of TRPV4 channels on oxygen consumption. These data were used to create the plot $\dot{V}O_2$ against T_c shown in Figure 4b. In this plot, it was observed that vehicle-treated rats occupied the same small area of the $\dot{V}O_2$ (T_c) plane throughout the experiment (i.e. T_c and $\dot{V}O_2$ remained almost constant during the experiment), whereas HC-0647047-treated rats moved away from this area as the experiment progressed ($F_{1,3} = 2.988$; $P = 0.037$; effect of treatment vs. T_c).

The effect of TRPV4 blockade on HLI was not statistically significant from control experiment ($F_{1,3} = 2.296$; $P = 0.081$; effect of treatment vs. T_c ; data not shown), although HLI was slightly lower in HC-0647047-treated rats than in vehicle-treated rats, indicating that these animals developed tail vasocon-

striction (see Fig. 5a,b). In Figure 5a,b representative thermograms show that tail temperature was higher in control (i) than HC-064707-treated rats (ii). Thus, we also tested the effect of chemical stimulation of TRPV4 with the agonist on tail vasomotor tone (see Results of Experiment 3 below).

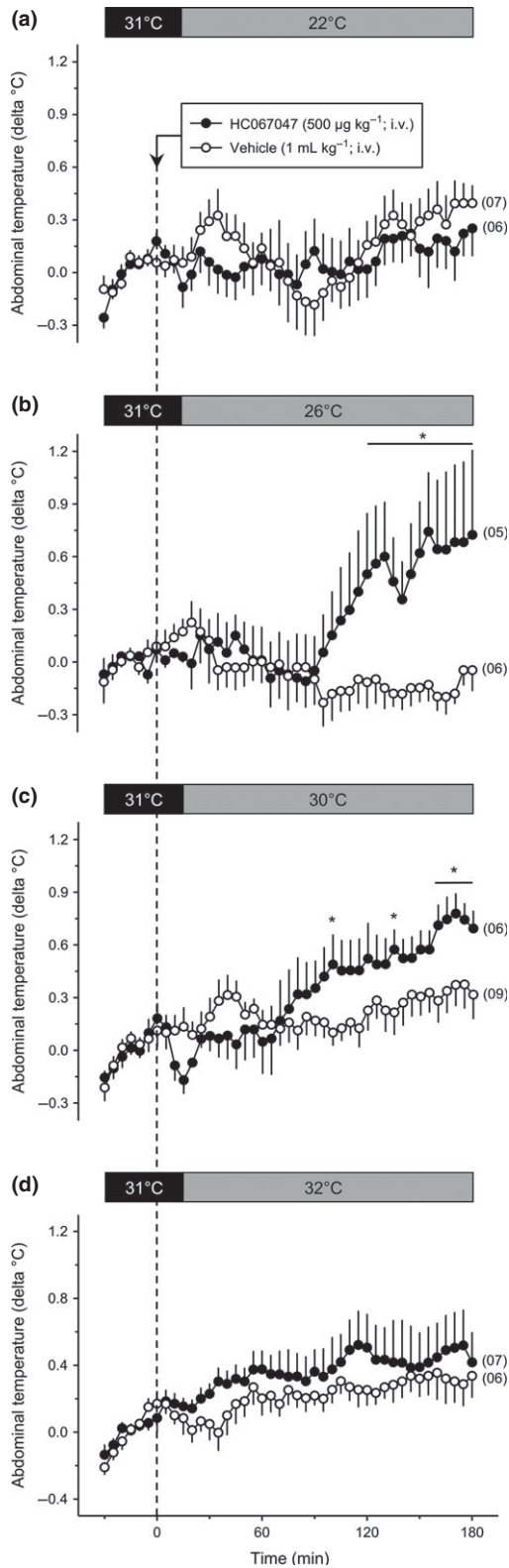
Basal initial T_c in all groups (experiments 1 and 2) varied from 36.7 to 37.8 °C (values showed in figure legends). There is no significant difference in basal T_c between drug and vehicle treated prior to the stimulation or blockade of TRPV4 channels in any of the groups.

Experiment 3. Effect of TRPV4 stimulation on tail vasomotor tonus

Based on linear regression between HLI against T_c , in vehicle treatment, there is no relation between HLI and T_c ($P = 0.699$, $R^2 = 0.00544$; Fig. 6a), while in RN-1747-treated animals, there is a negative relation ($P = 0.009$, $R^2 = 0.221$; Fig. 6b), indicating that tail cutaneous vasodilation contributed to the decrease in T_c observed after chemical stimulation of TRPV4 channels in the skin. Representative thermograms are shown in Figure 6c–e. Tail temperatures of untreated and vehicle-treated rats are similar and lower than RN-1747-treated rats, indicating that TRPV4 activation stimulates vasodilatation decreasing the T_c .

Experiment 4. Effect of TRPV4 manipulation on the behavioural thermoregulation

Two-temperature preference assay. The number of animal crossings between the two environments was similar for both vehicle- and RN-1747-treated animals (26 vs. 18 °C: vehicle mean \pm SEM = 17 ± 3 , RN-1747 mean \pm SEM = 18 ± 3 , $P = 0.738$ and 26 vs. 32 °C: vehicle mean \pm SEM = 25 ± 4 , RN-1747 mean \pm SEM = 18 ± 3 , $P = 0.221$, t -test; data not shown), indicating that the TRPV4 agonist treatment did not affect rat's exploratory behaviour. No significant difference was observed comparing the RN-1747-treated ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$; 2 mL per rat) with vehicle-treated (2 mL per rat) groups at any condition analysed in this study (26 vs. 18 °C: $P = 0.770$, t -test and 26 vs. 32 °C: $P = 0.871$, t -test; Fig. 7a). By analysing time spent in each environment, for 26 vs. 18 °C, both treatments, either the vehicle ($P = 0.002$, t -test) or RN-1747 treated ($P < 0.001$, t -test) preferred 26 °C over 18 °C of floor temperature. However, for the 26 vs. 32 °C challenge, animals treated with vehicle showed a significant preference for temperature of 32 °C over 26 °C ($P = 0.020$, t -test), while for animals treated with RN-1747, this difference was not statistically significant ($P = 0.135$, t -test), indicating



that there is no place preference for TRPV4-stimulated animals (Fig. 7b) under this condition. Although weak, this result inspired us to further explore the

Figure 3 Effect of *i.v.* administration of TRPV4 antagonist (HC-067047) on T_c at different T_{as} . The animals were exposed at 22° (a), 26° (b), 30° (c) and 32 °C (d) of T_{as} . T_c was significantly higher in HC-067047-treated than controls at 26 and 30 °C of T_a . T_c is demonstrated as variation from basal T_c (delta T_c). Basal T_c : (a) 37.3 ± 0.1 °C (vehicle) and 37.4 ± 0.1 °C (HC-067047); (b) 37.4 ± 0.2 °C (vehicle) and 37.3 ± 0.2 °C (HC-067047); (c) 37.1 ± 0.1 °C (vehicle) and 37.5 ± 0.1 °C (HC-067047); (d) 37.3 ± 0.1 °C (vehicle) and 37.4 ± 0.1 °C (HC-067047). Arrows indicate the time of injection. Numbers in parenthesis depict experimental *n*. *Shows points with significant interaction effect, that is effect of treatment vs. time. Data are expressed as mean \pm SEM.

involvement of TRPV4 channels in the recruitment of a thermoregulatory behaviour in a thermal gradient.

Thermal gradient assay. The thermal exposure (28–31 °C) led the control animals to seek colder areas than those animals treated with antagonist (HC-064707; $100 \mu\text{g kg}^{-1}$; 1 mL kg^{-1}) after confinement ($F_{1,10} = 5.09$; $P = 0.048$, effect of treatment; $F_{1,10} = 3.13$; $P < 0.001$, effect of time; no interaction effect; Fig. 8a). The T_c of HC-064707-treated animals was higher than control animals (37.5 ± 0.1 °C vs. 37.0 ± 0.1 °C respectively. $F_{1,10} = 1.44$; $P = 0.01$, effect of treatment vs. time). Corroborating this result, the chemical stimulation of the channel with TRPV4 agonist (RN-1747; $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$; 1 mL topical) caused a reduction of preferred T_a compared to vehicle-treated animals ($F_{1,9} = 4.18$; $P < 0.001$, effect of treatment vs. time; Fig. 8b) and reduced the T_c over the time as well (the T_c decreased up to 0.7 ± 0.2 °C after agonist treatment, but it presented just a slight change in those vehicle-treated animals: -0.1 ± 0.2 °C; $F_{1,8} = 1.41$; $P = 0.02$, effect of treatment vs. time).

Discussion

In the present study, we tested whether chemical activation or blockade of the warmth-sensitive TRPV4 channels exerts an effect on T_c and which thermoeffector (autonomic and/or behavioural) is involved in this response. Based on the *in vitro* temperature range of TRPV4 activation, we hypothesized that moderate warmth temperatures activate *in vivo* peripheral TRPV4 channels which in turn activate warmth-defence responses, maintaining T_c at regulated levels. The results indicate that cutaneous TRPV4 is physiologically activated *in vivo* at T_{as} in the range of 26–30 °C in the conditions used in the present study. TRPV4 seems to be involved in the activation of both autonomic and behavioural warmth-defence responses.

Table 1 Peak of delta core body temperature (T_c) at different ambient temperatures (T_a)

T_a (°C)	T_c control (delta °C)	T_c HC-067047 (delta °C)	
	Peak \pm SEM	Peak \pm SEM	Peak Diff; P value
22	0.7 \pm 0.2	0.6 \pm 0.1	-0.1; $P = 0.792$
26	0.4 \pm 0.2	1.1 \pm 0.2	0.7; $P = 0.009$
30	0.7 \pm 0.1	0.9 \pm 0.2	0.2; $P = 0.369$
32	0.6 \pm 0.2	0.9 \pm 0.2	0.3; $P = 0.184$

Peak Diff., peak difference. Peak differences were calculated subtracting the peak value of the HC-067047-treated from the vehicle-treated (control) animals.

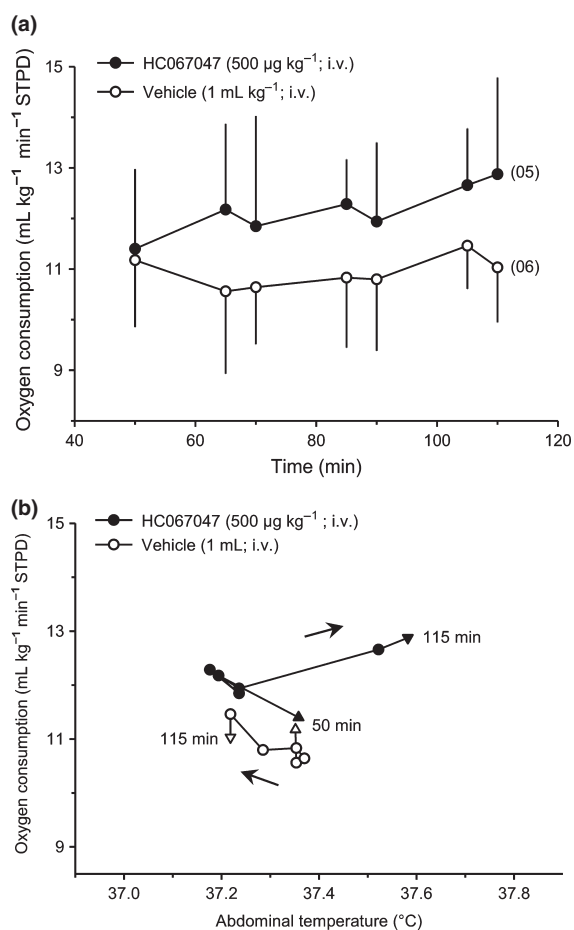


Figure 4 Effect of i.v. administration of TRPV4 antagonist (HC-067047) on $\dot{V}O_2$. Panel (a) describes the $\dot{V}O_2$ over time of experiment, and in panel (b), $\dot{V}O_2$ is plotted against T_c between 50 and 110 min after injection. HC-067047-induced hyperthermia was accompanied by increase in, which does not occur in the control group. The direction of time is shown with arrows with initial and final times indicated by regular or inverted triangle symbol respectively. T_a over experiment was 26 °C. Numbers in parenthesis depict experimental n . Data in panel (a) are expressed as mean \pm SEM.

Moreover, topical activation and intravenous blockade of this channel caused decrease and increase of T_c , respectively, when T_a was fixed at 26 °C. TRPV4 blockade-induced rise of T_c at 26 °C of T_a was accompanied by an increase in oxygen consumption (an index of thermogenesis), and chemical activation of TRPV4 channels through topical application of RN-1747 leads to a reduction of T_c that was influenced by tail vasomotor tone. These results indicate TRPV4-mediated recruitment of autonomic thermoeffector reduces heat production and increases heat loss in rats. Moreover, rats chemically stimulated with TRPV4 agonist lean towards colder T_{as} , and the animals thermally stimulated (exposure to 28–31 °C) did not select colder T_{as} when injected with the TRPV4 antagonist, compared with vehicle group. These interesting results indicate a clear role of TRPV4 in the facilitation of heat loss responses through behaviour in rats.

Although previous studies have suggested TRPV4 to be a thermosensor, a thermoregulatory role for these channels has not been proposed as TRPV4 knockout (KO) mice acclimated at 25 °C of T_a (Lee *et al.* 2005) or cold (Liedtke & Friedman 2003) presented similar T_c compared to its wild-type littermates. However, negative results with KO animals are difficult to interpret, especially because in these animals compensatory mechanisms may occur (Mogil *et al.* 2000, Lariviere *et al.* 2001), and thus these data do not exclude the participation of TRPV4 channels in thermoregulation. In fact, in the case of TRPV1, no thermoregulatory change was observed in TRPV1 KO animal studies (Szelényi *et al.* 2004, Iida *et al.* 2005) or by TRPV1 gene silencing (Christoph *et al.* 2006), although it was later shown that these channels play a role in the maintenance of T_c (Steiner *et al.* 2007). Using pharmacological tools and altering the activity of the TRPV4 channel temporarily, we did not allow for long-term compensatory mechanisms to occur and we were able to show, for the first time, the involvement

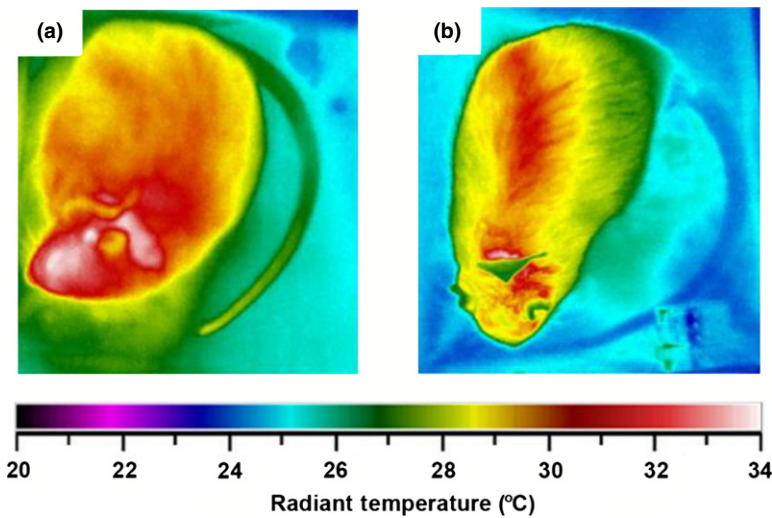


Figure 5 Effect of i.v. administration of TRPV4 antagonist (HC-067047) on tail temperature (an index of tail vasomotor tone). Tail infrared images of representative animals from different groups are shown: vehicle treated (a) and HC-067047 treated (b). T_a over experiment was 26 °C.

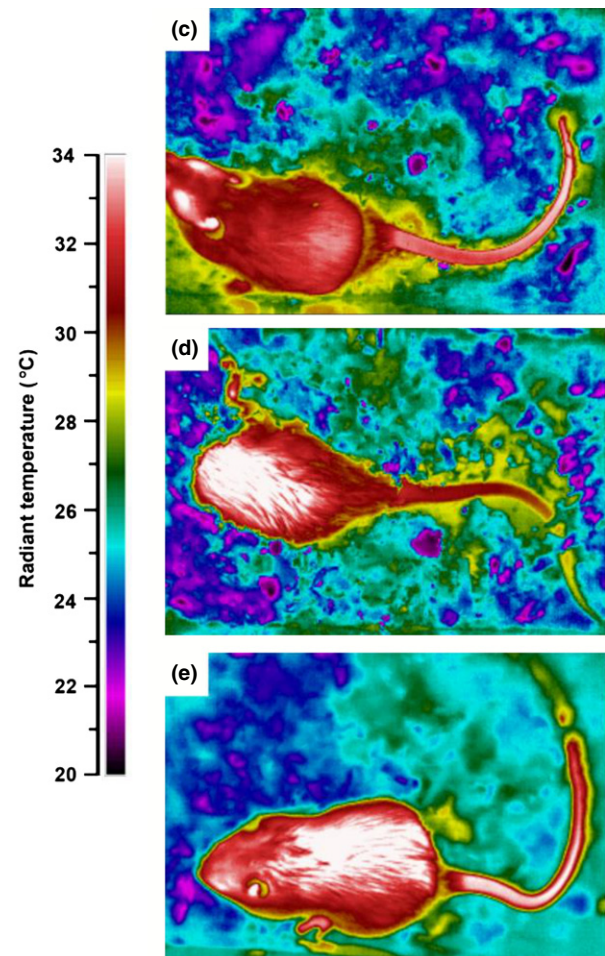
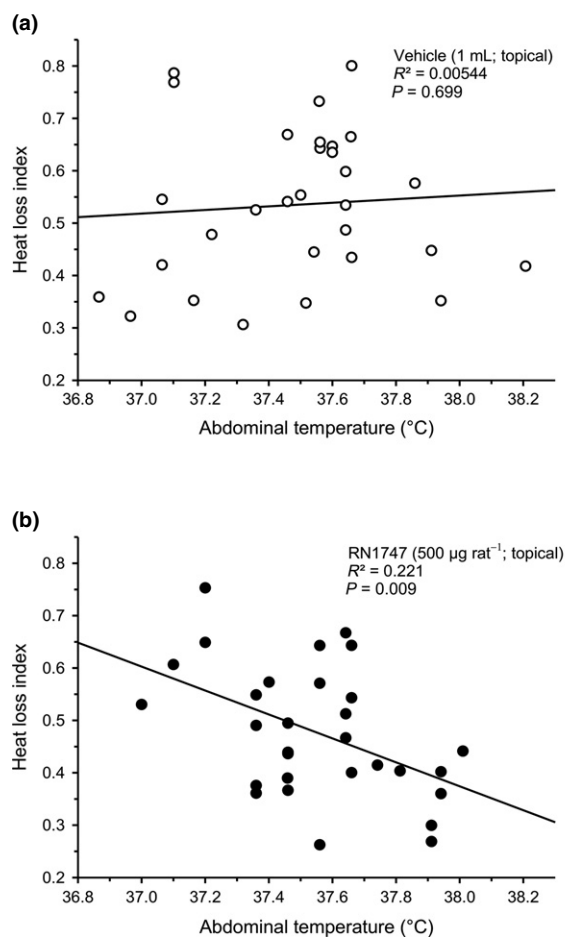


Figure 6 Effect of topical application of TRPV4 agonist (RN-1747) on tail vasomotor tone. The data relate to topical treatment, applied to the skin at the back of the animal, with RN-1747 or vehicle ($n = 6$ per group). Panels (a) and (b) describe the relation between HLI and T_c for vehicle- and RN-1747-treated animals, respectively, from time 0 to 20 min after treatment. On the right panel, tail infrared images of representative animals from different groups are shown: untreated animals (c), treated with vehicle (d) and with RN-1747 (e). Animals were exposed at 26 °C of T_a . Numbers in parenthesis depict experimental n . HLI, heat loss index.

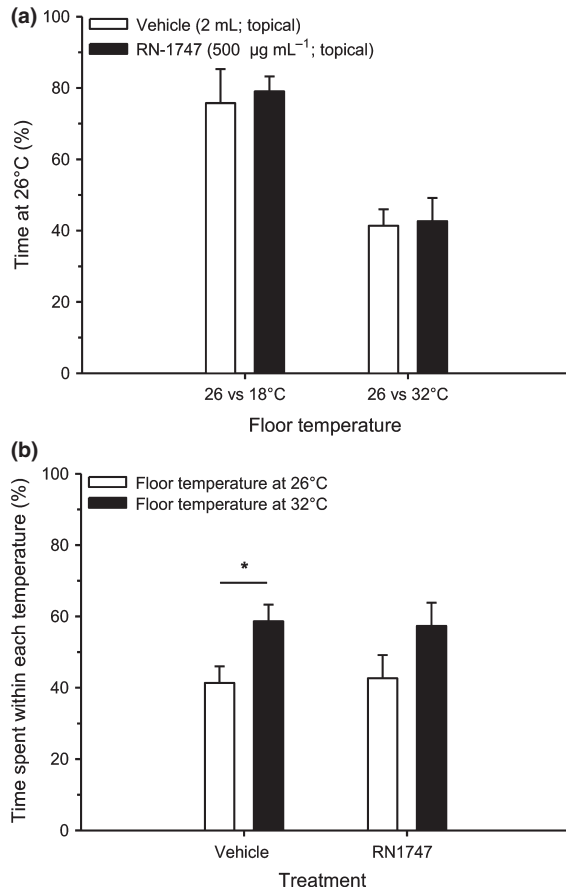


Figure 7 Effect of topical application of TRPV4 agonist (RN-1747) in the two-temperature preference assay. The data relate the percentage of time at 26 °C (reference temperature) to topical treatment, applied to the skin at the abdomen and back of the animal, with vehicle or RN-1747 in animals submitted to two-temperature preference assay ($n = 7\text{--}8$ per group) under two conditions: 18 vs. 26 or 26 vs. 32 °C (a). Data in (b) express the time spent in each temperature for control and RN-1747-treated rats in the condition of 26 vs. 32 °C. $n = 7\text{--}8$ per group. *Shows significant difference ($P < 0.05$). Data are expressed as mean \pm SEM.

of these receptors in the maintenance of an adequate T_c in a living and non-genetically modified organism.

Role of TRPV4 when T_a is fixed

Our data showed that animals kept at 26 °C of T_a did not display changes in T_c when treated *i.v.* with RN-1747, but their T_c remained significantly lower than controls when the agonist was applied to the skin (Fig. 1a,b). Because TRPV4 channels are expressed in skin keratinocytes (Patapoutian *et al.* 2003), we supposed that *i.v.* route of administration of the drug might not be delivering a sufficient amount of the drug to its site of action, as at 26 °C the skin vasodilation is relatively low. Indeed, chemical activation of

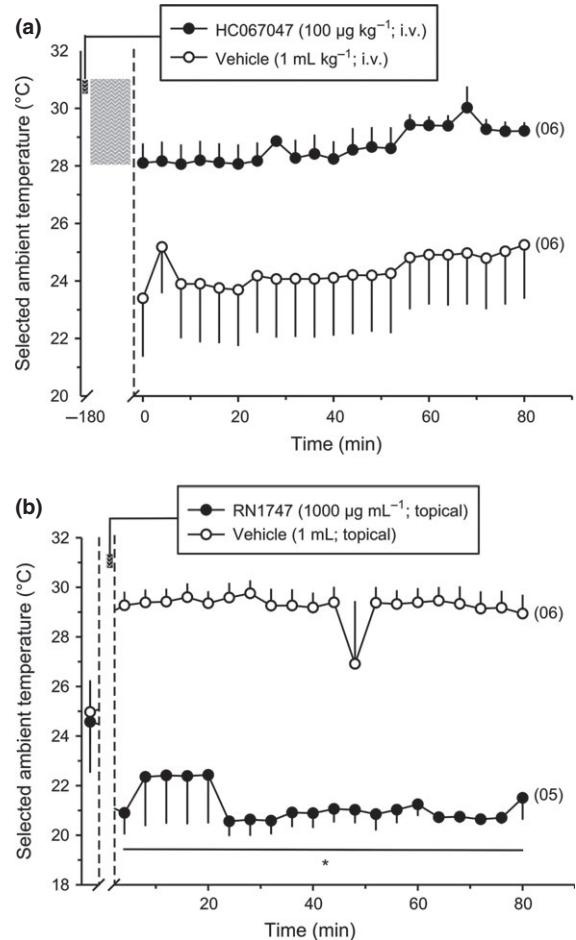


Figure 8 Effect of thermal and chemical TRPV4 stimulation in the thermal gradient assay. Panel (a) shows the selected T_a by rats after being pre-treated with vehicle or TRPV4 antagonist (HC-067047) and confined between 28 and 31 °C for 3 h (indicated in the graph by the grey area). Panel (b) depicts the selected T_a by animals treated with vehicle or TRPV4 agonist (RN-1747). Numbers in parenthesis depict experimental n . *Shows points with significant interaction effect, that is effect of treatment vs. time. Data are expressed as mean \pm SEM.

TRPV4 channels by topical application of RN-1747 on the skin of the animal led to a reduction on T_c , indicating the drug was presumably being delivered to its site of action (Fig. 1b). This topical application has been previously shown to be quite efficient for inducing hyperthermia after treatment with menthol (an agonist of the cold-activated TRPM8 channel) (Almeida *et al.* 2012), whereas *i.v.* application of menthol did not cause changes in T_c (Almeida *et al.* 2006a).

To test the specificity of the RN-1747-induced reduction of T_c (if this effect was mediated by TRPV4 channels), we tested the effect of the pre-treatment with the specific antagonist of this channel (RN-1734). Animals pre-treated with RN-1734 presented a

reduced hypothermic response to the agonist and the antagonist itself did not alter the T_c , confirming that the observed effect was due to the action of the drug at TRPV4 channels (Fig. 1c,d).

To check whether the effect of TRPV4 activation on T_c was due to activation of peripheral (skin) or central (central nervous system) receptors, we proceeded with the i.c.v. administration of RN-1747. In this assay, the treated and control animals had an increase of T_c due to the stress of handling; however, over time, the RN-1747-treated animals were hyperthermic compared to control (Fig. 2). TRPV4 channels are expressed at the central nervous system, in the hypothalamus, for example, which is an important site for thermoregulation (Liedtke *et al.* 2000, Güler *et al.* 2002). Furthermore, there is evidence that TRPV4 channels in the central nervous system work as hypo-osmolarity sensors (Strotmann *et al.* 2000, Liedtke & Friedman 2003, Liedtke *et al.* 2003, Liedtke 2005) and osmoregulatory dysfunction can lead to inflammatory processes involving the TRPV4 channel (Alessandri-Haber *et al.* 2005, Vergnolle *et al.* 2010). If TRPV4 stimulation with RN-1747 induced a false interpretation of osmolarity alteration, it would promote a local inflammatory process that would result in the increase of T_c observed after i.c.v. treatment with the TRPV4 agonist. Because the central vs. peripheral thermoregulatory effects of chemical TRPV4 stimulation were opposite (increase vs. decrease of T_c respectively), we concluded that the hypothermic effect of RN-1747 was due to action of the drug at the periphery (receptors presumably located in the skin).

Although these results point to an involvement of TRPV4 channels in the induction of warmth-defence responses, at 26 °C of T_a , skin temperature of rats (where TRPV4 channels are presumably located) is approx. 29.5 °C, and thus some activation of TRPV4 channels by temperature may already be occurring, which would explain why the effects of chemical stimulation of these channel are weak. Thus, for studying the involvement of these channels in the thermoregulatory effectors, we designed an experiment in which we used blockade of the channel (using a more potent and selective antagonist of TRPV4 channel, HC-067047) and increase of T_a (for promoting a thermal, instead of chemical stimulation of the channel). In this case, to facilitate the antagonist reaching the receptor sites in the skin after i.v. injection, we temporarily exposed all the animals to warm temperatures to increase blood flow to the skin as previously described (Almeida *et al.* 2012), before the exposure to experimental T_{as} . By blocking TRPV4 channels and changing T_a in a series of distinct stages and experiments (from 22 to 32 °C), we observed that a rise of T_c occurred in T_a of 26 and 30 °C (Fig. 3 and

Table 1), which is consistent with our initial hypothesis that warm temperatures activate TRPV4 channels. When we blocked these channels, the defence responses to warmth were not activated and hyperthermia occurred. We did not see an increase in T_c at 22 °C, as this T_a is below the range of activation of TRPV4 channels, nor at 32 °C of T_a , possibly because there is activation of other temperature-sensitive TRP channels at this T_a , such as TRPV3 (Caterina 2007).

The next step of our study was planned to check which thermoeffector was activated and/or inhibited during the thermoregulatory response to TRPV4 manipulation. We showed that both autonomic thermoeffectors, thermogenesis and tail vasomotor tone, are modulated during the TRPV4 thermoregulatory response. Oxygen consumption, which is an index of thermogenesis, increased slightly over time in animals treated with HC-067047 compared to controls (Fig. 4), corroborating with studies where TRPV4 KO mice and adipocytes isolated from them had increased oxygen consumption compared to wild-type cells and animals respectively (Kusudo *et al.* 2012, Ye *et al.* 2012). In the present study, the animals that had their TRPV4 pharmacologically blocked by the antagonist consumed 1.24 ± 0.2 mL O₂ kg⁻¹ min⁻¹ more than vehicle-treated rats. Assuming that each mL of oxygen consumed produces 20.3 J (Randall *et al.* 1997), this small augment was enough to produce 1.5 kJ in 60 min (between 50 and 110 min; $1.24 \times 60 \times 20.3$), which is sufficient to increase the T_c by 0.7 °C in rats of 300 g (Fig. 3b; $Q = mc(t)$, where Q is heat energy, m is mass, c is the specific heat, considered to be 3.47 J for biological tissues, and (t is temperature variation, 0.7 °C) (Schmidt-Nielsen 1997, Da Silva & Maia 2013). Although the HLI along the time seemed to be lower in HC-067047-treated animals, it was not statistically different from the control group (Fig. 5a–d). In contrast, animals presented higher tail temperatures (indicating vasodilation) in response to the chemical stimulation of TRPV4 channels (Fig. 6). Together, these data reveal that blocking TRPV4-mediated warmth signalling from the skin inactivated warmth-defence responses, increasing T_c . Besides, stimulating warmth receptors with a TRPV4 agonist can activate (at least vasomotor response) warmth-defence responses and decrease T_c .

Role of TRPV4 when T_a can be selected by the animal

Regarding behavioural thermoregulatory responses, we used three different approaches. In the first one, animals had the chance to choose between two temperatures and were challenged with neutral vs. warmth (26 vs. 32 °C) and cold vs. neutral (18 vs. 26 °C) environments. In this test, we did not observe a significant effect of the treatment with the TRPV4

agonist compared with the control in any studied condition (26 vs. 32 °C and 18 vs. 26 °C) in the time spent at 26 °C (reference temperature); however, animals treated with vehicle showed a significant preference for the temperature of 32 °C over 26 °C, while in animals treated with RN-1747, this difference was not statistically significant (there is no place preference, i.e. rats spend similar amount of time in both environments) due to the slight augmentation of time spent at 26 °C over 32 °C. This result indicates that TRPV4 activation might be stimulating a thermoregulatory behaviour to facilitate heat loss, and so developing hypothermia. Under the condition 26 vs. 18 °C, both vehicle- and RN-1747-treated rats preferred 26 °C over 18 °C, indicating, possibly due to the range of activation of TRPV4 channels, that RN-1747-treated rats do not necessarily select a T_{as} so much colder (like 18 °C) than thermoneutrality to provide thermal comfort.

To further test the involvement of TRPV4 on behavioural thermoregulation, we studied rats in a thermal gradient and we verified very clear thermoregulatory responses. In the first approach, animals were transiently confined to a region of the thermal gradient where T_{as} was between 28 and 31 °C in order to verify a possible cold-seeking behaviour of rats after this thermal stimulation (Almeida *et al.* 2006a). In fact, control animals preferred colder T_a than the HC-067047-treated ones (Fig. 8a). In another set of experiments, chemical stimulation of the TRPV4 in non-confined animals in the thermal gradient led them to seek lower T_a than control ones (Fig. 8b). Both results clearly indicate that TRPV4 stimulation activates cold-seeking behaviour.

Taken together, our results indicate that if animals have the chance to select a T_a of preference, TRPV4 stimulation will successfully activate the behaviour thermoeffector, in order to regulate T_c , which agrees with a parsimonious priority given to its kind of effector, which is very efficient and energetically less expensive than the autonomic thermoeffectors. However, when animals are not allowed to thermoregulate behaviourally, TRPV4 stimulation will activate autonomic thermoeffectors to regulate T_c . We showed here, for the first time, a role of TRPV4 in the activation of non-evaporative heat loss and inhibition of heat gain *in vivo* in rats.

Although TRPV4 channels were characterized approx. 10 years ago, a range of functional studies were developed and different biological functions for these channels were assigned, such as regulation and sensation of osmolarity in the central nervous system (Strotmann *et al.* 2000, Liedtke & Friedman 2003, Liedtke *et al.* 2003), thermoreception (Lee *et al.* 2005), participation in inflammatory responses (Vergnolle *et al.* 2010, Bang *et al.* 2012, Denadai-Souza

et al. 2012, Ye *et al.* 2012, Poole *et al.* 2013), nociceptive (Alessandri-Haber *et al.* 2003, 2005, Nakatsuka & Iwai 2009, Everaerts *et al.* 2010a) and hyperalgesia responses (Todaka *et al.* 2004, Alessandri-Haber *et al.* 2009, Ding *et al.* 2010, Wang *et al.* 2011, Segond von Banchet *et al.* 2013), among others. The present study adds the participation of TRPV4 channels to the regulation of T_c in rats. In recent years, thermo-TRP channels have been suggested to be a target for the development of new therapeutic strategies. However, it appears that many of compounds submitted for clinical trial are far from successful, in particular due to the occurrence of side effects (Ferrer-Montiel *et al.* 2012). A better understanding of the functions of these channels is essential for developing strategies for modulating the activity of thermo-TRP channels with an improved therapeutic index. The development of this study aims at contributing to improve the knowledge regarding the functions of this receptor with respect to the thermoregulatory system, thus providing important data that may contribute to the development of these therapeutic strategies.

Conflict of interest

The authors of this manuscript have no competing interests.

We would like to thank the Cognition and Complex Systems Nuclei of UFABC (NCSC/UFABC) and the Department of Animal Morphology and Physiology of FCAV-UNESP for providing the infrastructure required for developing the experimental procedures. This work was financially supported by CNPq (Grant 470742/2010-0 to M.C.A.) and FAPESP (Grants 2011/06528-1 to M.C.A., 2012/19966-0 to LHG, 2009/11446-4 to D.C.C.; FAPESP graduate fellowship grants: 2012/11836-0 to R.C.L.V. and 2011/19131-2 to C.S.S.). We thank Samuel P. Wanner for critically reading the first version of this manuscript.

Author contributions

R.C.L.V., C.S.S., D.I., K.C.B. and M.C.A. involved in conception and design. L.H.G., D.C.C., K.C.B. and M.C.A. helped in financial support. R.C.L.V., C.S.S., D.I., G.M.C., C.O.S. and M.C.A. participated in collection and assembly of data. R.C.L.V., C.S.S., D.I., G.M.C., C.O.S., L.H.G., D.C.C., K.C.B. and M.C.A. performed data analysis and interpretation. R.C.L.V., C.S.S., K.C.B. and M.C.A. performed manuscript writing.

References

Aihara, H., Okada, Y. & Tamaki, N. 2001. The effects of cooling and rewarming on the neuronal activity of pyrami-

- dal neurons in guinea pig hippocampal slices. *Brain Res* **893**, 36–45.
- Alessandri-Haber, N., Yeh, J.J., Boyd, A.E., Parada, C.A., Chen, X., Reichling, D.B. & Levine, J.D. 2003. Hypotonicity induces TRPV4-mediated nociception in rat. *Neuron* **39**, 497–511.
- Alessandri-Haber, N., Joseph, E., Dina, O.A., Liedtke, W. & Levine, J.D. 2005. TRPV4 mediates pain-related behavior induced by mild hypertonic stimuli in the presence of inflammatory mediator. *Pain* **118**, 70–79.
- Alessandri-Haber, N., Dina, O.A., Chen, X. & Levine, J.D. 2009. TRPC1 and TRPC6 channels cooperate with TRPV4 to mediate mechanical hyperalgesia and nociceptor sensitization. *J Neurosci* **29**, 6217–6228.
- Almeida, M.C., Steiner, A.A., Branco, L.G. & Romanovsky, A.A. 2006a. Cold-seeking behavior as a thermoregulatory strategy in systemic inflammation. *Eur J Neurosci* **23**, 3359–3367.
- Almeida, M.C., Steiner, A.A., Branco, L.G. & Romanovsky, A.A. 2006b. Neural substrate of cold-seeking behavior in endotoxin shock. *PLoS ONE* **1**, e1.
- Almeida, M.C., Hew-Butler, T., Soriano, R.N., Rao, S., Wang, W., Wang, J., Tamayo, N., Oliveira, D.L., Nucci, T.B., Aryal, P., Garami, A., Bautista, D., Gavva, N.R. & Romanovsky, A.A. 2012. Pharmacological blockade of the cold receptor TRPM8 attenuates autonomic and behavioral cold defenses and decreases deep body temperature. *J Neurosci* **32**, 2086–2099.
- Bang, S., Yoo, S., Yang, T.J., Cho, H. & Hwang, S.W. 2012. Nociceptive and pro-inflammatory effects of dimethylallyl pyrophosphate via TRPV4 activation. *Br J Pharmacol* **166**, 1433–1443.
- Bicego, K.C., Barros, R.C. & Branco, L.G. 2007. Physiology of temperature regulation: comparative aspects. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **147**, 616–639.
- Caterina, M.J. 2007. Transient receptor potential ion channels as participants in thermosensation and thermoregulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **292**, R64–R76.
- Christoph, T., Grünweller, A., Mika, J., Schäfer, M.K., Wade, E.J., Weihe, E., Erdmann, V.A., Frank, R., Gillen, C. & Kurreck, J. 2006. Silencing of vanilloid receptor TRPV1 by RNAi reduces neuropathic and visceral pain in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* **350**, 238–243.
- Da Silva, R.G. & Maia, A.S.C. 2013. Thermal balance and thermoregulation. In: R.G. Da Silva & A.S.C. Maia (eds) *Principles of Animal Biometeorology*, pp. 75–106. Springer, Dordrecht, Netherlands.
- Delany, N.S., Hurlle, M., Facer, P., Alnadaf, T., Plumpton, C., Kinghorn, I., See, C.G., Costigan, M., Anand, P., Woolf, C.J., Crowther, D., Sanseau, P. & Tate, S.N. 2001. Identification and characterization of a novel human vanilloid receptor-like protein, VRL-2. *Physiol Genomics* **4**, 165–174.
- Denadai-Souza, A., Martin, L., de Paula, M.A., de Avellar, M.C., Muscara, M.N., Vergnolle, N. & Cenac, N. 2012. Role of transient receptor potential vanilloid 4 in rat joint inflammation. *Arthritis Rheum* **64**, 1848–1858.
- Ding, X.L., Wang, Y.H., Ning, L.P., Zhang, Y., Ge, H.Y., Jiang, H., Wang, R. & Yue, S.W. 2010. Involvement of TRPV4-NO-cGMP-PKG pathways in the development of thermal hyperalgesia following chronic compression of the dorsal root ganglion in rats. *Behav Brain Res* **208**, 194–201.
- Everaerts, W., Nilius, B. & Owsianik, G. 2010a. The vanilloid transient receptor potential channel TRPV4: from structure to disease. *Prog Biophys Mol Biol* **103**, 2–17.
- Everaerts, W., Zhen, X., Ghosh, D., Vriens, J., Gevaert, T., Gilbert, J.P., Hayward, N.J., McNamara, C.R., Xue, F., Moran, M.M. *et al.* 2010b. Inhibition of the cation channel TRPV4 improves bladder function in mice and rats with cyclophosphamide-induced cystitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 19084–19089.
- Ferrer-Montiel, A., Fernández-Carvajal, A., Planells-Cases, R., Fernández-Ballester, G., González-Ros, J.M., Messeguer, A. & González-Muñiz, R. 2012. Advances in modulating thermosensory TRP channels. *Expert Opin Ther Pat* **22**, 999–1017.
- Gordon, C.J. 1990. Thermal biology of the laboratory rat. *Physiol Behav* **47**, 963–991.
- Güler, A.D., Lee, H., Iida, T., Shimizu, I., Tominaga, M. & Caterina, M. 2002. Heat-evoked activation of the ion channel, TRPV4. *J Neurosci* **22**, 6408–6414.
- Iida, T., Shimizu, I., Nealen, M.L., Campbell, A. & Caterina, M. 2005. Attenuated fever response in mice lacking TRPV1. *Neurosci Lett* **378**, 28–33.
- Kauer, J.A. & Gibson, H.E. 2009. Hot flash: TRPV channels in the brain. *Trends Neurosci* **32**, 215–224.
- Kusudo, T., Wang, Z., Mizuno, A., Suzuki, M. & Yamashita, H. 2012. TRPV4 deficiency increases skeletal muscle metabolic capacity and resistance against diet-induced obesity. *J Appl Physiol* **7**, 1223–1232.
- Lariviere, W.R., Chesler, E.J. & Mogil, J.S. 2001. Transgenic studies of pain and analgesia: mutation or background genotype? *J Pharmacol Exp Ther* **297**, 467–473.
- Lee, H., Iida, T., Mizuno, A., Suzuki, M. & Caterina, M.J. 2005. Altered thermal selection behavior in mice lacking transient receptor potential vanilloid 4. *J Neurosci* **25**, 1304–1310.
- Liedtke, W. 2005. TRPV4 as osmosensor: a transgenic approach. *Pflugers Arch* **451**, 176–180.
- Liedtke, W. & Friedman, J.M. 2003. Abnormal osmotic regulation in *trpv4*^{-/-} mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 13698–13703.
- Liedtke, W., Choe, Y., Marti-Renom, M.A., Bell, A.M., Denis, C.S., Sali, A., Hudspeth, A.J., Friedman, J.M. & Heller, S. 2000. Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. *Cell* **103**, 525–535.
- Liedtke, W., Tobin, D.M., Bargmann, C.I. & Friedman, J.M. 2003. Mammalian TRPV4 (VR-OAC) directs behavioral responses to osmotic and mechanical stimuli in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(Suppl 2), 14531–14536.
- Lighton, J.R.B. 2008. Flow-through respirometry: the equations. In: J.R.B. Lighton (ed.) *Measuring Metabolic Rates. A Manual for Scientists*, pp. 100–104. Oxford University Press, New York, NY.
- Mogil, J.S., Yu, L. & Basbaum, A.I. 2000. Pain genes?: natural variation and transgenic mutants. *Annu Rev Neurosci* **23**, 777–811.

- Morrison, S.F. & Nakamura, K. 2011. Central neural pathways for thermoregulation. *Front Biosci* **16**, 74–104.
- Nakatsuka, M. & Iwai, Y. 2009. Expression of TRPV4 in the stimulated rat oral mucous membrane–nociceptive mechanisms of lingual conical papillae. *Okajimas Folia Anat Jpn* **86**, 45–54.
- Patapoutian, A., Peier, A.M., Story, G.M. & Viswanath, V. 2003. ThermoTRP channels and beyond: mechanisms of temperature sensation. *Nat Rev Neurosci* **4**, 529–539.
- Persson, P.B. 2013. Good publication practice in physiology 2013 guidelines for Acta Physiologica. *Acta Physiol (Oxf)* **209**, 250–253.
- Poole, D.P., Amadesi, S., Veldhuis, N.A., Abogadie, F.C., Lieu, T., Darby, W., Liedtke, W., Lew, M.J., McIntyre, P. & Bunnett, N.W. 2013. Protease-activated receptor 2 (PAR2) protein and transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) protein coupling is required for sustained inflammatory signaling. *J Biol Chem* **288**, 5790–5802.
- Randall, D., Burggren, W. & French, K. 1997. Using energy: meeting environmental challenges. In: D. Randall, W. Burggren & K. French (eds) *Eckert Animal Physiology: Mechanisms and Adaptations*, pp. 665–723. W. H. Freeman Company, New York.
- Romanovsky, A.A. 2007. Thermoregulation: some concepts have changed. Functional architecture of the thermoregulatory system. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **292**, 37–46.
- Romanovsky, A.A., Simons, C.T. & Kulchitsky, V.A. 1998. “Biphasic” fevers often consist of more than two phases. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **275**, R323–R331.
- Romanovsky, A.A., Ivanov, A.I. & Shimansky, Y.P. 2002. Selected contribution: ambient temperature for experiments in rats: a new method for determining the zone of thermal neutrality. *J Appl Physiol* **92**, 2667–2679.
- Schmidt-Nielsen, K. 1997. Temperature regulation. In: K. Schmidt-Nielsen (ed.) *Animal Physiology: adaptation and environment*, pp. 241–300. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Segond von Banchet, G., Boettger, M.K., König, C., Iwakura, Y., Bräuer, R. & Schaible, H.G. 2013. Neuronal IL-17 receptor upregulates TRPV4 but not TRPV1 receptors in DRG neurons and mediates mechanical but not thermal hyperalgesia. *Mol Cell Neurosci* **52**, 152–160.
- Steiner, A.A., Turek, V.F., Almeida, M.C., Burmeister, J.J., Oliveira, D.L., L.Roberts, J., Bannon, A.W., Norman, M.H., Louis, J.C., Treanor, J.J., Gavva, N.R. & Romanovsky, A.A. 2007. Nonthermal activation of transient receptor potential vanilloid-1 channels in abdominal viscera tonically inhibits autonomic cold-defense effectors. *J Neurosci* **27**, 7459–7468.
- Strotmann, R., Harteneck, C., Nunnenmacher, K., Schultz, G. & Plant, T.D. 2000. OTRPC4, a nonselective cation channel that confers sensitivity to extracellular osmolarity. *Nat Cell Biol* **2**, 695–702.
- Szelényi, Z., Hummel, Z., Szolcsányi, J. & Davis, J.B. 2004. Daily body temperature rhythm and heat tolerance in TRPV1 knockout and capsaicin pretreated mice. *Eur J Neurosci* **19**, 1421–1424.
- Todaka, H., Taniguchi, J., Satoh, J., Mizuno, A. & Suzuki, M. 2004. Warm temperature-sensitive transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) plays an essential role in thermal hyperalgesia. *J Biol Chem* **279**, 35133–35138.
- Vergnolle, N., Cenac, N., Altier, C., Cellars, L., Chapman, K., Zamponi, G.W., Materazzi, S., Nassini, R., Liedtke, W., Cattaruzza, F., Grady, E.F., Geppetti, P. & Bunnett, N.W. 2010. A role for transient receptor potential vanilloid 4 in tonic-induced neurogenic inflammation. *Br J Pharmacol* **159**, 1161–1173.
- Vincent, F. & Duncton, M.A. 2011. TRPV4 agonists and antagonists. *Curr Top Med Chem* **11**, 2216–2226.
- Vincent, F., Acevedo, A., Nguyen, M.T., Dourado, M., DeF-alco, J., Gustafson, A., Spiro, P., Emerling, D.E., Kelly, M.G. & Duncton, M.A. 2009. Identification and characterization of novel TRPV4 modulators. *Biochem Biophys Res Commun* **3**, 490–494.
- Voets, T., Talavera, K., Owsianik, G. & Nilius, B. 2005. Sensing with TRP channels. *Nat Chem Biol* **1**, 85–92.
- Wang, C., Ning, L.P., Wang, Y.H., Zhang, Y., Ding, X.L., Ge, H.Y., Arendt-Nielsen, L. & Yue, S.W. 2011. Nuclear factor-kappa B mediates TRPV4-NO pathway involved in thermal hyperalgesia following chronic compression of the dorsal root ganglion in rats. *Behav Brain Res* **221**, 19–24.
- Wasserstrom, J.A. & Vites, A.M. 1999. Activation of contraction in cat ventricular myocytes: effects of low Cd(2+) concentration and temperature. *Am J Physiol* **277**, H488–H498.
- Watanabe, H., Vriens, J., Suh, S.H., Benham, C.D., Droogmans, G. & Nilius, B. 2002. Heat-evoked activation of TRPV4 channels in a HEK293 cell expression system and in native mouse aorta endothelial cells. *J Biol Chem* **277**, 47044–47051.
- Wenisch, C., Narzt, E., Sessler, D.L., Parschalk, B., Lenhardt, R., Kurz, A. & Graninger, W. 1996. Mild intraoperative hypothermia reduces production of reactive oxygen intermediates by polymorphonuclear leukocytes. *Anesth Analg* **82**, 810–816.
- Ye, L., Kleiner, S., Wu, J., Sah, R., Gupta, R.K., Banks, A.S., Cohen, P., Khandekar, M.J., Bostrom, P., Mepani, R.J. et al. 2012. TRPV4 is a regulator of adipose oxidative metabolism, inflammation, and energy homeostasis. *Cell* **151**, 96–110.

Editorial

The transient receptor potential vanilloid-4 channel: detecting body temperatures that drive defences against mild warmth

See related article: Vizin, R.C., Scarpellini, C.D., Ishikawa, D.T., Correa, G.M., de Souza, C.O., Gargaglioni, L.H., Carrettiero, D.C., Bicego, K.C. & Almeida, M.C. 2015. TRPV4 activates autonomic and behavioural warmth-defence responses in Wistar rats. *Acta Physiol* 214, 275–289.

Over the last two decades, many channels, including several of the transient receptor potential (TRP) channels, have been shown to be highly sensitive to temperature and proposed to serve as thermosensors for physiological functions and behaviours that depend on temperature. However, it is still largely unknown which TRP channels detect skin, brain and other body temperatures that drive physiological (autonomic) and behavioural cold and heat defences in mammals (Romanovsky 2014). Arguably, the only exception is the TRP channel melastatin-8 (M8), which has been shown to sense a decreased skin temperature to drive tail skin vasoconstriction, non-shivering thermogenesis and cold-avoidance (warmth-seeking) behaviour in rodents (Almeida *et al.* 2012). In the current issue of *Acta Physiologica*, Vizin *et al.* (2015) report the results of a study aimed at establishing whether another TRP channel, vanilloid-4 (V4), plays a similarly critical role in heat defences.

TRPV4 is known to be activated by warmth (25–34 °C) *in vitro* (Guler *et al.* 2002, Watanabe *et al.* 2002), but the earlier *in vivo* studies of its thermoregulatory role produced contradictory results. On one side, several groups showed that body temperature of TRPV4-knockout (*Trpv4*^{-/-}) mice did not differ from that of wild-type littermates, whether under thermoneutral conditions or during cold or warmth exposure (Liedtke & Friedman 2003, Lee *et al.* 2005). These negative results seem to suggest that TRPV4 is not essential for thermoregulation. On the other hand, based on the increased withdrawal latencies in a tail-immersion test and on the increased preference for warmth observed in *Trpv4*^{-/-} mice, Lee *et al.* (2005) proposed that TRPV4 plays important roles in the avoidance responses caused by innocuous warmth (a thermoregulatory response) or noxious heat (a response to thermal pain). Yet, in a subsequent work, the same group argued against such a role for TRPV4 in either response (Huang *et al.* 2011).

It should be noted, however, that thermophysiological studies in mice are notoriously tricky to conduct (Rudaya *et al.* 2005) and that any studies in knockout animals (typically mice) are often difficult to interpret due to the development of compensation for the knocked-out gene. To circumvent both the methodological and interpretational difficulties of studying genetically modified mice, pharmacological antagonists are often used in rat experiments. This is exactly the approach taken by Vizin *et al.* (2015).

The authors showed that the intravenous administration of HC-067047, a potent TRPV4 antagonist (Everaerts *et al.* 2010), caused a rise in deep body temperature at an ambient temperature of 26 °C (which was neutral in the experimental setup used) or 30 °C (a low supraneutral temperature). No body temperature rise occurred at a subneutral ambient temperature of 22 °C (at which TRPV4 channels in the skin were presumably not activated) or at a higher supraneutral ambient temperature of 32 °C (at which multiple additional central and/or peripheral thermosensors can be speculated to be involved, thus compensating for the blockade of TRPV4 channels).

Unfortunately, the authors did not confirm in direct experiments (using *Trpv4*^{-/-} animals) whether the hyperthermic effect of HC-067047 was indeed due to an action on TRPV4 channels. The lack of such a direct confirmation is the major shortcoming of the Vizin *et al.* (2015) study, as it leaves the door open for the possibility of an off-target action, especially in view of the contradictory and largely negative results of the earlier studies discussed above (Liedtke & Friedman 2003, Lee *et al.* 2005, Huang *et al.* 2011).

Another issue that needs clarification is how the magnitude of the body temperature response to HC-067047 (when the response occurs) depends on basal (before HC-067047 administration) peripheral body temperatures, especially the temperature of hairy skin, which plays a major role in driving thermoeffectors (Romanovsky 2014). Clarifying this would help to determine whether HC-067047 affects thermoregulation by blocking non-thermal (e.g. osmotic) or thermal signals. Examples of TRP channel antagonists affecting body temperature by blocking non-thermal vs. thermal activation of the corresponding channels are TRPV1 vs. TRPM8 antagonists, respectively.

TRPV1 antagonists typically cause hyperthermia at all ambient and body temperatures studied by blocking non-thermal (proton) activation of abdominal visceral TRPV1 channels; this effect does not depend on basal temperatures (Steiner *et al.* 2007, Garami *et al.* 2010). Hence, TRPV1 is not a thermosensor used by the rodent thermoregulation system (Romanovsky *et al.* 2009). On the other hand, TRPM8 antagonists cause hypothermia only in a cold environment, and they do so by blocking thermal activation of cutaneous TRPM8 channels; the effect is the greatest when basal body temperatures are the lowest (Almeida *et al.* 2012). Hence, TRPM8 is a thermosensor used by the rodent thermoregulation system (Almeida *et al.* 2012). The study by Vizin *et al.* (2015) did not allow the authors to determine definitively the nature of those signals that were blocked by HC-067047 to cause hyperthermia. However, the fact that HC-067047 raised deep body temperature in rats only in a certain range of ambient temperatures suggests that the signals blocked by HC-067047 could be thermal.

The spectrum of thermoeffectors driven by the TRPV4-mediated presumably thermal signals blocked by HC-067047 deserves a separate discussion. In general, different effectors are driven by different combinations of peripheral and central body temperatures and, therefore, are likely to utilize different combinations of thermosensors (Romanovsky 2014). We applaud Vizin *et al.* (2015) for running labour-intensive experiments to clarify which thermoeffectors were recruited in the response to HC-067047 under different conditions. Using a variety of experimental setups and conditions, the authors showed that HC-067047 affected the activity of all autonomic and behavioural thermoeffector mechanisms studied, *viz.*, tail skin vasodilation, non-shivering thermogenesis and the search for preferred ambient temperature.

Vizin *et al.* (2015) also studied the effects of RN-1747, a TRPV4 agonist. Importantly, the experiments with RN-1747 suggested a cutaneous location of TRPV4 channels that drive thermoeffectors. However, we find any experiments with agonists less revealing. Indeed, an agonist of a TRP channel can cause a response *in vivo*, but this does not mean that the channels involved are naturally exposed to this (or any other) agonist. Unlike an effect of an agonist, an on-target effect of an antagonist almost for sure reveals a physiological mechanism – the targeted channels should be already activated via a naturally occurring mechanism in order for the antagonist to have an effect. Furthermore, it is not totally unusual for agonists and antagonists of the same receptor to affect a physiological function via different mechanisms and via receptors at different locations. For example, the hyperthermic responses to systemic

administration of TRPV1 antagonists originate in the periphery, whereas the hypothermic responses to systemic administration of TRPV1 agonists likely originate in the brain (Romanovsky *et al.* 2009). Sometimes, agonists and antagonists of the same receptor can even cause the same effect on body temperature (Packman *et al.* 1953)!

In summary, using pharmacological modulation of the TRPV4 channel in an extensive and expertly performed thermophysiological study, Vizin *et al.* (2015) came to a conclusion that TRPV4 detects body temperature (perhaps superficial skin temperature) signals that drive both autonomic and behavioural warmth-defence thermoeffectors. Even though several aspects of this conclusion remain to be confirmed in direct experiments, the authors' story about the role of TRPV4 in thermoregulation is compelling. The significance of the present work may be limited by the fact that the hyperthermic effect of the TRPV4 antagonist used was observed in a very narrow range of ambient temperatures. Does this mean that other thermosensors, perhaps both peripheral and central, are more important outside this narrow range? If so, a search for thermosensors that drive autonomic and behavioural heat defences should continue.

Conflict of interest

A. Garami discloses no conflict of interest. A. A. Romanovsky has consulted for TRP programs at Amgen, Abbott Laboratories and several other pharmaceutical companies, and his research related to the thermosensory roles of TRP channels has been funded by Amgen., Abbott Laboratories and AbbVie.

A. Garami^{1,2} and A. A. Romanovsky²

1 Department of Pathophysiology and Gerontology, Medical School, University of Pecs, Pecs, Hungary

2 Systemic Inflammation Laboratory (FeverLab), Trauma Research, St. Joseph's Hospital and Medical Center, Phoenix, AZ, USA

E-mail: aromano@chw.edu

References

- Almeida, M.C., Hew-Butler, T., Soriano, R.N., Rao, S., Wang, W., Wang, J., Tamayo, N., Oliveira, D.L., Nucci, T.B., Aryal, P., Garami, A., Bautista, D., Gavva, N.R. & Romanovsky, A.A. 2012. Pharmacological blockade of the cold receptor TRPM8 attenuates autonomic and behavioral cold defenses and decreases deep body temperature. *J Neurosci* 32, 2086–2099.

- Everaerts, W., Zhen, X., Ghosh, D., Vriens, J., Gevaert, T., Gilbert, J.P., Hayward, N.J., McNamara, C.R., Xue, F., Moran, M.M. *et al.* 2010. Inhibition of the cation channel TRPV4 improves bladder function in mice and rats with cyclophosphamide-induced cystitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 19084–19089.
- Garami, A., Shimansky, Y.P., Pakai, E., Oliveira, D.L., Gavva, N.R. & Romanovsky, A.A. 2010. Contributions of different modes of TRPV1 activation to TRPV1 antagonist-induced hyperthermia. *J Neurosci* **30**, 1435–1440.
- Guler, A.D., Lee, H., Iida, T., Shimizu, I., Tominaga, M. & Caterina, M. 2002. Heat-evoked activation of the ion channel, TRPV4. *J Neurosci* **22**, 6408–6414.
- Huang, S.M., Li, X., Yu, Y., Wang, J. & Caterina, M.J. 2011. TRPV3 and TRPV4 ion channels are not major contributors to mouse heat sensation. *Mol Pain* **7**, 37.
- Lee, H., Iida, T., Mizuno, A., Suzuki, M. & Caterina, M.J. 2005. Altered thermal selection behavior in mice lacking transient receptor potential vanilloid 4. *J Neurosci* **25**, 1304–1310.
- Liedtke, W. & Friedman, J.M. 2003. Abnormal osmotic regulation in *trpv4*^{-/-} mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 13698–13703.
- Packman, E.W., Rossi, G.V. & Harrison, J.W. 1953. The effect of histamine and antihistamines on body temperature. *J Pharm Pharmacol* **5**, 301–310.
- Romanovsky, A.A. 2014. Skin temperature: its role in thermoregulation. *Acta Physiol (Oxf)* **210**, 498–507.
- Romanovsky, A.A., Almeida, M.C., Garami, A., Steiner, A.A., Norman, M.H., Morrison, S.F., Nakamura, K., Burmeister, J.J. & Nucci, T.B. 2009. The transient receptor potential vanilloid-1 channel in thermoregulation: a thermosensor it is not. *Pharmacol Rev* **61**, 228–261.
- Rudaya, A.Y., Steiner, A.A., Robbins, J.R., Dragic, A.S. & Romanovsky, A.A. 2005. Thermoregulatory responses to lipopolysaccharide in the mouse: dependence on the dose and ambient temperature. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **289**, R1244–R1252.
- Steiner, A.A., Turek, V.F., Almeida, M.C., Burmeister, J.J., Oliveira, D.L., Roberts, J.L., Bannon, A.W., Norman, M.H., Louis, J.C., Treanor, J.J., Gavva, N.R. & Romanovsky, A.A. 2007. Nonthermal activation of transient receptor potential vanilloid-1 channels in abdominal viscera tonically inhibits autonomic cold-defense effectors. *J Neurosci* **27**, 7459–7468.
- Vizin, R.C., Scarpellini, C.D., Ishikawa, D.T., Correa, G.M., de Souza, C.O., Gargaglioni, L.H., Carrettiero, D.C., Bicego, K.C. & Almeida, M.C. 2015. TRPV4 activates autonomic and behavioural warmth-defence responses in Wistar rats. *Acta Physiol (Oxf)* doi: 10.1111/apha.12477. [Epub ahead of print].
- Watanabe, H., Vriens, J., Suh, S.H., Benham, C.D., Droogmans, G. & Nilius, B. 2002. Heat-evoked activation of TRPV4 channels in a HEK293 cell expression system and in native mouse aorta endothelial cells. *J Biol Chem* **277**, 47044–47051.

Apêndice B

**“Thermoregulatory consequences of salt loading in the
lizard *Pogona vitticeps*”**

RESEARCH ARTICLE

Thermoregulatory consequences of salt loading in the lizard *Pogona vitticeps*

Carolina da Silveira Scarpellini^{1,2,3,*}, Kênia C. Bicego^{1,2} and Glenn J. Tattersall^{2,3}

ABSTRACT

Previous research has demonstrated that dehydration increases the threshold temperature for panting and decreases the thermal preference of lizards. Conversely, it is unknown whether thermoregulatory responses such as shuttling and gaping are similarly influenced. Shuttling, as an active behavioural response, is considered one of the most effective thermoregulatory behaviours, whereas gaping has been proposed to be involved in preventing brain over-heating in lizards. In this study we examined the effect of salt loading, a proxy for increased plasma osmolality, on shuttling and gaping in *Pogona vitticeps*. Then, we determined the upper and lower escape ambient temperatures (UET_a and LET_a), the percentage of time spent gaping, the metabolic rate (\dot{V}_{O_2}), the evaporative water loss (EWL) during gaping and non-gaping intervals and the evaporative effectiveness (EWL/ \dot{V}_{O_2}) of gaping. All experiments were performed under isotonic (154 mmol l⁻¹) and hypertonic saline injections (625, 1250 or 2500 mmol l⁻¹). Only the highest concentration of hypertonic saline altered the UET_a and LET_a, but this effect appeared to be the result of diminishing the animal's propensity to move, instead of any direct reduction in thermoregulatory set-points. Nevertheless, the percentage of time spent gaping was proportionally reduced according to the saline concentration; \dot{V}_{O_2} was also decreased after salt loading. Thermographic images revealed lower head than body surface temperatures during gaping; however this difference was inhibited after salt loading. Our data suggest that EWL/ \dot{V}_{O_2} is raised during gaping, possibly contributing to an increase in heat transfer away from the lizard, and playing a role in head or brain cooling.

KEY WORDS: Gaping, Shuttling, Metabolic rate, Evaporative water loss, Brain cooling

INTRODUCTION

All physiological variables and processes are either directly or indirectly influenced by body temperature (T_b); as a result, T_b maintenance is vital to the physiological and biochemical functioning in the body. However, T_b not only influences but also can be influenced by physiological processes. In particular, because the most efficient thermolytic (i.e. heat-loss) mechanisms are water-related effectors, such as panting, gaping, sweating and salivation, it is not surprising that osmoregulation is one of the physiological functions that can affect T_b . If body water lost by evaporative cooling mechanisms is not replaced, dehydration ensues, the

osmoregulatory system is stimulated and, consequently, effectors to restore the body fluid loss will be activated, probably causing inhibition of those water-dependent thermolytic effectors (McKinley et al., 2008). As a result of a decrease in evaporative water loss (EWL), a concomitant rise in T_b is expected. In fact, the interaction between osmoregulation and thermoregulation has been shown for almost all vertebrate groups (Schmidt-Nielsen et al., 1957; Parmenter and Heatwole, 1975; Kleinhaus et al., 1985; Preest and Pough, 1989) and the expected increase in T_b during dehydration has been found in many species of mammals, including humans, camels, African ungulates, goats, dogs and sheep (Schmidt-Nielsen et al., 1957; Taylor, 1970; Baker, 1989; Baker and Turlejska, 1989; Jessen et al., 1998; McKinley et al., 2008). Amphibians and reptiles also have thermal preferences influenced by hydration status (Malvin and Wood, 1991; O'Connor and Tracy, 1992; Ladyman and Bradshaw, 2003; Bradshaw et al., 2007), although in these cases, defended T_b is reduced through a behavioural selection of lower temperatures. Evidence about the central control of these interactions was found by Silva and Boulant (1984) when they described that temperature-sensitive neuronal activity in isolated hypothalamic slices of rats is altered by perfusion with hyperosmotic saline; some warm-sensitive neurons are excited whereas others are inhibited by hyperosmotic stimulus.

Other effects of osmoregulation on T_b regulation have also been found in reptiles, especially xeric-adapted desert-dwellers. Parmenter and Heatwole (1975) demonstrated that an agamid lizard, *Pogona barbatus* (formerly *Amphibolurus barbatus*), has its panting threshold raised when it is dehydrated; the same result was observed by Dupré and Crawford (1986) in dehydrated iguanas. In these cases, T_b would be expected to rise in the water-stressed state. In contrast, the snake *Notechis scutatus* (Ladyman and Bradshaw, 2003) and the lizard *Ctenophorus ornatus* (Bradshaw et al., 2007) select lower ambient temperatures (T_a) when body water availability is reduced. All of these effects indicate that body water is conserved at the expense of a finely tuned T_b maintenance when both homeostatic systems are competing.

Despite the fact that hydration state influences two important thermoeffectors in lizards (i.e. behaviours associated with homeostatic control, panting and choosing a preferred T_a), it is not clear whether hydration state modifies thermoregulatory set-points consistently for multiple thermoeffectors, such as shuttling and gaping behaviours. Shuttling in lizards is an active form of thermoregulation involving the movement between warm and cool areas that leads to an overall regulation of T_b ; it is known to be a very important behavioural mechanism observed in reptiles. Optimal T_a is rarely found in the field, so it is common for reptiles to move back and forth between areas of high and low thermal intensity. This behaviour is also very well documented in the laboratory (Berk and Heath, 1975; Barber and Crawford, 1979; Cadena and Tattersall, 2009a) and is proving to be a tractable

¹Department of Animal Morphology and Physiology, College of Agricultural and Veterinarian Sciences, São Paulo State University, Jaboticabal, São Paulo 14884-900, Brazil. ²National Institute of Science and Technology in Comparative Physiology (INCT-Fisiologia Comparada), Brazil. ³Department of Biological Sciences, Brock University, St. Catharines, Ontario, Canada L2S3A1.

*Author for correspondence (carolinascarpellini@gmail.com.br)

List of abbreviations and symbols

CC	cold compartment of shuttle box
EHT	evaporative heat transfer (J min^{-1})
EWL	evaporative water loss ($\text{mg H}_2\text{O min}^{-1}$)
$\text{EWL}/\dot{V}_{\text{O}_2}$	evaporative effectiveness of gaping (mg ml^{-1})
F_{ECO_2}	excurrent CO_2 fractional
$F_{\text{EH}_2\text{O}}$	excurrent H_2O fractional
F_{EO_2}	excurrent O_2 fractional
F_{ICO_2}	incurrent CO_2 fractional (from baseline)
$F_{\text{IH}_2\text{O}}$	incurrent H_2O fractional (from baseline)
F_{IO_2}	incurrent O_2 fractional (from baseline)
FRl	incurrent flow rate (ml min^{-1})
HC	hot compartment of shuttle box
HP	heat production (J min^{-1})
i.p.	intra-peritoneal injection
LET_a	ambient temperature when the lizard moved from the cold to the hot compartment
SBC	selective brain cooling
STP	standard temperature and pressure
T_a	ambient temperature
T_b	body temperature
T_{body}	lizard's body skin temperature
T_{head}	lizard's head skin temperature
UET_a	ambient temperature when the lizard moved from the hot to the cold compartment
\dot{V}_{O_2}	metabolic rate assessed as the rate of oxygen consumed by the animal ($\text{ml O}_2 \text{ min}^{-1}$ STP)
WVDE	excurrent water vapour density ($\mu\text{g H}_2\text{O ml}^{-1}$)
WVDI	incurrent water vapour density ($\mu\text{g H}_2\text{O ml}^{-1}$)

approach for the study of temperature sensing and the cost of thermoregulation in reptiles (Cadena and Tattersall, 2009a).

Gaping involves a proportional increase in mouth opening with increasing T_a , accompanied by no apparent changes in ventilation (Spotila et al., 1977; Tattersall et al., 2006). Panting, which is an open-mouth form of rapid, shallow breathing usually initiates at extreme or near lethal T_a , acting as a last resort to survival; gaping typically starts at temperatures very close to preferred T_a (Heatwole et al., 1973), apparently contributing to the fine-tuning of T_b regulation (Tattersall and Gerlach, 2005). By opening the mouth, the EWL should increase and be important to prevent the brain from overheating (Spotila et al., 1977; Tattersall et al., 2006). One consequence that this additional cooling mechanism (gaping) can provide to lizards is that they would spend longer periods of time at elevated or optimal T_b before having to seek shade.

Gaping has been described previously in *Pogona vitticeps*, an agamid lizard, naturally found in central Australia. In the field, this lizard prefers T_b close to 33°C (Melville and Schulte, 2001). In the laboratory, it was found that as T_a increases, the time spent gaping is increased (Tattersall and Gerlach, 2005), suggesting a higher EWL as T_a is elevated. Additionally, the gaping threshold is decreased during hypoxia (a scenario known to reduce the T_b set point), reinforcing the idea that this behaviour acts as a heat-loss mechanism (Tattersall and Gerlach, 2005). Besides gaping, bearded dragons (*P. vitticeps*) also present a very well defined shuttling behaviour (Cadena and Tattersall, 2009a,b); they are desert animals that probably face seasonal plasma hypernatremia, as described in other arid (Bentley, 1959) and agamid Australian reptiles (Bradshaw and Shoemaker, 1967). All these characteristics make the bearded dragon an ideal species to study the factors that can influence gaping and shuttling. Therefore, we aimed to assess the effect of decreased availability of body water on shuttling and gaping, two extremely important thermoeffectors of T_b regulation

in lizards, in order to ascertain whether hyperosmolarity impacts thermoregulatory control. We also investigated the effectiveness of gaping for EWL when the animals were exposed to high T_a . We used hypertonic saline injections to induce a decrease in the availability of body water (Rice, 1982; Baker and Dawson, 1985; Dupré and Crawford, 1986; Nagashima et al., 2001; Konishi et al., 2003; Bradshaw et al., 2007) and we predicted that: (1) animals treated with salt loading would shuttle from cool to warm areas and/or from warm to cool areas in the shuttle box at lower T_a thresholds, since hyperosmolarity has been shown to decrease thermal preference in ectotherms; (2) the percentage of time spent gaping would be lower after salt loading; and (3) that gaping would be a significant source of EWL.

RESULTS**Plasma concentration and water consumption**

The increases in plasma osmolality were very similar to those predicted by our mathematical calculations. The hypertonic saline doses, 625, 1250 and 2500 mmol l^{-1} , raised the plasma osmoconcentration by approximately 7, 12 and 22% compared with control saline (154 mmol l^{-1}), resulting in a high linear relation between the measured plasma osmolality and the expected values ($r^2=0.95$; $P<0.001$; $y=1.0886x-4.4073$; data not shown). The proportion of animals that consumed water was strongly influenced by the salt loading level they were injected with ($\chi^2=45.65$, $N=114$; $P<0.001$). For control animals (154 mmol l^{-1}) only 5 out of 38 animals drank water (13%); for 625 mmol l^{-1} injection, 6 out of 19 drank water (31%); for 1250 mmol l^{-1} , 14 out of 22 drank water (63%) and for 2500 mmol l^{-1} , 31 out of 35 drank water (88%).

Effect of salt loading on shuttling behaviour

The injection of 1250 mmol l^{-1} hypertonic saline had no effect on the upper escape ambient temperature (UET_a ; see Materials and methods; $P=0.882$) nor on the lower escape ambient temperature (LET_a ; $P=0.357$) compared with control animals (Fig. 1A); however the highest concentration (2500 mmol l^{-1}) increased the UET_a and decreased the LET_a (interaction of direction \times treatment: $P<0.001$; $F_{2,30}=18.116$; Fig. 1A) and decreased the number of shuttles (treatment effect: $P=0.01$; $F_{2,30}=5.463$; Fig. 1B) compared with isotonic saline injections.

In order to verify whether the salt loading affected the propensity to move, a similar experiment was performed in the shuttle box held at a constant temperature of 34°C . In this series, only the highest and the isotonic saline concentrations were used because the other concentration (1250 mmol l^{-1}) had no effect on UET_a and LET_a (Fig. 1A). The salt loading significantly reduced the amount of exploratory shuttling ($P=0.004$; Fig. 1C).

Effect of salt loading on gaping

Salt loading decreased the propensity for gaping in lizards in a dose- and time-dependent manner (interaction of time \times treatment: $P<0.001$; $F_{3,40}=5.498$; Fig. 2A,B). The two highest concentrations of saline injections (1250 and 2500 mmol l^{-1}) reduced the gaping at least 90% at the end of the experiment compared with the pre-injection values whereas the lowest concentration (625 mmol l^{-1}) diminished gaping at 50% (Fig. 2A).

Effect of salt loading on head and body skin temperatures

Lizard's body (T_{body}) and head (T_{head}) skin temperatures were recorded during the salt-loading effects on gaping experiments (Fig. 3A–C). The T_{head} was significantly increased after saline

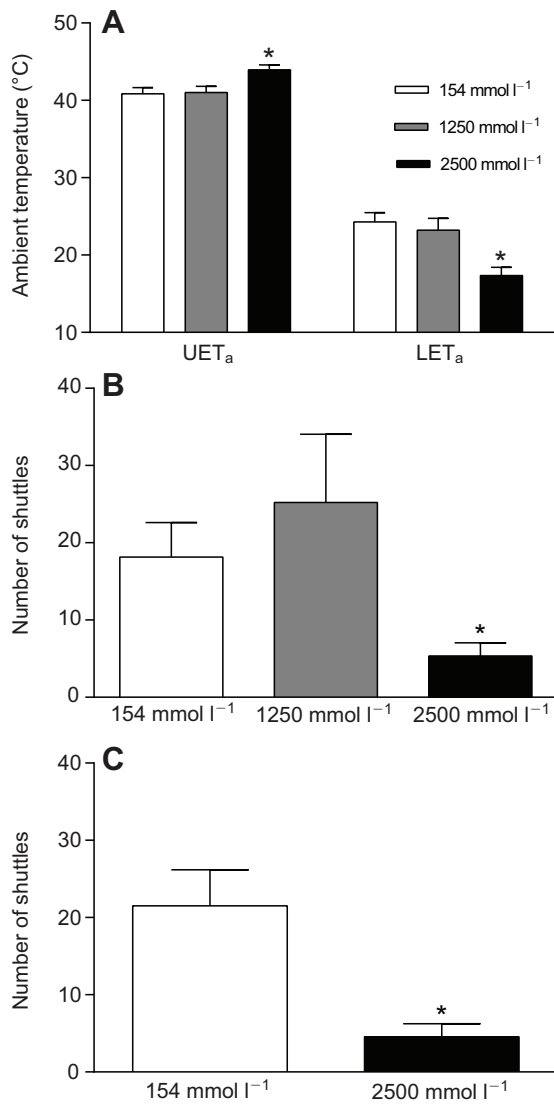


Fig. 1. The effect of different concentrations of saline injection on UET_a and LET_a and on the number of shuttles in the lizard *Pagona vitticeps*. (A) UET_a, mean ambient temperature in which the animal escaped from the hot compartment. LET_a, mean ambient temperature at which the animal escaped from the cold compartment. (B) Number of shuttles when animals were placed in the shuttle box with thermoregulatory drive. Results of A and B are from protocol 1. In A and B, number of animals=11 for all groups. (C) Number of shuttles when both compartments of shuttle box were at 34°C (protocol 2); N=14 for all groups; *P<0.05, mean treatment effect.

injections with the highest effect of the 2500 mmol l⁻¹ treatment compared with control and 625 mmol l⁻¹ groups; the increase in T_{head} of 625 mmol l⁻¹ treated-animals was higher than that of controls (interaction of time×treatment effect: $P=0.003$; $F_{2,17}=2.57$; Fig. 3A). Salt loading also caused a rise in the lizard's T_{body} compared with controls (interaction time×treatment effect: $P=0.002$; $F_{2,17}=2.78$; Fig. 3B), but no difference was observed between 625 and 2500 mmol l⁻¹ treatments.

Furthermore, the control group and animals treated with the lowest hypertonic saline (625 mmol l⁻¹) exhibited a significantly lower T_{head} than T_{body} compared with those animals that received the highest concentration of saline (2500 mmol l⁻¹; treatment effect: $P=0.005$; $F_{2,17}=7.362$; time effect: $P=0.192$; $F_{2,17}=1.449$; no interaction effect: $P=0.559$; $F_{2,17}=0.901$; Fig. 3C and Fig. 4A,B).

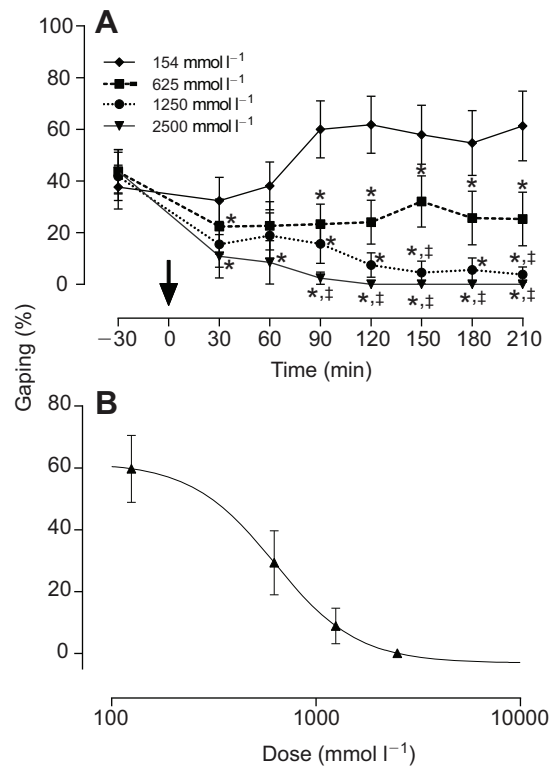


Fig. 2. Effect and dose response of different saline concentrations on time spent in gapping in *P. vitticeps* exposed to 37–39°C. Effect (A) and dose response (B) on percentage of time spent gapping. Arrow indicates time of injection. N=11 for all treatments; *P<0.05 compared with 154 mmol l⁻¹ concentration. †P<0.05 compared with 625 mmol l⁻¹ group.

For salt-loaded animals (2500 mmol l⁻¹), T_{head} and T_{body} were virtually the same after injection (Fig. 3C and Fig. 4B).

Effectiveness of gapping for EWL and the effect of salt loading on overall metabolism and on EWL

To verify how effective gapping was with respect to EWL, metabolic rate (\dot{V}_{O_2}) and EWL were measured during spontaneous periods of gapping and non-gapping [heat production (HP) and evaporative heat transfer (EHT), were calculated based on \dot{V}_{O_2} and EWL values; see Materials and methods for details]. Because gapping intervals shorter than 15 s were not considered for these calculations (see Materials and methods for details), only control animals (154 mmol l⁻¹) were utilized for these analyses (comparisons between gapping and non-gapping); salt-loaded animals presented gapping episodes too brief after hypertonic injection to be confident that instantaneous correction could robustly capture the differences in water produced and \dot{V}_{O_2} .

Although EWL did not differ between gapping and non-gapping intervals ($P=0.706$), a significant reduction in \dot{V}_{O_2} ($P=0.023$) contributed to an overall increase in the evaporative effectiveness of gapping ($\text{EWL}/\dot{V}_{\text{O}_2}$; $P=0.01$; Table 1). The T_{b} was $37.7\pm 0.06^\circ\text{C}$ throughout the experiment. The hypertonic saline injection (625 mmol l⁻¹) decreased \dot{V}_{O_2} ($P=0.025$). However, because the EWL also tended to be lower after injection ($P=0.12$), the $\text{EWL}/\dot{V}_{\text{O}_2}$ was not affected by salt loading ($P=0.195$) when compared with the effect of isotonic saline on the same variables (Table 2).

DISCUSSION

In the present study, salt loading was used as a proxy for dehydration stress. Its success was verified by a highly predictable

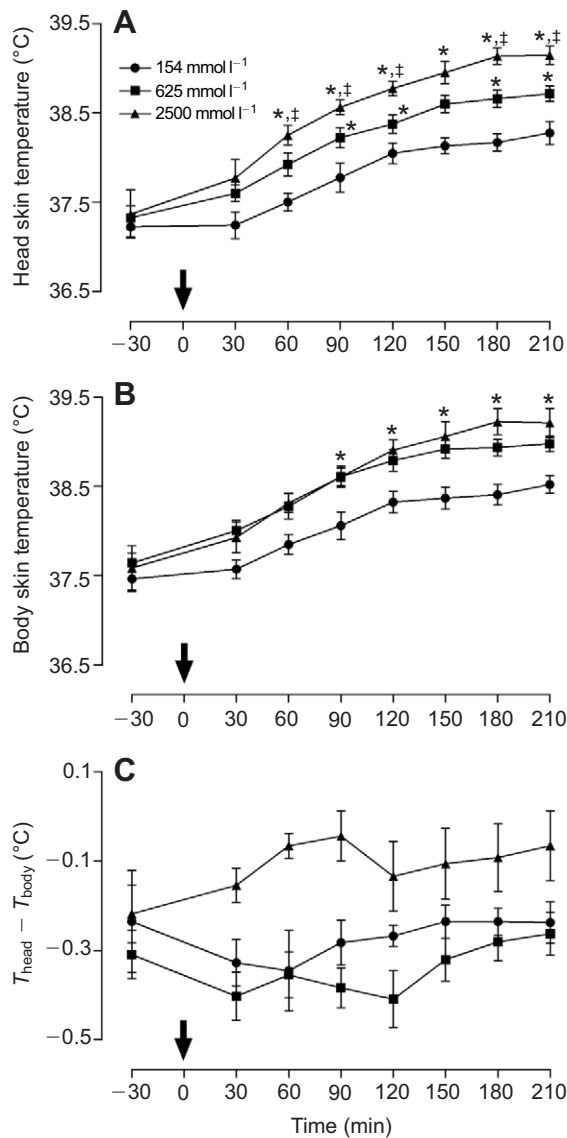


Fig. 3. Effect of different concentrations of saline injection on temperature over time. (A) Head skin temperature, (B) body skin temperature and (C) difference ($T_{\text{head}} - T_{\text{body}}$). $N=11$ (154 mmol l^{-1}), $N=4$ (625 mmol l^{-1}) and $N=5$ (2500 mmol l^{-1}). Differences in interaction effect for A and B: * $P < 0.05$ compared with 154 mmol l^{-1} at the same time; † $P < 0.05$ compared with 625 mmol l^{-1} at the same time. In C, 2500 mmol l^{-1} was different from the other groups (effect of treatment, $P < 0.05$; no interaction between factors).

rise in plasma osmolality along with a strong, proportional drive to drink. We expected that lizards loaded with high levels of salt would escape from the cold to the hot compartment and from the hot to the cold one at a lower T_a , i.e. the lizards would have a lower LET_a and UET_a compared with control animals, reflective of an overall reduction in their defended T_b . Previous research has shown that rats (Konishi et al., 2007), toads (Malvin and Wood, 1991), lizards (Crowley, 1987; Bradshaw et al., 2007) and snakes (Ladyman and Bradshaw, 2003) prefer a cooler T_a when water availability is reduced. However, in the present study, the highest concentration of saline injection (2500 mmol l^{-1}) altered both the LET_a and UET_a of *P. vitticeps*, but in opposite directions (Fig. 1A) and decreased the number of shuttles (Fig. 1B). A lower LET_a and a higher UET_a suggest that either the thermal preference of extreme voluntary temperatures was decreased and increased, at

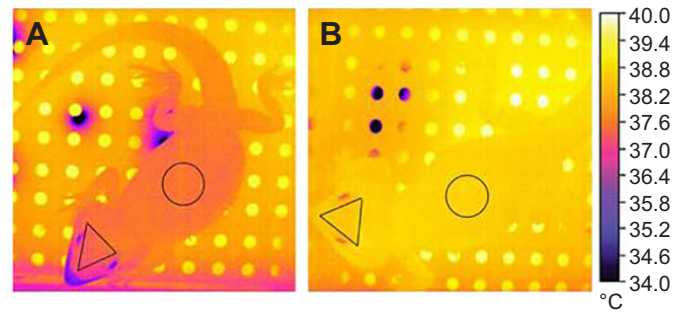


Fig. 4. Representative infrared thermal images recorded after saline injections in *P. vitticeps*. (A) Control animal (154 mmol l^{-1}). (B) Salt-loaded animal (2500 mmol l^{-1}). Both images were recorded 125 min after saline injection when control animals gaped close to 60% of the time and salt loaded ones had no gape. Note the cooler temperature surrounding the mouth in A. Head skin temperature was taken from the area indicated by the triangle and the body skin temperature was taken from the circled area indicated in the image.

the same time, or that the salt loading was affecting the animal's propensity to move (Fig. 1B) and not targeting thermoregulatory set-points.

Our subsequent experiment testing behaviour in an isothermal shuttle box (maintained at 34°C) using the 2500 mmol l^{-1} solution reduced the overall number of shuttling events (Fig. 1C), indicating that salt loading affected the animal's predisposition to move, instead of the thermoregulation, per se. In the field, iguanid and agamid lizards abandon all activity and do not thermoregulate when they are starving or facing an extreme reduction in water availability (Bradshaw, 1997), a behaviour that is similar to the one found in the present study. It is still not certain whether the reduction in shuttling after salt loading is based on a diminished motivation to move, or a physiological inhibition of neuromuscular function. Based on our results, we suggest that the highest saline concentration used in the present study was high enough to inhibit any overt locomotory thermoregulatory responses. In contrast, the intermediate concentration (1250 mmol l^{-1}), which reduced 90% of the gaping response, did not alter the LET_a and UET_a nor the number of shuttles, indicating that a different threshold for salt loading influences these thermoregulatory responses and that water conservation could occur with mild dehydration stress without changes in shuttling thermoregulatory set-points.

The effect of salt loading on gaping confirmed our hypothesis, with gaping exhibiting a well-defined dose response (Fig. 2A,B), which is interesting because the 1250 mmol l^{-1} saline concentration did not affect behavioural thermoregulation in the shuttle box, but did cause a large reduction in gaping. Even the lowest concentration (625 mmol l^{-1}) was able to reduce gaping by approximately 50%. Although considered a different response from gaping, panting frequency and panting threshold temperatures were also altered by dehydration in endotherms such as fowls (Arad, 1983), emus (Maloney and Dawson, 1998) and sheep (McKinley et al., 2008). The effects of salt loading and dehydration suggest that the water-related thermoeffectors (gaping/panting) are more sensitive to salt levels in the circulation than the 'dry' thermoeffectors, such as behavioural shuttling. In this way, reduction of gaping induced by salt loading seems to be a strategy for saving water. Based on these results, the expectation is that gaping would be a significant source of water loss for the bearded dragon.

Although no significant difference between gaping and non-gaping intervals was detected in the EWL by itself, the \dot{V}_{O_2} was

Table 1. Effect of gaping in the lizard *Pogona vitticeps*

Gape state	EWL (mg min ⁻¹)	EHT (J min ⁻¹)	\dot{V}_{O_2} (ml min ⁻¹ STP)	HP (J min ⁻¹)	EWL/ \dot{V}_{O_2} (mg ml ⁻¹ STP)	EHT/HP
Non-gaping interval	5.87±0.65	14.69±1.63	0.97±0.14	19.46±2.8	6.90±1.13	0.86±0.14
Gaping interval	6.07±0.43	15.18±1.06	0.73±0.09*	14.52±1.83	9.10±1.03*	1.14±0.13

These results (means±s.e.m.) are from lizards (N=8) that received isotonic injections. *P<0.05, difference between non-gaping and gaping intervals.

reduced by 25% when the animal gaped. A further decrease in \dot{V}_{O_2} and a 10-fold increase in breathing frequency (=panting) has been reported in sheep when they were exposed to mild heat stress (40°C for 2–3 h). Such a decline in \dot{V}_{O_2} was associated with a decrease in blood flow to the skeletal muscle and internal organs accompanied by an increase in blood flow to peripheral areas (Hales, 1973; Hales and Brown, 1974). Indeed, gaping has always been observed in our laboratory in very calm animals, showing no active movement concomitant with gaping. This reduction in movement, simultaneously with a possible increase of blood flow to the mouth region, could have contributed to the overall decrease in \dot{V}_{O_2} in lizards. However, because the total EWL did not change while the \dot{V}_{O_2} was reduced, the ratio EWL/ \dot{V}_{O_2} was augmented (Table 1) indicating that gaping does contribute to water loss when accounting for the contribution of metabolism itself (evaporative heat loss corresponds to 86% of the total HP during non-gaping intervals, rising to 114% when gaping; Table 1). Bradshaw (1997) previously reported that agamid lizards (*Ctenophorus ornatus*) lose normal thermoregulatory behaviours in the field when they face hypernatraemia associated with chronic dehydration. The present study corroborates Bradshaw's finding (1997) and provides further evidence that when faced with a dehydration stress, the osmoregulatory system looks to be preserved (gaping, a EWL source, was inhibited) at the expense of the thermoregulatory system. As mentioned, only animals injected with isotonic saline were considered for gaping evaporative potential (Table 1) because after hypertonic saline treatment, lizards presented very short periods of gaping, which were not reliable for instantaneous respirometry comparisons. Although such recordings were not ideal for gaping analyses, they were consistent for assessing the overall effect of salt on metabolism (Table 2). Salt loading (625 mmol l⁻¹) decreased the \dot{V}_{O_2} compared with the isotonic injection effect. Metabolic rate is also reduced in dehydrated camels, cats and goats (Schmidt-Nielsen et al., 1967; Doris and Baker, 1981; Dmi'el, 1986). EWL tended to be lower in salt-loaded animals (625 mmol l⁻¹), which agrees with the reduction in time spent gaping after salt injection (Fig. 2A,B), once again suggesting that gaping normally contributes to water loss and is reduced when plasma osmolality rises. Because \dot{V}_{O_2} was reduced and EWL tended to be smaller after hypertonic injection (625 mmol l⁻¹), the EWL/ \dot{V}_{O_2} ratio was not significantly altered (Table 2).

The neurological origins for the interactions between the osmoregulatory and thermoregulatory system are often found within the hypothalamus. The thermosensitivity of hypothalamic

Table 2. Percentage change in evaporative water loss (EWL, mg min⁻¹), oxygen consumption (\dot{V}_{O_2} , ml min⁻¹ STP) and EWL/ \dot{V}_{O_2} (mg ml⁻¹ STP) ratio after isotonic and hypertonic saline injections in the lizard *P. vitticeps*

Saline treatment	%EWL	% \dot{V}_{O_2}	%EWL/ \dot{V}_{O_2}
154 mmol l ⁻¹	-5.11±8.3	-12.96±8.1	16.1±21.3
625 mmol l ⁻¹	-22.7±6.9	-40.9±7.5*	48.1±25.4

Percentage values were calculated based on the change post-injection compared to pre-injection; N=7 (154 mmol l⁻¹) and N=8 (625 mmol l⁻¹); * P<0.05, difference between treatments.

neurons is reduced during dehydration in cats, decreasing the evaporative heat loss (Doris and Baker, 1981). Furthermore, increased cerebrospinal fluid sodium concentration reduces the sweat rate in monkeys (*Erythrocebus patas*; Owen et al., 1989) and breathing frequency (=panting) in rabbits (Turlejska and Baker, 1986). In sheep, the inhibitory effect of hypertonic saline into the carotid artery on panting was abolished by lesion of the lamina terminalis, a region that includes the osmoreceptors and the median preoptic nucleus (McKinley et al., 2008), which, in turn, is involved in the regulation of thermoeffectors (Nakamura and Morrison, 2010) in mammals. Therefore, in many vertebrates, thermoregulation is linked to osmoregulatory status directly through central neurons. Similar pathways might have been activated in our lizards; in other words, salt loading might have increased the encephalic sodium concentration, changed the neuron's thermosensitivity and contributed to the reduction in the percentage of time spent in gaping.

All of the lizards in the gaping protocol demonstrated an increase in T_{head} over the time they were inside the environmental chamber while they were still equilibrating to chamber temperature; however, the T_{head} of those animals that received the most concentrated saline injection (2500 mmol l⁻¹) was even higher compared with control animals (Fig. 3A and Fig. 4); the same pattern was also observed in the T_{body} (Fig. 3B and Fig. 4). It is interesting to note that the difference between T_{head} and T_{body} was higher in those animals that were injected with isotonic saline or lowest hypertonic saline (625 mmol l⁻¹) than in the animals that received the highest hypertonic saline treatment (Fig. 3C and Fig. 4). Therefore, at levels of salt loading that completely suppress gaping (2500 mmol l⁻¹), T_{head} and T_{body} equalize, which may have significant consequences for the defence of cranial temperatures and brain function, indicating that gaping might play a role as a local brain-cooling mechanism (Tattersall et al., 2006), in spite of the relatively minor changes in whole body EWL that accompany gaping (Table 1).

A mechanism called 'selective brain cooling' (SBC) has been described to be activated in mammals (Caputa et al., 1976; McConaghy et al., 1995; Jessen, 2001; Mitchell et al., 2002) when they face water stress. SBC is defined as brain temperature lower than arterial blood temperature (IUPS Thermal Commission, 2001), which is achieved by carotid blood cooling on its ascent to the brain (Willmer et al., 2005). With a cooler brain, the EWL is not activated because warm-sensitive neurons are not triggered. In this way, it has been suggested that SBC is not only a neural protection mechanism, but is also a water conservation strategy.

A combination of respiratory cooling and a by-passing vascular countercurrent system for heat exchange in the brain may work together and lead to encephalic cooling in lizards when these animals are exposed to high T_a (Tattersall et al., 2006). Gaping clearly contributes to water evaporation in the upper airways and buccal cavity (Fig. 4), which may be sufficient to cool the carotid blood on its way to the brain. At low or preferred T_a the encephalic blood descends by the internal jugular vein and then, because of its close proximity to the internal carotid artery, heat (from thermoregulatory basking) is transferred to this artery, thus warming the brain (Oelrich, 1956; Heath, 1964, 1966). At higher T_a , internal

jugular vein is suggested to be constricted, thereby by-passing the blood through the external jugular, which is not very close to the carotid artery. In this case, the heat is not transferred to the carotid blood, but instead, is carried away from the brain (Heath, 1964; Tattersall et al., 2006). It is possible that these two mechanisms together (respiratory cooling and by-passing of the vascular heat exchanger) keep the brain cooler when bearded dragons gape at least 50% of time (Fig. 3C), but the cooling was not preserved when gaping was completely inhibited (Fig. 3C). The same evaporative/non-evaporative mechanisms might contribute to head cooling in a small lacertid lizard (*Podarcis muralis*) when they are heated (Sannolo et al., 2014), although this hypothesis remains to be experimentally tested.

There remain key differences between SBC in mammals and reptiles. In mammals, SBC can be observed when water is not available. Euhydrated mammals (goats and sheep), even when exposed to heat stress rarely present SBC, but dehydrated animals show more frequent and a larger degree of SBC, supporting the idea that such a mechanism has an osmoregulatory drive and might not play a thermoregulatory function in these animals (Jessen et al., 1998; Fuller et al., 2007). In contrast, in *Pogona*, cooling of the head (and by inference, the brain) happened when water was available (i.e. when animals exhibited gaping: 154 and 625 mmol l⁻¹ injections; Fig. 4A and Fig. 3C) and, in an opposite direction, it was diminished when water was not available, i.e. when gaping was abolished (2500 mmol l⁻¹ injection; Fig. 4B and Fig. 3C). Furthermore, the degree of gaping in bearded dragons is augmented as T_a increases in euhydrated animals and the difference between T_{head} and T_{body} increases as well (Tattersall and Gerlach, 2005), but this difference was observed to decrease when animals were salt loaded at the same T_a (Fig. 2A). Therefore, it seems that it is not osmoregulation that drives brain cooling in lizards, but rather thermoregulation; consequently, SBC may operate as a protective encephalic mechanism. Despite having a thermoregulatory drive, when lizards are faced with low water availability, body water is still conserved at the expense of thermoregulation, similar to what happens to mammals. Although a previous study has reported that gaping is an effective cooling thermoeffector for *Alligator mississippiensis* (Spotila et al., 1977), the present study is the first to show that gaping may work as a local (brain) cooling mechanism for desert lizards, based on the fact that salt loading reduced gaping and increased T_{head} , eliminating the difference between T_{head} and T_{body} (Fig. 3).

In conclusion, we found that an intermediate concentration of hypertonic saline can affect EWL mechanisms, with no effect on non-EWL mechanisms. Since gaping is more responsive to salt loading than shuttling, this may be an important response for saving water over a natural dehydration period, while still allowing for optimal thermoregulatory behaviours. However, when water is available, gaping may play a role as a local cooling mechanism that is important to avoid encephalic superheating in reptiles such as *Pogona vitticeps* that engage in thermoregulatory basking.

MATERIALS AND METHODS

Animals

A total of 19 animals (9 females and 10 males, *Pogona vitticeps* Ahl 1926; body mass: 200–500 g) were randomly used in four different protocols. The lizards were housed in terraria with corn cob bedding, containing a 40 W light bulb for thermoregulation and an additional UV light source for vitamin D synthesis, and enriched with a small and opaque tube and a cardboard material that provided shelter and extra climbing surfaces. The animals were kept on a 12 h:12 h light:dark cycle (lights on at 08:00 h

and fed three times a week with a combination of chopped vegetables and fruits and twice a week with insects (cockroaches), but they were fasted for at least 48 h before the experiments. The dragons also received a lukewarm bath before and after all the experiments and an extra bathing and drinking opportunity once a week to ensure they were hydrated. The number of animals that drank water within a 5 min period of time was counted for comparison across all salt loading levels. The same animals were used in almost all the protocols, but they had, at a minimum, a 14 day interval between experiments. All experiments were run between 08:30 h and 16:30 h and all procedures used in this study were approved by the Brock University Animal Care and Use Committee (Protocol #12-11-01).

Injections

Lizards received an isovolemic (1 ml/100 g) intra-peritoneal (i.p.) injection of either normal isotonic saline (154 mmol l⁻¹ NaCl) or hypertonic saline, in order to induce an estimated 5, 10 and 20% increase on plasma osmolality. Three hypertonic concentrations were used (625, 1250 and 2500 mmol l⁻¹) based on previous studies (Konishi et al., 2003; Ford and Bradshaw, 2006) and on mathematical assumptions (75% body water, 50% extracellular fluid and rapid mixing of salt within the plasma) assuming that the baseline osmolality for bearded dragons was 308 mosmol l⁻¹ (Smits and Kozubowski, 1984).

Plasma concentration

To assess the plasma concentration, blood samples were taken from the lizard's tail vein after 1 h of either normal (154 mmol l⁻¹) or hypertonic saline injections (625, 1250 and 2500 mmol l⁻¹). Blood was collected in micro-haematocrit glass tubes and centrifuged in a haematocrit centrifuge for 2 min to separate the plasma. The plasma was stored at 0°C and 10 µl aliquots (triplicate) were analysed in a Vapro vapor pressure osmometer (5520, Wescor, Inc, Logan, UT, USA) using a 291 mosmol litre⁻¹ standard.

Shuttle box experiments

The shuttle box (see Cadena and Tattersall, 2009a,b for details) was a wooden chamber (119×61×45 cm) with two compartments separated by a transparent partition. There was a hole (11.5×14 cm) at the bottom of the partition which connected both compartments and allowed the animal to move from one side to the other one (shuttling behaviour). The walls were oriented to naturally funnel the lizard toward the hole in the partition, which facilitated the shuttling movement by serving as a guide toward the transition point. A transparent lid was placed on the top of the box to avoid any disturbance and to help to maintain the internal temperature. Cameras were mounted over the lid for continuous monitoring, but no data were collected from them.

In the first protocol performed in the shuttle box, one compartment was always 10°C warmer than the other, creating a so-called 'hot compartment' (HC) and a 'cold compartment' (CC). The temperature inside the entire box was controlled by a treadle switch located on the floor, right below the transition point between the compartments. By stepping on this treadle, the lizards regulated the T_a and, consequently, their own temperature. Lizards were always placed in the HC in the beginning of an experiment to increase motivation and to prevent long lethargy from exposition to cold, as the animals had just emerged from the rest phase (dark phase) and the lights inside their terraria had only just been turned on, so the temperature within their housing environments was relatively cold.

Once the animal was placed in the HC, the temperature in both compartments automatically rose at 0.7°C min⁻¹ (Cadena and Tattersall, 2009a), while maintaining a 10°C difference between them. The temperature rose until the animal moved to the CC, stepping on the treadle and activating the cooling system. At that moment, both compartments cooled down at 0.7°C min⁻¹ until the animal moved back to HC. The maximum temperature allowed in the HC was 43°C and the minimum temperature allowed in the CC was 10°C, as a safety precaution for the animals and because these values fall well outside previously known limits for thermoregulation in this species (Cadena and Tattersall, 2009a).

Cooling and heating systems were controlled by an automated electronic system (Brock University, Electronics Shop, St Catharines, ON, CA).

Ambient temperature was measured by a platinum resistor thermometer in each compartment and recorded by the same electronic system every 30 s and whenever the animal moved from one side to the other one during the experiment. The location of the lizard (HC or CC) was recorded at the same times as the T_a . The T_a inside the HC when the lizard moved from the HC to the CC was called UET_a and the T_a inside the CC when the lizard moved from the CC to the HC was named LET_a. Throughout the course of an experiment, a lizard exhibited numerous UET_a and LET_a values, based on how often it shuttled. Ambient escape temperatures were used to describe thermoregulatory behaviours based on previous work (Cadena and Tattersall, 2009a) showing that these escape T_a measures accurately reflect changes in T_b in this species.

The second protocol performed in the shuttle box had no difference in the temperature between the compartments. Both sides had the T_a fixed at 34°C (normal preferred T_b in the laboratory for bearded dragons; Cadena and Tattersall, 2009a) throughout the experiment and the total number of spontaneous shuttles produced with no thermoregulatory drive was recorded (see detailed description below).

Protocol 1

The purpose of this protocol was to examine whether thermoregulatory control was altered in salt-loaded lizards. The first 3 h after the animal was placed in the shuttle box were used to allow habituation to the novel environment and were considered to be exploratory shuttling and therefore were not used in the analyses (Cadena and Tattersall, 2009a). After this interval, animals received an i.p. injection of isotonic (154 mmol l⁻¹) or hypertonic (1250 or 2500 mmol l⁻¹) saline solutions and were placed again in the shuttle box (in the same compartment where they were before the injection) for a further 4 h. This last interval was taken into account for the analysis of UET_a and LET_a and the number of shuttles. For this experiment, 11 animals were injected with all the three doses of saline.

Protocol 2

The aim of this protocol was to examine whether salt loading prevented or impinged on the lizard's natural propensity to move and behave spontaneously. In this protocol, the animal received the i.p. injection of saline solutions (154 or 2500 mmol l⁻¹) first thing in the morning and was immediately placed in the shuttle box. The reason for this was to capitalize on the natural tendency for lizards to initially explore the shuttle box when they are first placed into it. Previous research has shown that following this exploration interval, lizards will generally cease all shuttling entirely when there is no thermoregulatory drive (Cadena and Tattersall, 2009a). The experiment lasted 4 h and the number of shuttling events was analysed in this protocol. Fourteen lizards were injected with each saline concentration.

Gaping experiments

Lizards were placed in an acrylic box (24×24×40 cm) which had three of its four sides covered with paper to prevent distraction and reduce reflection. On the top of the box, an infrared thermal imaging camera (Mikron 7515; Oakland, NJ, USA) and accompanying MikroSpec RT[®] (Mikron) software were used to monitor the T_{head} and T_{body} . Two representative infrared thermal images used to calculate T_{head} and T_{body} can be observed in Fig. 4A,B. The acrylic box was positioned in an environmental chamber (Thermo Forma, Marietta, OH, USA) which was used to maintain a narrow range of T_a [T_a inside the acrylic box was about 37–39°C: a level sufficiently high to induce gaping in bearded dragons (Tattersall and Gerlach, 2005)].

A webcam was attached to the internal wall of the environmental chamber, facing the only side of the acrylic box that was not covered by the paper. Images of the lizard were collected by the webcam every 10 s (HandyAvis; Tempe, AZ, USA) and used to assess the percentage time engaged in gaping.

These experiments were conducted to assess whether salt loading influenced the lizard's gaping behaviour. The infrared thermal camera allowed us to monitor the lizard's T_{body} and when it reached at least 37°C (usually 3–4 h after they were placed in the acrylic box inside the environmental chamber) the animals received an i.p. saline injection (154, 625, 1250 or 2500 mmol l⁻¹) and were placed back in the observation

chamber for a further 3.5 h. Because the environmental chamber was slowly warmed, the i.p. injection happened before the chamber reached its complete thermal equilibrium. The percentage of the time spent in gaping was analysed from the webcam images monitoring the lizard (percent time was estimated over 30 min intervals from images captured every 10 s) prior to and following the injection. Eleven animals were injected in this protocol for each dose of saline.

Respirometry experiments

\dot{V}_{O_2} and EWL values were obtained by flow-through respirometry. The animal was placed in a cylindrical respirometer (total volume: 2.8 l) inside a temperature controlled environmental chamber (Sable Systems, Las Vegas, NV, USA). The T_a inside the respirometer was about 37.5°C. The incurrent air was dried through Nafion tubing using a counter-current water vapour extraction system (pure nitrogen was used to extract water vapour) and pushed into the respirometer at a rate of 1000 ml min⁻¹. A subsample of this air was pushed through the H₂O, CO₂ and O₂ analysers at 180 ml min⁻¹ (FlowBar-8; Sable Systems, Las Vegas, NV, USA). The water vapour density (WVD; µg ml⁻¹) was the first parameter analysed (RH200; Sable Systems, Las Vegas, NV, USA) and this record was later used to calculate the EWL. Then, the CO₂ percentage (CA-2A; Sable Systems, Las Vegas, NV, USA) and, finally, the O₂ percentage were recorded (FC-1B; Sable Systems, Las Vegas, NV, USA). Following acquisition, the three channels of gases were time shifted to account for the delay in sample transfer from each analyser (8–12 s delay determined by a bolus injection of nitrogen into the respirometer). A baseline sample of dry incurrent air was taken for 5 min every 25 min to ensure that the water, O₂ and CO₂ in the air offered to the animal remained constant over the experiment, and to provide the estimates of $F_{I_{O_2}}$, $F_{I_{CO_2}}$ and $F_{I_{H_2O}}$. One gas flow distributor (RM8 Intelligent Multiplexer; Sable Systems, Las Vegas, NV, USA) was used to control which gas sample (from respirometer or baseline) entered the analysers. All data were collected by using a data-acquisition system (AcqKnowledge v.3.8.1, BIOPAC Systems, Goleta, CA, USA) collecting values every second. Prior to analysis, all time-aligned gas channel data were Z-transformed to obtain instantaneous values (Lighton, 2008). The temperature inside the environmental chamber was monitored by a thermocouple meter (TC-2000; Sable Systems, Las Vegas, NV, USA) and the lizard's surface temperature was measured using a data logger (iButtons DS1922L, Maxim Integrate, San Jose, CA, USA) attached to its ventral surface with medical tape (Transpore, 3M).

The analysers were calibrated weekly or whenever was necessary (O₂ was calibrated daily prior to experimentation). The O₂ analyser was calibrated using dried air (20.95%); the CO₂ was calibrated using pure nitrogen as a zero value and a certified, pre-mixed gas source (1% CO₂) as a span value, and lastly, the H₂O analyser was also calibrated using pure nitrogen as a zero value and air bubbled through water of a known temperature as the span value using WVD estimates (Dossat and Horan, 2001). The \dot{V}_{O_2} (ml O₂ min⁻¹ STP) and EWL (mg H₂O min⁻¹) were calculated using the following equations (Lighton, 2008):

$$\dot{V}_{O_2} = FR_I \left[F_{I_{O_2}} - \left(F_{E_{O_2}} \frac{1 - F_{I_{O_2}} - F_{I_{CO_2}} - F_{I_{H_2O}}}{1 - F_{E_{O_2}} - F_{E_{CO_2}} - F_{E_{H_2O}}} \right) \right], \quad (1)$$

$$EWL = \frac{[FR_I(WVD_E - WVD_I)]}{1000}, \quad (2)$$

where FR_I is incurrent flow rate, $F_{I_{O_2}}$ is incurrent fractional concentration of oxygen (from baseline), $F_{E_{O_2}}$ is excurrent fractional concentration of oxygen, $F_{I_{CO_2}}$ is incurrent fractional concentration of carbon dioxide (from baseline), $F_{E_{CO_2}}$ is excurrent fractional concentration of carbon dioxide, $F_{I_{H_2O}}$ is incurrent fractional concentration of water vapour (from baseline), $F_{E_{H_2O}}$ is excurrent fractional concentration of water vapour, WVD_E is excurrent water vapour density and WVD_I is incurrent water vapour density.

Assuming that 1.0 ml of consumed oxygen produces 20 J of heat and for each milligram of water evaporated, 2.5 J is dissipated, then heat production (HP; J min⁻¹) and evaporative heat transfer (EHT; J min⁻¹) were also

calculated as follows (Randall et al., 1997):

$$HP = \dot{V}_{O_2} \times 20, \quad (3)$$

$$EHT = EWL \times 2.5. \quad (4)$$

The objective of these experiments was to examine the overall changes in oxygen consumption and whole body water loss during spontaneous periods of gaping and non-gaping, before and after isotonic (154 mmol l⁻¹) or hypertonic (625 mmol l⁻¹) saline injection. In this protocol, the animals were also placed in the acrylic box inside the environmental chamber until the T_{body} reached 37°C (monitored with the infrared thermal camera), following which the animals were transferred to the glass respirometer and placed inside an environmental chamber (also at 37°C) connected to the respirometry system. \dot{V}_{O_2} and EWL were recorded for 90 min, then animals received a saline injection (154 or 625 mmol l⁻¹) and oxygen consumption and water loss were registered for another 90 min. The percentage of the time spent gaping was analysed during the last 30 min before the transfer to the respirometer and during all the time that the animals were inside the respirometer (i.e. 180 min; data not shown). The ventral surface temperature was recorded throughout the experiment using a data logger attached to the skin. Eight animals were used for each saline concentration.

Statistical analysis

All the results are presented as means±s.e.m. The predicted plasma concentration and the values found were analysed by linear regression and the proportion of lizards that drank water within a 5 min period after salt loading was analysed using a chi-square test. Protocol 1 results were analysed using a two-way RM ANOVA (factors: direction—UET_a or LET_a— and saline treatment) was used to compare the effect of treatment on the UET_a and LET_a and one-way RM ANOVA was run to compare the number of shuttles between saline treatments (factor: treatment). Protocol 2 results were analysed using a paired *t*-test to compare the number of shuttles between saline treatments. Two-way RM ANOVA was performed to analyse the effect of salt loading on percentage of time spent in gaping, on T_{head} , on T_{body} and on the difference in these values ($T_{head}-T_{body}$) (factors for all comparisons: time and saline treatment) over time. A paired *t*-test was used to compare EWL and EWL/ \dot{V}_{O_2} between gaping and non-gaping intervals and a Wilcoxon signed-rank test was run to analyse \dot{V}_{O_2} data. Only gaping periods longer than 15 s in duration were utilized for the determination of \dot{V}_{O_2} and EWL values. A *t*-test was performed to analyse the effect of salt injection on %EWL and % \dot{V}_{O_2} (post injection values compared to pre injection values) and a Mann–Whitney rank-sum test was performed to compare % EWL/ \dot{V}_{O_2} data.

Whenever RM ANOVA resulted in significant main or interaction effects, a Holm–Šidák *post hoc* test was performed to verify where the differences existed. Residuals were tested for unequal variance and normality. In cases where log transformation was insufficient in terms of model assumptions, ranked data were analysed. Differences were considered significant when $P \leq 0.05$. All analyses were performed using SigmaPlot 11.

Acknowledgements

This study is part of the activities developed by C.S.S. during her PhD at the Joint UFSCar-UNESP Graduate Program of Physiological Sciences, São Carlos, SP, Brazil. We thank Tomasz Eles and Ian Black for their excellent assistance with maintenance of animals, and Dr Todd Gillis (University of Guelph) for assistance with the plasma osmolality measurements.

Competing interests

The authors declare no competing or financial interests.

Author contributions

G.J.T., K.C.B. and C.d.S.S. designed research, performed data analysis and prepared the manuscript prior to submission. C.d.S.S. and G.J.T. performed experiments.

Funding

C.d.S.S. was financially supported by Science Without Borders (Brazil) and Emerging Leaders in Americas Program (ELAP; Canada) fellowships. The research was supported by Natural Sciences and Engineering Council of Canada (NSERC) Discovery grant to G.J.T. [grant number RGPIN-2014-05814].

References

- Arad, Z. (1983). Thermoregulation and acid-base status in the panting dehydrated fowl. *J. Appl. Physiol. Respir. Environ. Exerc. Physiol.* **54**, 234–243.
- Baker, M. A. (1989). Effects of dehydration and rehydration on thermoregulatory sweating in goats. *J. Physiol.* **417**, 421–435.
- Baker, M. A. and Dawson, D. D. (1985). Inhibition of thermal panting by intracarotid infusion of hypertonic saline in dogs. *Am. J. Physiol.* **249**, R787–R791.
- Baker, M. A. and Turlejska, E. (1989). Thermal panting in dehydrated dogs: effects of plasma volume expansion and drinking. *Pflügers Arch.* **413**, 511–515.
- Barber, B. J. and Crawford, E. C. (1979). Dual threshold control of peripheral temperature in the lizard *Dipsosaurus dorsalis*. *Physiol. Zool.* **52**, 250–263.
- Bentley, P. J. (1959). Studies on the water and electrolyte metabolism of the lizard *Trachysaurus rugosus* (Gray). *J. Physiol.* **145**, 37–47.
- Berk, M. L. and Heath, J. E. (1975). An analysis of behavioral thermoregulation in the lizard, *Dipsosaurus dorsalis*. *J. Therm. Biol.* **1**, 15–22.
- Bouâouda, H., Achâaban, M. R., Ouassat, M., Oukassou, M., Piro, M., Challet, E., El Allali, K. and Pévet, P. (2014). Daily regulation of body temperature rhythm in the camel (*Camelus dromedarius*) exposed to experimental desert conditions. *Physiol. Rep.* **2**, e12151.
- Bradshaw, S. D. (1997). *Homeostasis in Desert Reptiles*. Berlin: Springer.
- Bradshaw, S. D. and Shoemaker, V. H. (1967). Aspects of water and electrolyte changes in a field population of *Amphibolurus* lizards. *Comp. Biochem. Physiol.* **20**, 855–865.
- Bradshaw, D., Ladyman, M. and Stewart, T. (2007). Effect of hypernatraemia and the neurohypophysial peptide, arginine vasotocin (AVT) on behavioural thermoregulation in the agamid lizard, *Ctenophorus ornatus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **150**, 34–40.
- Cadena, V. and Tattersall, G. J. (2009a). The effect of thermal quality on the thermoregulatory behavior of the bearded dragon *Pogona vitticeps*: influences of methodological assessment. *Physiol. Biochem. Zool.* **82**, 203–217.
- Cadena, V. and Tattersall, G. J. (2009b). Decreased precision contributes to the hypoxic thermoregulatory response in lizards. *J. Exp. Biol.* **212**, 137–144.
- Caputa, M., Kadziela, W. and Narebski, J. (1976). Significance of cranial circulation for the brain homeothermia in rabbits. I. The brain-arterial blood temperature gradient. *Acta Neurobiol. Exp. (Wars)* **36**, 613–623.
- Crowley, S. R. (1987). The effect of desiccation upon the preferred body temperature and activity level of the lizard *Sceloporus undulatus*. *Copeia* **1987**, 25–32.
- Dmi'el, R. (1986). Selective sweat secretion and panting modulation in dehydrated goats. *J. Therm. Biol.* **11**, 157–159.
- Doris, P. A. and Baker, M. A. (1981). Hypothalamic control of thermoregulation during dehydration. *Brain Res.* **206**, 219–222.
- Dossat, R. J. and Horan, T. J. (2001). Psychrometric properties of air. In *Principles of Refrigeration* (ed. R. J. Dossat and T. J. Horan), pp. 57–70. New York, NY: Prentice Hall.
- Dupré, R. K. and Crawford, E. C. (1986). Elevation of the panting threshold of the desert iguana, *Dipsosaurus dorsalis*, during dehydration: potential roles of changes in plasma osmolality and body fluid volume. *J. Comp. Physiol. B.* **156**, 377–381.
- Ford, S. S. and Bradshaw, S. D. (2006). Kidney function and the role of arginine vasotocin in three agamid lizards from habitats of differing aridity in Western Australia. *Gen. Comp. Endocrinol.* **147**, 62–69.
- Fuller, A., Meyer, L. C. R., Mitchell, D. and Maloney, S. K. (2007). Dehydration increases the magnitude of selective brain cooling independently of core temperature in sheep. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **293**, R438–R446.
- Hales, J. R. S. (1973). Effects of exposure to hot environments on the regional distribution of blood flow and on cardiorespiratory function in sheep. *Pflügers Arch.* **344**, 133–148.
- Hales, J. R. S. and Brown, G. D. (1974). Net energetic and thermoregulatory efficiency during panting in the sheep. *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.* **49**, 413–422.
- Heath, J. E. (1964). Head–body temperature differences in horned lizards. *Physiol. Zool.* **37**, 273–279.
- Heath, J. E. (1966). Venous shunts in the cephalic sinuses of horned lizards. *Physiol. Zool.* **39**, 30–35.
- Heatwole, H., Firth, B. T. and Webb, G. J. W. (1973). Panting thresholds of lizards—I. Some methodological and internal influences on the panting threshold of an Agamid, *Amphibolurus muricatus*. *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.* **46**, 799–826.
- IUPS Thermal Commission. (2001). Glossary of terms for thermal physiology. *Jpn. J. Physiol.* **51**, 245–280.
- Jessen, C. (2001). Selective brain cooling in mammals and birds. *Jpn. J. Physiol.* **51**, 291–301.
- Jessen, C., Dmi'el, R., Choshniak, I., Ezra, D. and Kuhnen, G. (1998). Effects of dehydration and rehydration on body temperatures in the black Bedouin goat. *Pflügers Arch.* **436**, 659–666.
- Kleinhaus, S., Pinshow, B., Bernstein, M. H. and Degen, A. A. (1985). Brain temperature in heat-stressed, water deprived desert phasianids: sand partridge

- (*Ammoperdix heyi*) and chukar (*Alectoris chukar sinaica*). *Physiol. Zool.* **58**, 105-116.
- Konishi, M., Nagashima, K., Asano, K. and Kanosue, K.** (2003). Attenuation of metabolic heat production and cold-escape/warm-seeking behaviour during a cold exposure following systemic salt loading in rats. *J. Physiol.* **551**, 713-720.
- Konishi, M., Kanosue, K., Kano, M., Kobayashi, A. and Nagashima, K.** (2007). The median preoptic nucleus is involved in the facilitation of heat-escape/cold-seeking behavior during systemic salt loading in rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **292**, R150-R159.
- Ladyman, M. and Bradshaw, D.** (2003). The influence of dehydration on the thermal references of the Western tiger snake, *Notechis scutatus*. *J. Comp. Physiol. B.* **173**, 239-246.
- Lighton, J. R. B.** (2008). Flow-through respirometry: the equations. In *Measuring Metabolic Rates. A Manual for Scientists* (ed. J. R. B. Lighton), pp. 100-104. New York: Oxford University Press.
- Maloney, S. K. and Dawson, T. J.** (1998). Changes in pattern of heat loss at high ambient temperature caused by water deprivation in a large flightless bird, the Emu. *Physiol. Zool.* **71**, 712-719.
- Malvin, G. M. and Wood, S. C.** (1991). Behavioral thermoregulation of the toad, *Bufo marinus*: effects of air humidity. *J. Exp. Zool.* **258**, 322-326.
- McConaghy, F. F., Hales, J. R. S., Rose, R. J. and Hodgson, D. R.** (1995). Selective brain cooling in the horse during exercise and environmental heat stress. *J. Appl. Physiol.* **79**, 1849-1854.
- McKinley, M. J., McAllen, R. M., Whyte, D. and Mathai, M. L.** (2008). Central osmoregulatory influences on thermoregulation. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **35**, 701-705.
- Melville, J. and Schulte, J. A.** (2001). Correlates of active body temperatures and microhabitat occupation in nine species of central Australian agamid lizards. *Aust. Ecol.* **26**, 660-669.
- Mitchell, D., Maloney, S. K., Jessen, C., Laburn, H. P., Kamerman, P. R., Mitchell, G. and Fuller, A.** (2002). Adaptive heterothermy and selective brain cooling in arid-zone mammals. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* **131**, 571-585.
- Nagashima, K., Nakai, S., Konishi, M., Su, L. and Kanosue, K.** (2001). Increased heat-escape/cold-seeking behaviour following hypertonic saline injection in rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **280**, R1031-R1036.
- Nakamura, K. and Morrison, S. F.** (2010). A thermosensory pathway mediating heat-defense Responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 8848-8853.
- O'Connor, M. P. and Tracy, C. R.** (1992). Thermoregulation by juvenile toads of *Bufo woodhousei* in the field and in the laboratory. *Copeia* **1992**, 865-876.
- Oelrich, T. M.** (1956). The anatomy of the head of *Ctenosaura pectinata* (Iguanidae). *Mus. Zool. Univ. Mich. Misc. Publ.* **94**, 1-122.
- Owen, M. D., Matthes, R. D. and Gisolfi, C. V.** (1989). Effect of cerebrospinal fluid hyperosmolality on sweating in the heatstressed patas monkey. *J. Appl. Physiol.* **67**, 128-133.
- Parmenter, C. J. and Heatwole, H.** (1975). Panting thresholds of lizards. IV. The effect of dehydration on the panting threshold of *Amphibolurus barbatus* and *Amphibolurus muricatus*. *J. Exp. Zool.* **191**, 327-332.
- Prest, M. R. and Pough, F. H.** (1989). Interaction of temperature and hydration on locomotion of toads. *Funct. Ecol.* **3**, 693-699.
- Randall, D., Burggren, W. and French, K.** (1997). Using energy: meeting environmental challenges. In *Eckert Animal Physiology: Mechanisms and Adaptations* (ed. D. Randall, W. Burggren and K. French), pp. 665-723. New York, NY: W. H. Freeman Company.
- Rice, G. E.** (1982). Plasma arginine vasotocin concentrations in the lizard *Varanus gouldii* (Gray) following water loading, salt loading, and dehydration. *Gen. Comp. Endocrinol.* **47**, 1-6.
- Sannolo, M., Mangiacotti, M., Sacchi, R. and Scali, S.** (2014). Keeping a cool mind: head-body temperature differences in the common wall lizard. *J. Zool.* **293**, 71-79.
- Schmidt-Nielsen, K., Schmidt-Nielsen, B., Jarnum, S. A. and Houpt, T. R.** (1957). Body temperature of the camel and its relation to water economy. *Am. J. Physiol.* **188**, 103-112.
- Schmidt-Nielsen, K., Crawford, E. C., Jr, Newsome, A. E., Rawson, K. S. and Hammel, H. T.** (1967). Metabolic rate of camels: effect of body temperature and dehydration. *Am. J. Physiol.* **212**, 341-346.
- Silva, N. L. and Boulant, J. A.** (1984). Effects of osmotic pressure, glucose, and temperature on neurons in preoptic tissue slices. *Am. J. Physiol.* **247**, R335-R345.
- Smits, A. W. and Kozubowski, M. M.** (1985). Partitioning of body fluids and cardiovascular responses to circulatory hypovolaemia in the turtle, *Pseudemys scripta elegans*. *J. Exp. Biol.* **116**, 237-250.
- Spotila, J. R., Terpin, K. M. and Dodson, P.** (1977). Mouth gaping as an effective thermoregulatory device in alligators. *Nature* **265**, 235-236.
- Tattersall, G. J. and Gerlach, R. M.** (2005). Hypoxia progressively lowers thermal gaping thresholds in bearded dragons, *Pogona vitticeps*. *J. Exp. Biol.* **208**, 3321-3330.
- Tattersall, G. J., Cadena, V. and Skinner, M. C.** (2006). Respiratory cooling and thermoregulatory coupling in reptiles. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **154**, 302-318.
- Taylor, C. R.** (1970). Dehydration and heat. Effects on temperature regulation of East African ungulates. *Am. J. Physiol.* **219**, 1136-1139.
- Turlejska, E. and Baker, M. A.** (1986). Elevated CSF osmolality inhibits thermoregulatory heat loss responses. *Am. J. Physiol.* **251**, R749-R754.
- Willmer, P., Stone, G. and Johnston, I.** (2005). Temperature and its Effects. In *Environmental Physiology of Animals* (ed. P. Willmer, G. Stone and I. Johnston), pp. 209-210. Malden: Blackwell Publishing.