

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

PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES OPIÓIDES MU E KAPPA DA
SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL NA FEBRE
INDUZIDA POR ESTRESSE DE CONTENÇÃO

Caroline Cristina Silva

JABOTICABAL – SP

2016

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

PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES OPIÓIDES MU E KAPPA DA
SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL NA FEBRE
INDUZIDA POR ESTRESSE DE CONTENÇÃO

Caroline Cristina Silva

Dissertação apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas- UFSCar/ UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Kênia Cardoso Bicego

JABOTICABAL – SP

2016

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

S586p Silva, Caroline Cristina
Participação dos receptores opióides mu e kappa da substância cinzenta periaquedutal na febre induzida por estresse de contenção / Caroline Cristina Silva. - São Carlos : UFSCar, 2016.
73 p.

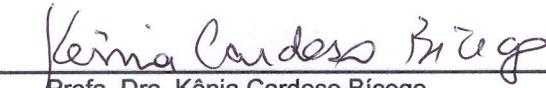
Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2016.

1. Temperatura corporal. 2. Índice de perda de calor. 3. Consumo de oxigênio. 4. Receptores opióides. 5. nor-BNI. I. Título.

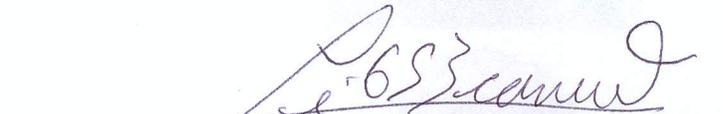


Folha de Aprovação

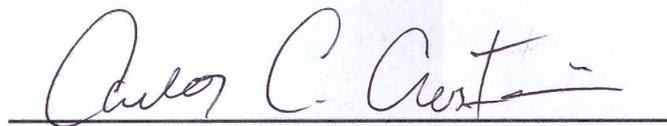
Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Caroline Cristina Silva, realizada em 15/07/2016:



Prof. Dra. Kênia Cardoso Bicego
UNESP



Prof. Dr. Luiz Guilherme de Siqueira Branco
USP



Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani
UNESP

Dedico aos meus pais, Marlene e Ademir, aos meus irmãos, Gabi e Pedro e aos meus avós Sirlei e Adão, por todo o amor, carinho, paciência e por sempre estarem ao meu lado em todas as minhas decisões.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por estar sempre ao meu lado me guiando e me protegendo, e por ter colocado em meu caminho pessoas maravilhosas e grandes oportunidades.

Agradeço aos meus pais, Marlene e Ademir, aos meus irmãos, Gabi e Pedro, e aos meus avós, Sirlei e Adão, que acreditaram na minha capacidade, não medindo esforços para que eu atingisse os meus objetivos, sempre me motivando a seguir em frente mesmo com todas as dificuldades encontradas no caminho, e pelo amor, carinho e paciência que sempre tiveram por mim.

À toda minha família pelo apoio e pelos momentos.

À minha orientadora Kênia, pela oportunidade, pelo aprendizado, paciência, atenção e pela confiança que depositou em mim durante esses cinco anos de orientação, sempre muito prestativa, bem-humorada, sendo um exemplo profissional pra mim por estar sempre preocupada no crescimento científico dos seus orientados.

À professora Luciane Helena Gargaglioni Batalhão, pela colaboração nesse trabalho, e também pelos ensinamentos, discussões e pela amizade.

Aos técnicos Euclides Roberto Secato e Damares, por serem sempre muito prestativos e atenciosos, auxiliando na manutenção dos animais e pela amizade.

À todos os meus colegas de laboratório, que me ajudaram e me ensinaram muito, além de serem ótimas companhias: Carol Scarpellini (um agradecimento especial por sempre ser muito prestativa e por me ajudar em todas as minhas dúvidas), Lucas, Vivian, Camila, Luis Gustavo (Lango), Lays (Sou-dada), Mariane (Baiana), Danuzia, Elisa, Jolene, Victor (Trakinas), Gabi Monteiro, Lara, Giuliana (Laka), Carlos, Leonardo (Nikito), Jaime, Thiago, Gabi Pina, Sheila e Glauber.

Aos meus amigos, e colegas do Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, pela companhia, risadas e amizade durante esses dois anos: Mariane (Baiana), Victor (Trakinas), Willian, Lucas Gomes e Naiara.

Aos professores do Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas- UFSCar/UNESP pelos ensinamentos e por fazerem parte da minha formação acadêmica.

Ao secretário do Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas- UFSCar/UNESP, Alexandre, pela eficiência, dedicação e atenção no trabalho desempenhado.

Aos animais que proporcionaram o desenvolvimento da pesquisa.

À Coordenação De Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

Enfim, a todos que participaram, direta ou indiretamente, da realização deste estudo, e aos que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal nesses dois anos, meus sinceros agradecimentos.

“Tudo posso naquele que me fortalece”

(Filipenses 4:13)

RESUMO

Os opióides endógenos estão envolvidos na analgesia, termorregulação e respostas fisiológicas a vários estímulos estressantes, como infecção, estresse psicológico e hipóxia. Os receptores mu e kappa no hipotálamo desempenham um papel na febre induzida por endotoxina e anapirexia induzida por hipoxia (resposta oposta à febre), respectivamente. Além disso, a substância cinzenta periaquedutal (PAG), que expressa ambos os receptores mu e kappa, está envolvida na defesa e respostas de termorregulação. Assim, nossa hipótese é que os receptores opióides mu e kappa na PAG modulam a febre induzida por contenção em ratos, ativando e inibindo esta resposta, respectivamente. Para este fim, a temperatura corporal (Tc) e o índice de perda de calor (IPC; inferência para a conservação/perda de calor) e o consumo de oxigênio ($\dot{V}O_2$; inferência para a termogênese) de ratos Wistar não anestesiados submetidos ou não ao estresse de contenção, foi monitorado antes e depois de microinjeção intra-PAG do antagonista seletivo do receptor opióide mu (CTAP; 1 e 10 $\mu\text{g}/100\text{ nL}$ / animal), antagonista seletivo do receptor opióide kappa (nor-BNI; 1 e 4 $\mu\text{g}/100\text{ nL}$ / animal) ou veículo (solução salina; 100 nL / animal). A microinjeção de CTAP ou nor-BNI não alterou a Tc ou IPC dos animais em eutermia. Durante o estresse de contenção, a Tc aumentou em todos os grupos de animais. No entanto, este efeito foi significativamente menor no grupo de animais tratados com CTAP, e significativamente maior em animais tratados com nor-BNI. Nenhum tratamento afetou o IPC, mas o CTAP diminuiu a termogênese e o nor-BNI aumentou a termogênese. Os resultados indicam que os receptores opióides mu e kappa na PAG de ratos desempenham um papel pirogênico e antipirético, respectivamente, durante a febre induzida pelo estresse de contenção e estes receptores na PAG podem não ser essenciais para a manutenção de Tc durante eutermia.

Palavras-chave: temperatura corporal, índice de perda de calor, consumo de oxigênio, receptores opióides, nor-BNI, CTAP

ABSTRACT

The endogenous opioids are involved in analgesia, thermoregulation and physiological responses to various stressful stimuli such as infection, psychological stress and hypoxia. The mu and kappa receptors in the hypothalamus play a role in endotoxin-induced fever and hypoxia-induced anapyrexia (opposite response to fever), respectively. In addition, periaqueductal gray (PAG), which express both mu and kappa receptors, is involved in defence and thermoregulatory responses. Thus, our hypothesis is that mu and kappa opioid receptors in the PAG modulate the restraint-induced fever in rats by activating and inhibiting this response, respectively. To this end, body temperature (Tb) and heat loss index (HLI; inference for heat conservation/loss) and oxygen consumption ($\dot{V}O_2$; inference for thermogenesis) of unanesthetized Wistar rats submitted or not to restraint stress, was monitored before and after intra-PAG microinjection of the selective mu opioid receptor antagonist (CTAP; 1 and 10 $\mu\text{g}/100\text{ nL}$ / animal), the selective kappa-opioid receptor antagonist (nor-BNI; 1 and 4 $\mu\text{g}/100\text{ nL}$ / animal), or vehicle (saline; 100 nL/ animal). CTAP and nor-BNI did not change the Tb or the HLI of the animals in eutherms. During the restraint stress, Tb increased in all groups of animals. However, this effect was significantly lower in animals treated with CTAP, and significantly higher in animals treated with nor-BNI. No treatment affected HLI, but CTAP decreased thermogenesis and nor-BNI increased thermogenesis. The results indicate that the mu and kappa opioid receptors in the PAG of rats play a pyrogenic and antipyretic role, respectively, during fever induced by restraint stress and these receptors in PAG may not be essential for the maintenance of Tb during eutherms.

Keywords: body temperature, heat loss index, oxygen consumption, opioid receptors, nor-BNI, CTAP

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquemas de cortes coronais ao longo das colunas longitudinais da substância cinzenta periaquedutal (PAG), retirados do atlas de Paxinos e Watson, 2005. DMPAG= PAG dorsomedial; DLPAG= PAG dorsolateral; LPAG= PAG lateral; VLPAG= PAG ventrolateral; Aq= aqueduto. Os números abaixo das imagens indicam as distâncias caudais em relação ao bregma (em milímetros).....23
- Figura 2.** Bomba de microinjeção (modelo 310, Stoelting CO., IL, EUA).....27
- Figura 3.** Datalogger (SubCue, Calgary, AT, CA) implantado na cavidade abdominal dos ratos para medida de temperatura corporal.....28
- Figura 4.** (A) Câmera infravermelha (Flir SC660, Suíça). (B) Imagem infravermelha mostrando a temperatura de três pontos temperatura da pele do segundo terço da cauda do animal e a temperatura de dois pontos da temperatura ambiente.....29
- Figura 5.** Sistema de respirometria aberta (Sable Systems, Las Vegas, NV, EUA).....31
- Figura 6.** Tubo de contenção.....33
- Figura 7.** (A) Fotomicrografia do encéfalo de um animal representativo dos grupos mostrando o sítio típico de microinjeção (seta) na substância cinzenta periaquedutal dorsolateral (DLPAG) na distância 6,24 mm posterior ao bregma com base em Paxinos e Watson (2005). (B) Diagramas representativos mostrando os locais de microinjeção intra-PAG (círculos pretos) e fora da PAG (círculos cinza) nas distâncias (em mm) posteriores ao bregma com base em Paxinos e Watson (2005). DMPAG= PAG dorsomedial; DLPAG=PAG dorsolateral; LPAG=PAG lateral; Aq= aqueduto.....36
- Figura 8.** Efeito da microinjeção de antagonista de receptores opióides μ , CTAP (1 and 10 μ g/ 100 nL/ animal), ou salina (veículo; 100 nL) na substância cinzenta periaquedutal (PAG) sobre a temperatura corporal (A) e o índice de perda de calor (B) de animais não submetidos ao estresse de contenção.. A seta indica o momento da microinjeção. Número

de animais de cada grupo é apresentado entre parênteses. Tci é a temperatura corporal média antes de qualquer tratamento e IPCi é o índice de perda de calor antes de qualquer tratamento.....38

Figura 9. Efeito da microinjeção de antagonista de receptores opióides mu, CTAP (1 and 10 µg/ 100 nL/ animal), ou salina (veículo; 100 nL) na substância cinzenta periaquedutal (PAG) sobre a temperatura corporal (A) e o índice de perda de calor (B) de animais submetidos ao estresse de contenção. A seta indica o momento da microinjeção. Número de animais de cada grupo é apresentado entre parênteses. Tci é a temperatura corporal média antes de qualquer tratamento e IPCi é o índice de perda de calor antes de qualquer tratamento. * p< 0,05, diferença significativa entre CTAP (1 µg) e salina.....40

Figura 10. Imagens termográficas mostrando as temperaturas da pele da cauda e do ambiente utilizadas para o cálculo do índice de perda de calor. A) foto aos 10 minutos antes da contenção; B) foto aos 10 minutos de contenção em tubo de tela; C) foto aos 10 minutos após o término da contenção. Animal representativo do grupo salina (veículo, 100 nL).....41

Figura 11. Efeito de microinjeção de antagonista de receptores opióides mu, CTAP (1 µg / 100 nL / animal) ou solução salina (veículo; 100 nL) na substância cinzenta periaquedutal sobre o consumo de oxigênio ($\dot{V}O_2$) de animais não submetidos (A) e submetidos (B) ao estresse de contenção. A seta indica o momento da microinjeção. Número de animais de cada grupo é apresentado entre parênteses. $\dot{V}O_{2i}$ é o consumo de oxigênio antes de qualquer tratamento.* p< 0,05, diferença significativa entre CTAP (1 µg) e salina.....42

Figura 12. Efeito da microinjeção de antagonista de receptores opióides kappa, nor-BNI (1 and 4 µg/ 100 nL/ animal), ou salina (veículo; 100 nL) na substância cinzenta periaquedutal (PAG) sobre a temperatura corporal (A) e o índice de perda de calor (B) de animais não submetidos ao estresse de contenção. A seta indica o momento da microinjeção. Número de animais de cada grupo é apresentado entre parênteses. Tci é a temperatura corporal média antes de qualquer tratamento e IPCi é o índice de perda de calor antes de qualquer tratamento.....44

Figura 13. Efeito da microinjeção de antagonista de receptores opióides kappa, nor-BNI (1 and 4 $\mu\text{g}/ 100 \text{ nL}/ \text{ animal}$), ou salina (veículo; 100 nL) na substância cinzenta periaquedutal (PAG) sobre a temperatura corporal (A) e o índice de perda de calor (B) de animais submetidos ao estresse de contenção. A seta indica o momento da microinjeção. Número de animais de cada grupo é apresentado entre parênteses. T_{ci} é a temperatura corporal média antes de qualquer tratamento e IPC_i é o índice de perda de calor antes de qualquer tratamento. * $p < 0,05$, diferença significativa entre nor-BNI (1 μg) e salina.....46

Figura 14. Efeito de microinjecção de antagonista de receptores opióides kappa, nor-BNI (1 $\mu\text{g} / 100 \text{ nL} / \text{ animal}$) ou solução salina (veículo; 100 nL) na substância cinzenta periaquedutal sobre o consumo de oxigênio ($\dot{V}O_2$) de animais não submetidos (A) e submetidos (B) ao estresse de contenção. A seta indica o momento da microinjeção. Número de animais de cada grupo é apresentado entre parênteses. $\dot{V}O_{2i}$ é o consumo de oxigênio antes de qualquer tratamento.* $p < 0,05$, diferença significativa entre nor-BNI (1 μg) e salina.....48

Figura 15. Desenho esquemático (adaptado de Kataoka et al, 2014), sugerindo a participação da substância cinzenta periaquedutal (PAG) na via da febre induzidapor estresse psicológico, recebendo aferências do hipotálamo dorsomedial (DMH), que por sua vez recebe da área pré-optica (APO) e enviando para a rafe medular rostral (rMR), a qual ativa os neurônios da coluna intermedolateral (IML), ativando os efetores, que aumentam a produção de energia térmica (termogênese) e a conservação de energia térmica (vasoconstrição periférica), aumentando a temperatura corporal de forma regulada (febre). Essa febre induzida pelo estresse apresenta uma modulação pelos receptores opióides da PAG, através da termogênese, uma vez que os receptores mu atuam como pirogênicos e os receptores kappa como antipiréticos.....53

LISTA DE ABREVIATURAS

APO	Área pré-optica
Aq	Aqueduto
CTAP	antagonista seletivo de receptores mu
DLPAG	PAG dorsolateral
DMH	Hipotálamo dorsomedial
DMPAG	PAG dorsomedial
F_eO₂	Fração de entrada de oxigênio (do <i>baseline</i>)
FR_s	Fluxo de ar que sai do respirômetro
F_sO₂	Fração de saída de oxigênio (do respirômetro)
Intra-PAG	Animais cujo sítio de microinjeção foi localizado dentro da substância cinzenta periquedutal.
IPC	Índice de perda de calor;
LPAG	PAG lateral
LPS	Lipopolissacarídeo
MnPO	Núcleo pre-óptico mediano
nor-BNI	antagonista seletivo de receptores kappa
PAG	Substância cinzenta periquedutal.
Peri-PAG	Animais cujo sítio de microinjeção foi localizado dentro da substância cinzenta periquedutal
PG	Prostaglandinas
PGE₂	Prostaglandina E ₂
RQ	Quociente Respiratório
rRM	Rafe bulbar rostral
SNC	Sistema nervoso central
Ta	Temperatura ambiente
TAM	Tecido adiposo marrom
Tc	Temperatura corporal
Tp	Temperatura da pele da cauda.
VLPAG	PAG ventrolateral
VO₂	Consumo de oxigênio (ml.kg ⁻¹ min ⁻¹ STPD)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1. REGULAÇÃO DA TEMPERATURA CORPORAL.....	15
1.2. FEBRE POR AGENTES INFECCIOSOS E POR ESTRESSE PSICOGÊNICO ...	17
1.3. SISTEMA OPIÓIDE E TERMORREGULAÇÃO	20
1.4. SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL (PAG) E TERMORREGULAÇÃO.....	22
2. OBJETIVO	25
2.1. OBJETIVO ESPECÍFICO	25
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1. ANIMAIS	26
3.2. FÁRMACOS UTILIZADOS	26
3.3. CIRURGIAS.....	26
3.4. MICROINJEÇÕES.....	27
3.5. DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA CORPORAL	28
3.6. DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE PERDA DE CALOR.....	28
3.7. DETERMINAÇÃO DO CONSUMO DE OXIGÊNIO.....	29
3.8. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	31
3.8.1. Efeito da microinjeção intra-PAG de antagonista seletivo de receptores opióides mu, CTAP, sobre a Tc e o índice de perda de calor de ratos não submetidos ao estresse de contenção.....	31
3.8.2. Efeito da microinjeção intra-PAG de CTAP sobre a Tc e o índice de perda de calor de ratos submetidos ao estresse de contenção.....	31
3.8.3. Efeito da microinjeção intra-PAG de CTAP sobre o consumo de O ₂ de ratos submetidos ao estresse de contenção.....	32
3.8.4. Efeito da microinjeção intra-PAG de antagonista seletivo de receptores opióides kappa, nor-BNI, sobre a Tc e o índice de perda de calor de ratos não submetidos ao estresse de contenção.....	32
3.8.5. Efeito da microinjeção intra-PAG de nor-BNI sobre a Tc e o índice de perda de calor de ratos submetidos ao estresse de contenção.....	32
3.8.6. Efeito da microinjeção intra-PAG nor-BNI sobre o consumo de O ₂ de ratos submetidos ao estresse de contenção.....	33

3.9. HISTOLOGIA	33
3.10. ANÁLISE DOS DADOS	34
4. RESULTADOS	35
4.1. Histologia	35
4.2. Efeito da microinjeção intra-PAG do antagonista seletivo do receptor opióide mu, CTAP, sobre a temperatura corporal (Tc), o índice de perda de calor (IPC) e o consumo de oxigênio ($\dot{V}O_2$) de ratos submetidos ou não ao estresse de contenção.....	37
4.3. Efeito da microinjeção intra-PAG do antagonista seletivo do receptor opióide kappa, nor-BNI, sobre a temperatura corporal (Tc), o índice de perda de calor (IPC) e o consumo de oxigênio ($\dot{V}O_2$) de ratos submetidos ou não ao estresse de contenção.....	43
5. DISCUSSÃO	49
6. CONCLUSÃO.....	54
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

1. INTRODUÇÃO

1.1. REGULAÇÃO DA TEMPERATURA CORPORAL

A temperatura é um dos principais fatores ambientais que afetam os animais (RANDALL et al., 2000). Desse modo, a manutenção da temperatura corporal (T_c) dentro de certos limites, por meio de mecanismos termorreguladores é extremamente importante para a sua sobrevivência, uma vez que ela tem forte influência sobre os parâmetros fisiológicos e bioquímicos, como a atividade enzimática (LEHNINGER, 2000), função imunológica (WENISCH et al., 1996), contratilidade muscular (WASSERTROM e VITES, 1999), atividade neuronal (AIHARA et al., 2001), entre outras, e também pelo fato da vida dos animais limitar-se a uma faixa restrita de temperaturas, sendo que alguns suportam um intervalo de variação bem limitado, enquanto outros toleram um intervalo mais amplo (SCHMIDT-NIELSEN, 2002). A T_c além de influenciar vários parâmetros também pode ser influenciada por vários estímulos ambientais, como a temperatura ambiente (T_a).

A maioria das espécies endotérmicas (mamíferos e aves), as quais dependem de uma fonte interna de energia térmica (metabolismo) para manter sua T_c aproximadamente constante em função das flutuações da T_a , regulam a T_c por meio de mecanismos termorreguladores autonômicos e comportamentais, que são involuntários e voluntários, respectivamente. Já os vertebrados ectotérmicos (peixes, anfíbios e répteis), os quais dependem de uma fonte externa de energia térmica (radiação solar, por exemplo), regulam sua T_c essencialmente por meio de mudanças comportamentais, pois diferente dos endotermos, em geral apresentam redução da taxa metabólica e do isolamento térmico (BÍCEGO et al., 2007)

Os mecanismos termorreguladores podem ser divididos nos mecanismos de ganho (conservação e produção) e os de perda de energia térmica (BRANCO et al., 2005; GUYTON e HALL, 2006). Nos mamíferos, a conservação de energia térmica ocorre principalmente por vasoconstrição periférica e piloereção, embora alguns animais possuam outros artifícios como mecanismo contracorrente de fluxo sanguíneo periférico e/ou camada subcutânea de gordura (BÍCEGO et al., 2007). Já os mecanismos de produção de energia térmica, além da resultante do metabolismo basal (termogênese obrigatória), podem ser dependentes ou não do tremor da musculatura esquelética (termogênese facultativa) frente a condições de frio. Neste caso, são definidas a termogênese por tremor

da musculatura esquelética estriada, principal forma de produção de calor em humanos adultos e na maioria dos grandes mamíferos, e a termogênese independente de tremor, pelo tecido adiposo marrom, nos mamíferos placentários, que é muito importante para os de pequeno tamanho, recém-nascidos e para os aclimatados ao frio, sendo presente também em adultos humanos (MACKOWIAK, 1998; BRANCO et al., 2005; GUYTON e HALL, 2006; NEDERGAARD et al., 2007). Finalmente, os mecanismos de perda de energia térmica são divididos em perda seca (vasodilatação periférica) e perda evaporativa de calor como sudorese (humanos, equinos, bovinos, entre outros), ofegação (cães, gatos, ovelhas, aves) e o comportamento de espalhar saliva sobre os pêlos (roedores e alguns marsupiais) (GUYTON e HALL, 2006; BÍCEGO et al., 2007).

Enquanto os mecanismos termorreguladores autonômicos (involuntários) de ganho e de perda de energia térmica permitem que o organismo evite grandes variações da sua T_c numa ampla faixa térmica ambiental, o mecanismo termorregulador comportamental, considerado o mais antigo na escala filogenética, está relacionado com a procura por um ambiente quente ou frio, contato com superfícies quentes ou frias, adoção de posturas corporais (encolhidas ou estiradas) que facilitem ou evitem a troca de calor do animal com o ambiente. O mecanismo comportamental é considerado o mais econômico e, portanto de importância vital para os animais (BÍCEGO et al., 2007).

As respostas dos organismos às variações agudas da T_a são essencialmente reguladas por mecanismos neurais de retroalimentação (*feedback*) e de regulação por antecipação (*feedforward*) envolvendo regiões e circuitos do SNC, como o hipotálamo (KANOSUE et al., 2010). A área pré-óptica do hipotálamo anterior (APO), localizada no diencéfalo dos vertebrados, é considerada uma das principais regiões encefálicas envolvidas na termorregulação de mamíferos e talvez de todos os vertebrados, uma vez que ela é uma região termosensível, 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).

A APO contém neurônios sensíveis a variação de temperatura (cerca de 20% dos neurônios da APO), que são sensíveis à variação da própria temperatura hipotalâmica e recebem informações sinápticas aferentes dos termorreceptores. Esses neurônios ativam mecanismos de perda de energia térmica e inibem mecanismos de produção de energia térmica. Os neurônios insensíveis a variações de temperatura (cerca de 75% do total), por

outro lado, apresentam pouca ou nenhuma mudança na sua atividade espontânea frente a alterações na temperatura local e não recebem informações aferentes da periferia (BOULANT, 1998; 2006; GRIFFIN et al., 2001), quando a temperatura é reduzida, a frequência dos neurônios sensíveis a temperatura é reduzida, prevalecendo a dos neurônios insensíveis, os quais se conectam por meio de sinapses inibitórias e excitatórias e com os neurônios efetores de perda e produção de energia térmica respectivamente, controlando a Tc no frio e exercendo importante papel como sinal de referência para a ação dos neurônios termossensíveis (BOULANT, 1998; 2000; 2006).

É importante mencionar que a APO apresenta conexões com várias outras regiões do cérebro envolvidas na ativação dos mecanismos termorreguladores efetores tais como *locus coeruleus*, hipotálamo dorsomedial (DMH), núcleos da Raphe (MORRISON e NAKAMURA, 2011) e substância cinzenta periaquedutal (YOSHIDA et al., 2002).

1.2. FEBRE POR AGENTES INFECCIOSOS E POR ESTRESSE PSICOGÊNICO

São descritos e conhecidos cinco estados térmicos: a eutermia, em que o animal apresenta a Tc típica da espécie, em repouso, podendo empregar ou não energia metabólica extra, isto é, além daquela já consumida pelo metabolismo basal, para a manutenção da Tc. Se ocorrer aumento ou redução extremos da Ta, a Tc pode acompanhar essas alterações e não mais se manter em eutermia, mesmo com a ativação de mecanismos de perda ou de ganho de energia térmica, caracterizando os estados de hipertermia e hipotermia, respectivamente, que são falhas do sistema termorregulador em manter o estado eutérmico (cf. BÍCEGO et al. 2007). Os outros dois estados térmicos são alterações reguladas da Tc (febre e anapirexia). Na anapirexia ocorre ativação de mecanismos de perda de energia térmica para reduzir a Tc, ao contrário do estado de hipotermia (GORDON, 2001; STEINER e BRANCO, 2002). Na febre os mecanismos de ganho de energia térmica são ativados para elevar a Tc, ocorrendo uma ativação de mecanismos de produção (termogênese) e conservação de energia térmica e da inibição de mecanismos de perda de energia térmica, o contrário da hipertermia (KLUGER, 1991; COOPER, 1995).

De acordo com o Glossary of Terms For Thermal Physiology (2001), a febre é um estado de temperatura interna elevada, que é muitas vezes, mas não necessariamente, parte das respostas defensivas de organismos para a invasão de microorganismos ou matéria inanimada reconhecida como patogênica ou estranha ao organismo. A febre também pode

resultar de uma condição idiopática do corpo, ou seja, que não possui uma causa conhecida e também pode ser causada pelo estresse emocional.

A febre acompanha a maioria dos estados infecciosos virais ou bacterianos e essa elevação da Tc durante a infecção além de ser um dos primeiros sinais da condição patológica (componente da resposta de fase aguda), traz vários benefícios ao organismo, como o aumento da eficiência do sistema imune e da sobrevivência. Com poucas exceções, tanto vertebrados endotérmicos quanto ectotérmicos (bem como invertebrados) desenvolvem febre em resposta à injeção de pirogênios exógenos, tais como lipopolissacarídeo (LPS; endotoxina), vírus, bactérias gram-positivas e levedura (BÍCEGO et al., 2007). O LPS, que é a forma mais purificada de um composto a partir da parede celular de bactérias gram-negativas, geralmente *Escherichia coli*, tem sido amplamente utilizado para induzir febre em animais experimentais. Esta ampla distribuição da resposta febril entre os animais reforça a hipótese de que a febre tem uma história filogenética bastante antiga e que deve ter evoluído como um meio de aumentar a eficiência das respostas de defesa a infecções (KLUGER, 1991; BÍCEGO et al., 2007).

A febre é iniciada pela entrada de pirogênios exógenos dentro do corpo, como microorganismos invasores que atuam sobre as células do sistema imune, e induzem a produção de pirogênios endógenos. São reconhecidos como pirogênios endógenos as citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- α , e MIP-1 (KLUGER, 1991). E as prostaglandinas (PG), especialmente a E₂, são mediadores, na APO, da resposta febril induzida por pirogênios exógenos, como LPS, e endógenos, como as citocinas (BLATTEIS e SEHIC, 1997; BLATTEIS, 2006). Além disso, opióides endógenos atuando em receptores mu no SNC parecem ser essenciais para a resposta febril ao LPS em ratos, sendo liberados simultaneamente à síntese de PG e ativando vias independentes desta (FRAGA et al., 2008).

Vários estudos têm revelado que não somente agentes pirogênicos podem induzir febre, mas também o estresse psicológico pode afetar a Tc levando ao que é geralmente chamado de febre psicogênica (FALCON-LESSES, 1930; OKA et al., 1998; OKA et al., 2001, OKA, 2015), podendo também ser chamada de febre induzida por estresse psicológico (De PAULA et al., 2000; ENDO e SHIRAKI, 2000; SOSZYNSKI, 2001; STEINER et al., 2003), ou febre emocional (CABANAC e DARDASHTI, 1999; SOSZYNSKI, 2006). Alguns autores denominam a febre psicogênica de hipertermia induzida por estresse (ZETHOF, 1995; VAN DER HEYDEN et al., 1997; PELOSO et al.,

2002). Outros autores, entretanto, consideram essa denominação errônea já que parece haver várias evidências indicando que o aumento na Tc induzido por estresse é uma resposta regulada, ao invés de um aumento de Tc passivo e forçado, pois é acompanhado pela ativação dos mecanismos de conservação de calor (vasoconstrição periférica), além de não ser afetado pela Ta (CABANAC e DARDASHTI, 1999; De PAULA et al., 2000; OKA et al., 2001; VIANNA e CARRIVE, 2005; SOSZYNSKI, 2006; MARKS et al., 2009).

Em muitas espécies, o estresse psicológico resulta em aumento agudo da Tc. Por exemplo, estudos com humanos mostram que não apenas os ritmos circadianos alteram a Tc, mas também avaliações, filmes e torneios elevam a temperatura corporal em torno de 1° C (KLEITMAN, 1945; RENBOURN, 1960; BRIESE, 1995; GOTSEY e IVANOV, 1950; MARAZZITI et al, 1992; FALCON-LESSES, 1930). O estresse da manipulação, a exposição a ambientes novos ou campo aberto, mudança de gaiolas, contenção, exposição a animais dominantes ou intrusos pode elevar a Tc de ratos e camundongos em até 2 °C (STEWART e EIKELBOOM, 1979; SHIBATA e NAGASAKA, 1982, 1984; SINGER et al., 1986; BORSINI et al.,1989; MORLEY et al., 1990; ZETHOF et al., 1994; SOSZYNSKI et al., 1998; BUTTERWECK et al., 2003; OKA et al., 2003; LKHAGVASUREN et al., 2014; MOHAMMED et al., 2014). Um fenômeno semelhante é observado em outras espécies, incluindo coelhos (YOKOI, 1966; SNOW e HORITA, 1982), musaranhos (KOHLHAUSE et al., 2011; SCHMELTING et al., 2014), ovinos (PEDERNERA-ROMANO et al., 2010), esquilos (MUCHLINSKI et al., 1998; LEE et al., 2000), chimpanzés (PARR et al., 2000), impalas (MEYER et al., 2008), patos (GRAY et al., 2008) e pombos (BITTENCOURT et al., 2015).

Um aumento na Tc também foi observado em répteis, em que a termorregulação é alcançada somente por meio da seleção de temperaturas ambientes adequadas a sua demanda metabólica. Quando lagartos são manuseados, tais animais deslocam-se para uma lâmpada infravermelha para elevar sua Tc, de modo semelhante a quando são infectados por bactérias, sugerindo que as respostas febris a estímulos emocionais, assim como a estímulos infecciosos tem uma origem filogenética antiga (CABANAC e GOSSELIN, 1993).

Algumas evidências recentes indicam que o aumento da Tc induzido por estresse apresenta mecanismos similares aos da febre induzida por endotoxina, com a participação de pirogênicos endógenos como citocinas (IL-1 α , IL-6) e prostaglandinas (PGE₂)

(SINGER, 1986; KLUGER et al., 1987; LEMAY et al., 1990; MINAMI et al., 1991; OKA et al, 2001) e de mediadores antipiréticos, como o óxido nítrico e os glicocorticóides, como a corticosterona (De PAULA et al., 2000; OKA et al, 2001; SANCHES et al., 2003; SORIANO e BRANCO, 2010). Outros possíveis mediadores desta resposta febril seriam os opióides endógenos (OKA et al, 2001).

Já foi visto que o aumento de temperatura induzido pelo estresse psicológico altera a atividade dos neurônios termossensíveis no APO, pela produção local de PGE₂, uma vez que o estresse psicológico ativa os neurônios noradrenérgicos no *locus coeruleus* (OKA et al, 2001), e a liberação de noradrenalina no hipotálamo estimula a síntese da PGE₂ (FELEDER et al., 2007), como ocorre após injeção sistêmica de LPS (ALMEIDA et al., 2004). Além disso, foi visto que respostas vasomotoras (vasoconstrição) ajudam no aumento da Tc, e o ambiente frio não diminui a elevação da Tc, como ocorre na hipertermia. Dessa forma, esse aumento Tc pelo estresse psicológico é regulado e considerado uma verdadeira febre (BRIESE e CABANAC, 1991).

É bem estabelecido que a febre induzida por endotoxina é o resultado da ação de agentes pirogênicos e antipiréticos endógenos atuando em regiões específicas do encéfalo (STEINER et al., 2002; BÍCEGO et al., 2007). Também a resposta oposta à febre, a anapirexia, é resultado de ações de agentes indutores e inibidores de tal resposta (BRANCO et al., 2006; SCARPELLINI et al., 2009). Talvez a febre induzida por estresse psicogênico também possa apresentar tal modulação estimuladora e inibitória em sítios específicos do encéfalo, nesse caso os receptores opióides mu e kappa, numa região específica do SNC, como a PAG, uma vez que nada se sabe como isso ocorre nessa região.

1.3. SISTEMA OPIÓIDE E TERMORREGULAÇÃO

Os opióides (sintéticos ou endógenos) são moléculas consideradas com ação semelhante à morfina, que é sintética (FERREIRA e FACCIONE, 2005), sendo que nos opióides endógenos estão incluídas as encefalinas (envolvidas também em respostas de estresse), dinorfinas e endorfinas (JORDAN e DEVI, 1998). Estas moléculas ligam-se aos receptores opióides - um grupo de receptores acoplados à proteína G (FERREIRA e FACCIONE, 2005), sendo que o sistema opióide endógeno está envolvido em vários processos fisiológicos, incluindo a regulação da Tc (GELLER et al., 1983; GELLER et al.,

1986; ADLER e GELLER, 1988; BODNAR e KLEIN, 2005; SCARPELLINI et al., 2009) e as respostas de estresse (AKIL et al., 1984).

Três distintos receptores opióides, mu, kappa e delta foram identificados (JAMES E GOLDSTEIN, 1984; KOSTERLITZ, 1985; PATERSON, 1983), cada um possuindo diferentes propriedades fisiológicas e farmacológicas (JORDAN e DEVI, 1998), sendo todos eles bloqueados pela naloxona, um antagonista não seletivo de receptores opióides (FERREIRA e FACCIONE, 2005). Estes receptores da membrana celular, acoplados à proteína G, quando são estimulados por um fármaco opióide, podem inibir a enzima adenilato ciclase, reduzindo a concentração intracelular de adenosil monofosfato cíclico (AMPC). Ocorrendo o fechamento dos canais de cálcio voltagem dependentes nas terminações pré-sinápticas, reduzindo a liberação de neurotransmissores e ainda a ativação dos receptores opióides na membrana pós-sináptica promove um efluxo de K^+ , causando uma hiperpolarização do neurônio, bloqueando parcialmente a transmissão do estímulo, como o estímulo doloroso, por exemplo (JORDAN e DEVI, 1999).

Em relação à termoregulação, a ativação de receptores mu causa aumento da Tc (SPENCER et al., 1988; HANDLER et al., 1992) enquanto que agonistas kappa induzem redução na Tc (CAVICCHINI et al., 1988; SPENCER et al., 1988). Por outro lado, os dados relativos aos receptores delta são controversos, podendo ocorrer hipotermia, hipotermia seguida por hipertermia ou nenhum efeito *in vivo* (SPENCER et al., 1988; BROCCARDO e IMPROTA, 1992; HANDLER et al., 1992; RAWLS e COWAN, 2006). Foi demonstrado no nosso laboratório a participação dos receptores opióides da APO na anapirexia (resposta de queda regulada da Tc, oposta à febre) induzida por hipóxia e foi observado que os receptores kappa estão envolvidos na indução da anapirexia enquanto os receptores mu e delta são importantes para o retorno da Tc ao estado de eutermia normóxia pós-hipóxia (SCARPELLINI et al., 2009).

O sistema opióide parece estar envolvido na febre induzida por pirogênicos uma vez que a ocorre o aumento da concentração β -endorfina (CARR et al., 1982) no sistema nervoso central, particularmente no hipotálamo (TSAI et al., 2003), durante a fase de aumento da Tc na febre pirogênica, e diminuição durante o retorno ao estado de eutermia (MURPHY e LIPTON, 1983). Neste contexto, receptores opióides mu no encéfalo parecem desempenhar um papel chave no desenvolvimento da febre induzida por LPS (BENAMAR et al, 2000; BENAMAR et al., 2005; FRAGA et al, 2008) e por pirogênicos

endógenos tais como TNF-alfa, IL-6, endotelina-1 e proteína inflamatória de macrófago-1 (MIP-1) (FRAGA et al., 2008).

Na literatura, existem dados controversos a respeito da participação dos receptores e peptídeos opióides no aumento da Tc induzido por estresse psicológico (OKA et al., 2001, OKA, 2015). Em experimentos conduzidos por Vidal et al. (1983), a naloxona (antagonista não específico de receptores opióides) não bloqueou o aumento na Tc induzido por estresse de exposição a campo aberto. Porém, Pae et al. (1985) descobriram que a injeção de naltrexona, outro antagonista não seletivo de receptor opióide, na APO, bloqueia o aumento a Tc induzido por estresse de manipulação, sugerindo que a β -endorfina liberada pela hipófise age nos receptores opióides da APO, aumentando a Tc. Dessa forma é possível que peptídeos opióides sejam liberados no encéfalo durante o estresse psicológico e produzam febre psicogênica e uma modulação dessa febre pode ocorrer em diferentes tipos de receptores opióides, como o mu e o kappa.

1.4. SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL (PAG) E TERMORREGULAÇÃO

Há várias regiões no tronco encefálico envolvidas na regulação da Tc, dentre elas, a substância cinzenta periaquedutal (PAG), cuja ativação induz resposta hipertérmica (TSENG et al., 1980). A PAG é um grupo de células organizadas em quatro colunas longitudinais (dorsomedial, dorsolateral, lateral e ventrolateral) em volta do aqueduto mesencefálico, chamado de aqueduto de Sylvius (Figura 1), as quais variam em forma e tamanho ao longo do eixo rostrocaudal (CARRIVE, 2000) e diferem em características imunohistoquímicas, densidade de diversos receptores (incluindo os opióides), conexões e funções (CARRIVE, 1993; BANDLER e SHIPLEY, 1994; BANDLER e KEAY, 1996).

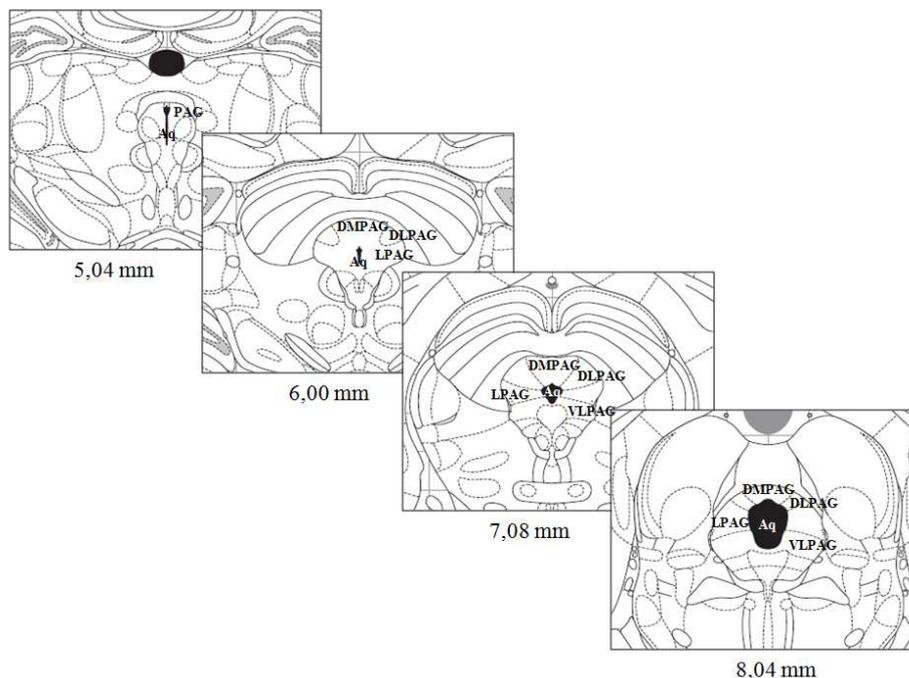


Figura 1. Esquemas de cortes coronais ao longo das colunas longitudinais da substância cinzenta periaquedutal (PAG), retirados do atlas de Paxinos e Watson, 2005. DMPAG= PAG dorsomedial; DLPAG= PAG dorsolateral; LPAG= PAG lateral; VLPAG= PAG ventrolateral; Aq= aqueduto. Os números abaixo das imagens indicam as distâncias caudais em relação ao bregma (em milímetros).

A PAG é reconhecidamente envolvida na regulação neurovegetativa de comportamentos de defesa (DEL-BEN e GRAEFF, 2009), além de ter participação no controle de nocicepção, analgesia, medo, ansiedade, vocalização, lordose (posição adotada pela fêmea para a cópula), controle cardiorrespiratório e termorregulação (BEHBEHANI, 1995; ZHANG et al., 2007; NAKAMURA e MORRISON, 2007; LOPES et al., 2012).

A PAG recebe aferências e envia eferências para diferentes áreas motoras, sensoriais, autonômicas e límbicas (SAWCHENKO et al., 1983; BEITZ, 1990; BANDLER e DEPAULIS, 1991; CANTERAS e SWANSON, 1992; NOLAN e WALDROP, 1993; MORRISON, 2001; SEWARDS e SEWARDS, 2002; McNAUGHTON e CORR, 2004). Dessa forma a PAG está conectada a circuitos neurais responsáveis por modulações fisiológicas essenciais para a sobrevivência do organismo, justificando o seu envolvimento em diversas funções, sendo considerada uma estrutura heterogênea e de alta complexidade.

Existem evidências de sinalização da PAG induzida pelo aquecimento local da APO (YOSHIDA et al., 2002). Além disso, estudo utilizando o marcador retrógrado cholera toxin-b e imunohistoquímica para c-Fos, demonstrou que a PAG rostral de ratos

expostos ao calor recebe inputs do núcleo pre-óptico mediano (MnPO), área envolvida em respostas de perda de calor (YOSHIDA et al., 2005). Corroborando esse dado, foi demonstrado que a estimulação química da porção rostral da PAG causa vasodilatação cutânea da cauda de ratos, importante resposta de perda de calor nesses animais (ZHANG et al., 1997 a, b). Por outro lado, no mesmo estudo de YOSHIDA et al. (2005), verificou-se que a PAG caudal de ratos submetidos ao frio recebe inputs de neurônios do hipotálamo dorsomedial (DMH), região envolvida na ativação de termogênese (YOSHIDA et al., 2005). Além disso, estimulação da porção ventrolateral caudal da PAG estimula a termogênese independente de tremor no tecido adiposo marrom (CHEN et al., 2002). Todos esses dados juntos indicam importante participação da PAG nas vias eferentes da termorregulação autonômica.

Uma vez que a PAG contém β -endorfina (FINLEY et al., 1981) e apresenta uma densidade significativa de receptores opióides (LAW et al., 1979, LINNMAN et al, 2012), especialmente mu e kappa (GUTSTEIN et al., 1998), é possível que, além de modificara sensação da dor, os opióides endógenos presentes nesta região possam ter um papel importante no controle da Tc (TSENG et al., 1980; GRIFFITHS et al., 1983). Desse modo, torna-se importante investigar a ação dos receptores mu e kappa da PAG na febre por estresse psicogênico e baseado nisso a hipótese do trabalho é de que os receptores mu e kappa dessa região participam da febre induzida por estresse de contenção física em ratos.

2. OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi investigar a participação dos receptores opióides mu e kappa da substância cinzenta periaquedutal (PAG) dorsal de ratos na febre induzida por estresse de contenção.

2.1. OBJETIVO ESPECÍFICO

Para testar a hipótese, foi verificado efeito da microinjeção dos antagonistas seletivos para receptores mu (CTAP) e kappa (nor-BNI), intra-PAG na temperatura corporal e nos termofetores para a perda de calor (índice de perda de calor) e para a termogênese (consumo de oxigênio) de animais submetidos ou não ao estresse de contenção.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Os experimentos foram realizados com ratos Wistar, pesando de 250 a 280 g. Os animais foram acondicionados em câmara ventilada com controle de temperatura (mantida a 24 – 26°C) e ar filtrado (ALE 9902001: Alesco, Monte Mor, SP, Brasil), sendo submetidos a um ciclo claro:escuro de 12/12 h (as luzes do biotério eram ligadas às 06:30 h e desligadas às 18:30 h). Os animais tiveram livre acesso à água e ração, exceto durante a realização dos experimentos, os quais foram realizados entre 9:00 h e 12:00 h na fase clara, no Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP Campus de Jaboticabal. O estudo foi conduzido de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCAV/Unesp, protocolo nº 007094/13.

3.2. FÁRMACOS UTILIZADOS

O antagonista seletivo para receptores mu, CTAP (D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Arg-Thr-Pen-Thr-NH₂ ciclic, peso molecular: 1104,30 g, Sigma-Aldrich, Brasil) nas doses de 1 e 10 µg/ 100 nL/ animal (9,1 mol/ L e 91 mol/ L respectivamente), e o antagonista seletivo para receptores kappa, nor-BNI (nor-binaltorphimine dihydrochloride, peso molecular: 734.71 g, Sigma-Aldrich, Brasil), nas doses de 1 e 4 µg/ 100 nL/ animal (13,6 mol/ L e 54,4 mol/ L respectivamente). As doses dos antagonistas foram determinadas em experimentos pilotos e baseada em estudos prévios (BENAMAR et al., 2000; SALMI et al., 2003; SCARPELLINI et al., 2009).

3.3. CIRURGIAS

Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de cloridrato de cetamina e xilazina (100 e 10 mg/ kg, respectivamente) e fixados em um estereotáxico (Kopf Instruments, Kent, Inglaterra). Uma cânula guia de aço inoxidável (0,6 mm de diâmetro e 12 mm de comprimento) foi implantada 2 mm acima da PAG dorsal (PAG dorsomedial e dorsolateral), de acordo com as coordenadas adaptadas do atlas de Paxinos e

Watson (2005): angulação da torre: 22° para esquerda, + 1.1 mm a partir do lambda, +1,9 mm lateral, -3,2 mm dorso-ventral a partir do crânio, e barra do incisivo a -2,5 mm. A cânula foi fixada ao crânio por meio de parafusos e acrílico dental. Um mandril foi mantido dentro da cânula para prevenir oclusão da cânula e infecção.

Cada animal foi retirado do estereotáxico e submetido a uma laparotomia paramediana para inserção de um sensor armazenador de temperatura (SubCue Dataloggers, Calgary, Canadá) na cavidade abdominal. Após as intervenções cirúrgicas, os animais foram tratados com uma injeção intramuscular de antibiótico (enrofloxacino, 10 mg/ kg), e uma injeção subcutânea de anti-inflamatório não-estereoidal (flunixinina meglumina 2,5 mg/ kg). O tempo de recuperação pós-cirurgia foi de 6 a 7 dias.

3.4. MICROINJEÇÕES

As microinjeções foram realizadas em ratos não anestesiados utilizando-se uma seringa Hamilton de 1 µL e uma agulha dental de injeção (Mizzy, 200 µm diâmetro externo) conectadas por um tubo de polietileno PE-10. A agulha era 2 mm mais longa do que a cânula guia, permitindo contato com a região de interesse apenas no momento da injeção, que foi feita utilizando-se um aparelho de microinjeção (modelo 310, Stoelting CO., IL, EUA; Figura 2). Foi injetado um volume de 100 nL de veículo ou antagonista durante 30 seg, sendo a agulha removida da cânula guia 30 seg após o término da injeção para se evitar refluxo.



Figura 2. Bomba de microinjeção (modelo 310, Stoelting CO., IL, EUA).

3.5. DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA CORPORAL

Os sensores armazenadores integrados de temperatura (“dataloggers”, SubCue, Calgary, AT, CA; Figura 3) foram acoplados a um computador, via uma conexão óptica e programados para a coleta de dados a cada 5 minutos ao longo do experimento utilizando-se o programa “SubCue temperature datalogger software”. Ao final dos experimentos, os sensores foram mais uma vez conectados a um computador para a leitura das temperaturas medidas e essas, por sua vez, foram corrigidas de acordo com as especificações contidas no manual do fabricante (SubCue, Calgary, AT, CA).



Figura 3. Datalogger (SubCue, Calgary, AT, CA) implantado na cavidade abdominal dos ratos para medida de temperatura corporal.

3.6. DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE PERDA DE CALOR

A Temperatura da pele (T_p) da cauda foi medida por meio de imagens de infravermelho utilizando-se uma câmera sensível a essa radiação (Flir SC660, Suíça; Figura 4A). A técnica da termografia de infravermelho detecta a radiação eletromagnética (desta faixa de comprimento de onda) emitida por um corpo e converte tal radiação em uma imagem colorida de acordo com a intensidade desta. Essa técnica tem sido comumente usada na fisiologia termal para mensurar a T_p e, assim, inferir o fluxo de sangue periférico em endotermos (ROMANOSVSKY et al., 2002; TATTERSALL e MILSON, 2003; ALMEIDA, et al., 2006; SCOTT et al., 2008) e ectotermos (TATTERSALL et al., 2004). Foi escolhida a temperatura da cauda do animal para inferir mecanismo de perda de calor devido a essa região do rato ser considerada uma janela térmica (TATTERSALL e MILSON, 2003; ALMEIDA et al., 2006), ou seja, uma superfície corporal em que a troca de calor com o ambiente é facilitada, por apresentar grande relação superfície/volume e ser pouco isolada termicamente por pelos. Foi determinada a média de três valores de temperatura da pele ao longo do segundo terço do

comprimento da cauda (Figura 4B), local em que são reduzidas as interferências das temperaturas: 1) próxima ao corpo, pois na base da cauda a temperatura é mais elevada (influência da Tc); e 2) do ambiente, pois na ponta da cauda a temperatura é mais próxima da ambiente (ROMANOVSKY et al., 2002). A Tp e a Tc foram usadas para inferir o índice de perda de calor (IPC) do animal, isto é, o grau de vasodilatação/vasoconstrição como indicadores de mecanismos de perda e conservação de calor, respectivamente. O IPC varia de 0 a 1, sendo que zero indica vasoconstrição máxima e 1 vasodilatação máxima, e foi calculado de acordo com a fórmula: $IPC = (Tp-Ta)/(Tc-Ta)$ (ROMANOSVSKY et al., 2002), onde:

Tp: Média das temperaturas da pele em três pontos do segundo terço da cauda do animal;

Tc: Temperatura corporal no mesmo momento em que a Tp foi medida;

Ta: Média das temperaturas em dois pontos da caixa do animal no mesmo momento em que a Tp foi medida;

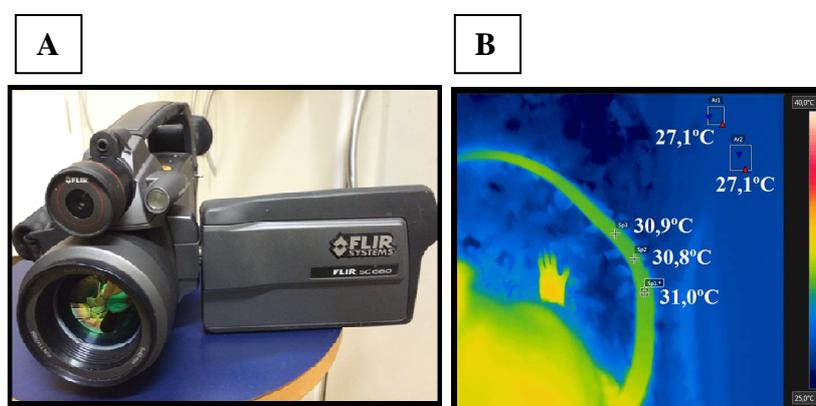


Figura 4. (A) Câmera infravermelha (Flir SC660, Suíça). (B) Imagem infravermelha mostrando a temperatura de três pontos da pele do segundo terço da cauda do animal e a temperatura de dois pontos da temperatura ambiente.

3.7. DETERMINAÇÃO DO CONSUMO DE OXIGÊNIO

A taxa metabólica foi inferida pela medida do consumo de oxigênio utilizando-se um sistema de respirometria aberta (Figura 5). O animal foi colocado em um respirômetro (6,8 L) dentro de uma câmara de temperatura controlada (Fanem, São Paulo, SP, Brasil) que manteve a Ta dentro do respirômetro a 26°C. Um fluxo contínuo de gás foi mantido

através da câmara experimental (*pull mode*) e as concentrações de O₂ de entrada e saída foram monitoradas por um analisador de O₂ (Sable Systems, Las Vegas, NV, EUA), conectados a um computador para registro e armazenamento dos dados. O consumo de oxigênio ($\dot{V}O_2$) foi determinado com base na taxa de fluxo e na diferença de concentração do gás na entrada e na saída da câmara. O ar foi puxado para dentro do respirômetro a uma taxa de 1700 mL/min, mas apenas uma sub-amostra deste ar foi puxado através do analisador O₂ a 185 mL/min (SS4; Sable Systems, Las Vegas, NV, EUA). 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 foi necessária porque o ar não foi seco nem antes de entrar no respirômetro nem antes de passar pelo analisador de O₂ (KOTEJA, 1996). Em seguida, a porcentagem de O₂ e a pressão barométrica foram registradas (PA-10; Sable Systems). Cada 10 minutos de registro foram compostos por 2 min de *baseline*, amostra de ar que entrava no respirômetro, e por 8 minutos de ar que saía do respirômetro. As amostras de *baseline* foram registradas frequentemente para garantir que o O₂ no ar oferecido ao animal permaneceu constante ao longo do experimento, e para proporcionar as estimativas de F_eO₂ (veja abaixo). Um distribuidor de fluxo de gás (RM8 Multiplexer Intelligent; Sable Systems) foi usado para controlar quais amostras de gás (do respirômetro ou *baseline*) entravam nos analisadores. Todos os dados foram coletados por meio de um sistema de aquisição de dados (EXPEDATA v 1.4.5; Sable Systems) registrando os valores a cada segundo. Os analisadores foram calibrados sempre que necessário. O analisador de O₂ foi calibrado usando nitrogênio como um valor zero e ar seco (20,95%) como valor máximo. Os dados são apresentados em STPD (condições normais de temperatura, pressão e ar seco). O O₂ foi calculado usando a seguinte equação: $\dot{V}O_2 = [FR_s (F_eO_2 - F_sO_2)]/[1 - F_eO_2 (1-RQ)]$ (KOTEJA, 1996), onde:

FR_s: Fluxo de ar que sai do respirômetro

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

F_sO₂: Fração de saída de oxigênio (do respirômetro);

RQ: Quociente Respiratório (considerado 0,85)



Figura 5. Sistema de respirometria aberta (Sable Systems, Las Vegas, NV, EUA).

3.8. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Os experimentos foram realizados em animais não anestesiados. A T_c foi registrada de 5 em 5 minutos durante o experimento. O T_p foi registrada a cada 10 minutos durante o experimento por meio de imagens infravermelhas Flir SC660. O consumo de oxigênio foi realizado separadamente, utilizando um respirômetro (6,8 L), com registros a cada 20 minutos.

3.8.1. Efeito da microinjeção intra-PAG de antagonista seletivo de receptores opióides mu, CTAP, sobre a T_c e o índice de perda de calor de ratos não submetidos ao estresse de contenção.

Pelo menos 12 horas antes do experimento, os animais foram distribuídos em caixas individuais e colocados na sala de experimentação. No dia seguinte de manhã, os ratos receberam microinjeção intra-PAG de CTAP ou salina (veículo). Os animais foram mantidos em suas caixas por aproximadamente 140 minutos.

3.8.2. Efeito da microinjeção intra-PAG de CTAP sobre a T_c e o índice de perda de calor de ratos submetidos ao estresse de contenção.

Após as 12 horas de aclimação na sala de experimentação, no dia seguinte de manhã, os ratos receberam microinjeção intra-PAG de CTAP ou salina (veículo). Após 50 minutos da microinjeção os animais foram submetidos ao estresse de contenção, sendo

colocados em tubos de contenção (60 mm de diâmetro; Figura 6), permanecendo dentro deles durante 40 minutos. Após este tempo sob contenção, os animais tiveram mais 50 minutos para o retorno à eutermia.

3.8.3. Efeito da microinjeção intra-PAG de CTAP sobre o consumo de O₂ de ratos submetidos ao estresse de contenção.

Após as 12 horas de aclimatação na sala de experimentação, no dia seguinte de manhã, os ratos receberam microinjeção intra-PAG de CTAP ou salina (veículo). Após 40 minutos da microinjeção os animais foram submetidos ao estresse de contenção, sendo colocados em tubos de contenção (60 mm de diâmetro; Figura 6), permanecendo dentro deles durante 40 minutos. Após este tempo sob contenção, os animais tiveram mais 50 minutos para o retorno à eutermia.

3.8.4. Efeito da microinjeção intra-PAG de antagonista seletivo de receptores opióides kappa, nor-BNI, sobre a T_c e o índice de perda de calor de ratos não submetidos ao estresse de contenção.

Após as 12 horas de aclimatação na sala de experimentação, no dia seguinte de manhã, os ratos receberam microinjeção intra-PAG de nor-BNI ou salina (veículo). Os animais foram mantidos em suas caixas por aproximadamente 140 minutos.

3.8.5. Efeito da microinjeção intra-PAG de nor-BNI sobre a T_c e o índice de perda de calor de ratos submetidos ao estresse de contenção.

Após as 12 horas de aclimatação na sala de experimentação, no dia seguinte de manhã, os ratos receberam microinjeção intra-PAG de nor-BNI ou salina (veículo). Após 50 minutos da microinjeção os animais foram submetidos ao estresse de contenção, sendo colocados em tubos de contenção (60 mm de diâmetro; Figura 6), permanecendo dentro deles durante 40 minutos. Após este tempo sob contenção, os animais tiveram mais 50 minutos para o retorno à eutermia.

3.8.6. Efeito da microinjeção intra-PAG nor-BNI sobre o consumo de O_2 de ratos submetidos ao estresse de contenção.

Após as 12 horas de aclimação na sala de experimentação, no dia seguinte de manhã, os ratos receberam microinjeção intra-PAG de nor-BNI ou salina (veículo). Após 40 minutos da microinjeção os animais foram submetidos ao estresse de contenção, sendo colocados em tubos de contenção (60 mm de diâmetro; Figura 6), permanecendo dentro deles durante 40 minutos. Após este tempo sob contenção, os animais tiveram mais 50 minutos para o retorno à eutermia.



Figura 6. Tubo de contenção.

3.9. HISTOLOGIA

Ao final dos experimentos envolvendo microinjeção dos antagonistas de receptores opióides mu ou kappa ou de veículo, os animais foram anestesiados e 100 nL de solução 2% de azul de Evans foi microinjetada para confirmar o sítio de microinjeção. Os animais foram então perfundidos através do ventrículo esquerdo do coração com 60 mL de solução salina isotônica seguida de 60 mL de solução de formalina a 10%. Em seguida os animais foram decapitados e o encéfalo foi então retirado e imerso em solução de formalina a 10% por pelo menos dois dias. Após fixação e inclusão em parafina, foram feitos cortes de 15 μ m em um micrótomo (Leika) em toda a extensão da PAG. Os cortes obtidos foram corados pelo método de Nissl. A análise microscópica da localização do sítio de microinjeção foi feita em microscópio óptico. Foram consideradas injeções intra-PAG dorsolateral e dorsomedial, regiões em que é demonstrada a presença dos receptores opióides mu e kappa (GUSTSTEIN et al., 1998), e peri-PAG, nas regiões adjacentes mas fora da PAG.

3.10. ANÁLISE DOS DADOS

Os dados são apresentados como média \pm EPM. Foi utilizada ANOVA de duas vias (fatores: tempo e tratamento) de medidas repetidas, para verificar o efeito dos antagonistas de receptores opióides sobre a Tc, o IPC e o $\dot{V}O_2$, seguido pelo pós-teste de Tukey. Nos experimentos em que os animais foram submetidos à contenção, as fases de contenção e pós-contenção foram analisadas juntas e separadas. As diferenças entre as médias foram consideradas estatisticamente significativas para os valores de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

A temperatura ambiente durante todos os experimentos foi mantida em $26 \pm 1^\circ\text{C}$.

4.1. Histologia

Na figura 7A é apresentada uma fotomicrografia contendo o sítio de microinjeção na PAG dorsolateral. Na figura 7B são apresentados diagramas representativos contendo os locais de microinjeção intra-PAG dorsolateral e dorsomedial e peri-PAG.

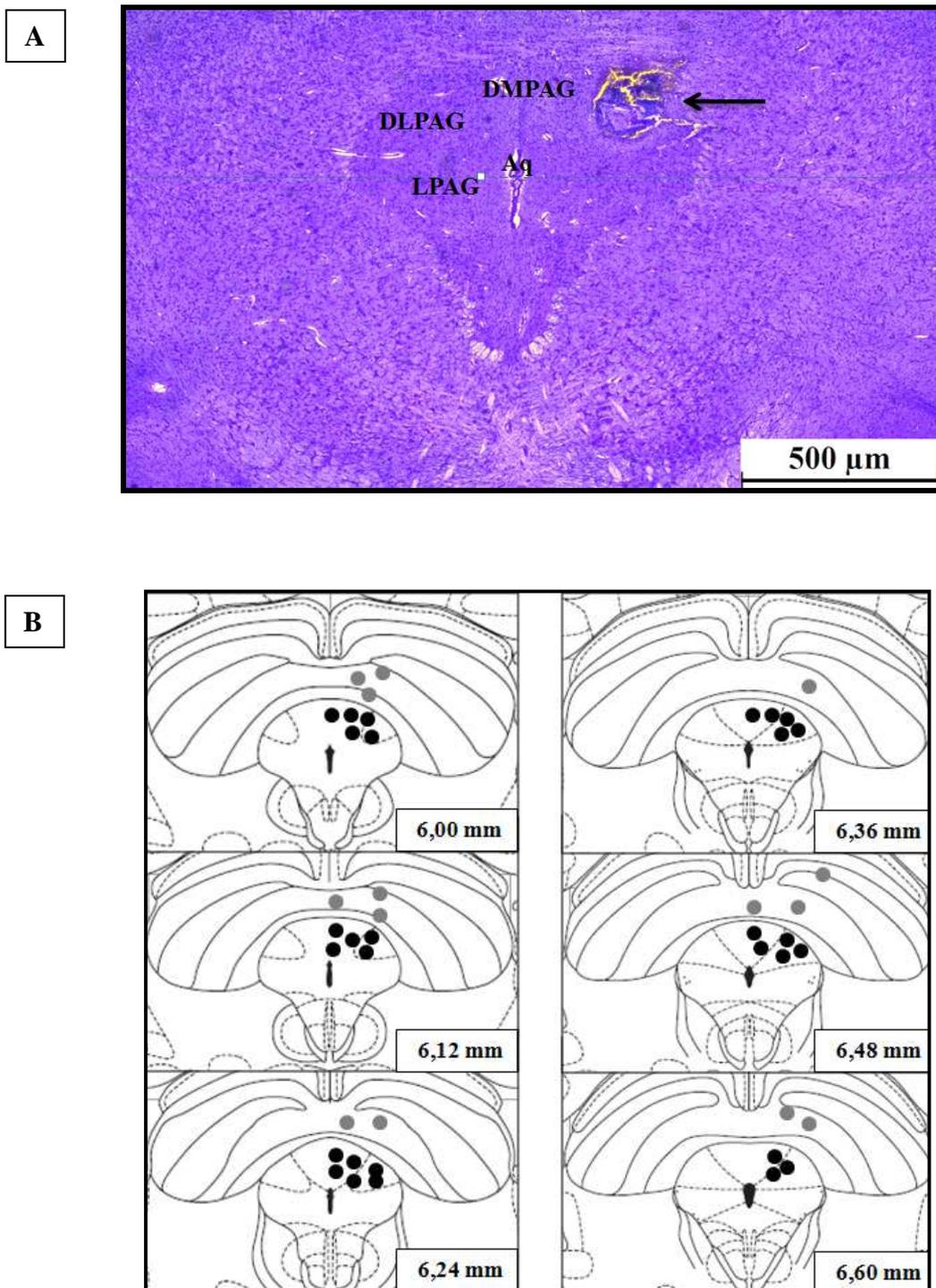


Figura 7. (A) Fotomicrografia do encéfalo de um animal representativo dos grupos mostrando o sítio típico de microinjeção (seta) na substância cinzenta periaquedutal dorsolateral (DLPAG) na distância 6,24 mm posterior ao bregma com base em Paxinos e Watson (2005). (B) Diagramas representativos mostrando os locais de microinjeção intra-PAG (círculos pretos) e fora da PAG (círculos cinza) nas distâncias (em mm) caudais ao bregma com base em Paxinos e Watson (2005). DMPAG= PAG dorsomedial; DLPAG=PAG dorsolateral; LPAG=PAG lateral; Aq= aqueduto.

4.2. Efeito da microinjeção intra-PAG do antagonista seletivo do receptor opióide μ , CTAP, sobre a temperatura corporal (Tc), o índice de perda de calor (IPC) e o consumo de oxigênio ($\dot{V}O_2$) de ratos submetidos ou não ao estresse de contenção.

Na Figura 8A são apresentados os resultados de Tc de ratos que receberam microinjeção de salina ou CTAP intra-PAG e não foram submetidos ao estresse de contenção. Não foi observada diferença nos valores de Tc entre os animais tratados com salina ou CTAP ($p > 0,05$). Esses resultados indicam que as doses de CTAP não são suficientes para alterar a Tc dos animais em eutermia. Na Figura 8B, observamos que o IPC não variou ao longo do tempo nem dos tratamentos ($p > 0,05$).

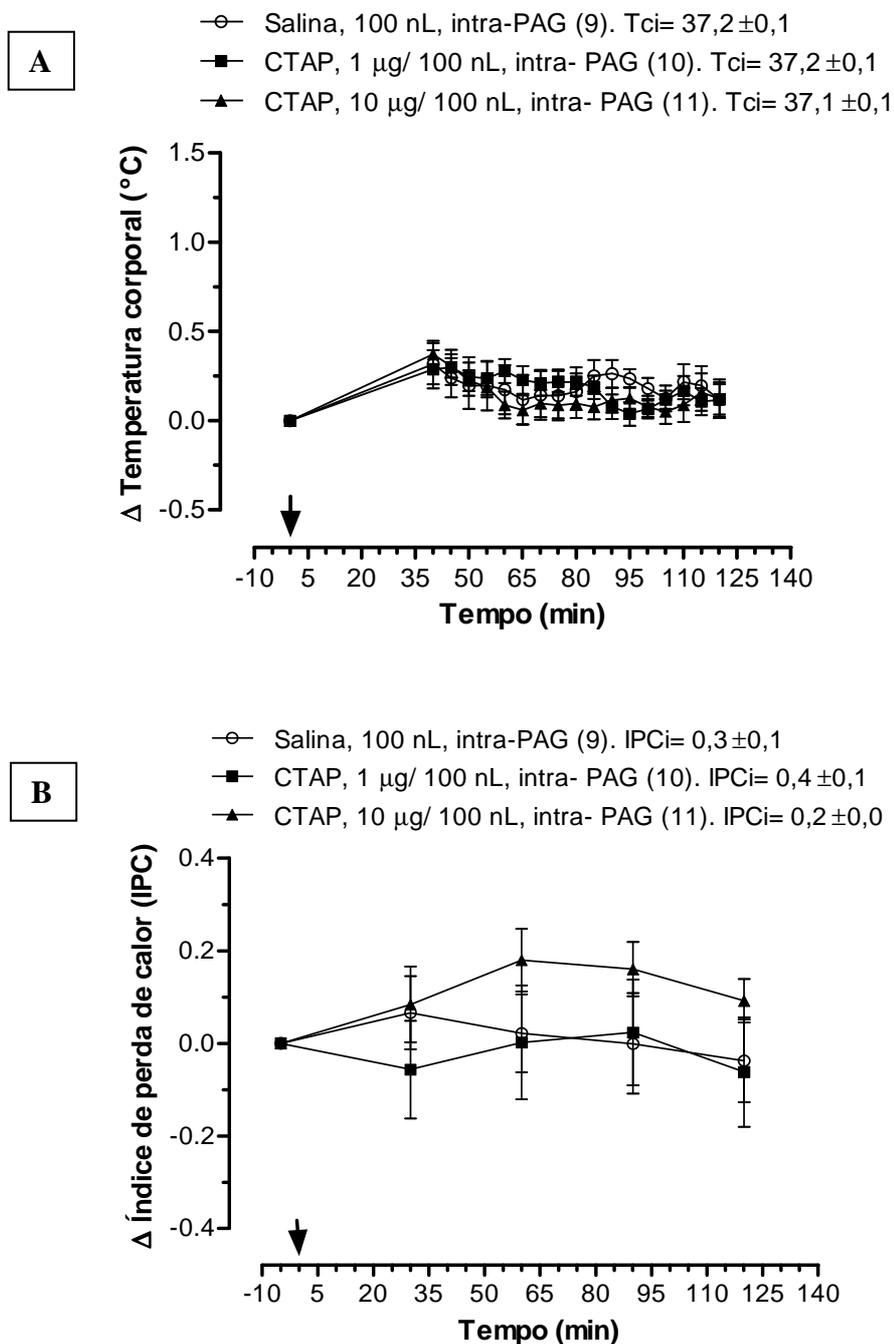


Figura 8. Efeito da microinjeção de antagonista de receptores opióides mu, CTAP (1 and 10 µg/ 100nL/ animal), ou salina (veículo; 100 nL) na substância cinzenta periaquedutal(PAG) sobre a temperatura corporal (A) e o índice de perdade calor (B) de animais não submetidos ao estresse de contenção.A seta indica o momento da microinjeção. Número de animais de cada grupo é apresentado entre parênteses. Tci é a temperatura corporal média antes de qualquer tratamento e IPCi é o índice de perda de calor antes de qualquer tratamento.

Na Figura 9 pode-se observar que o estresse de contenção aumentou a Tc de ratos que receberam a microinjeção de salina ou de CTAP ($p < 0,001$), no entanto esse aumento da Tc foi significativamente menor depois da microinjeção intra-PAG de 1 μg do antagonista de receptor opióide, CTAP ($p < 0,05$; Figura 9A). Em relação ao IPC podemos observar que houve uma redução deste durante o estresse de contenção, concomitantemente ao aumento de Tc e após o estresse de contenção ($p < 0,001$), o IPC aumentou paralelamente ao retorno da Tc aos valores eutérmicos, ocorrendo de modo semelhante entre os grupos (Figura 9B). Isso é mostrado na Figura 10, a qual apresenta imagens termográficas de um animal representativo do grupo salina (veículo), em três momentos (antes, durante e depois da contenção). Durante a contenção podemos perceber uma vasoconstrição da cauda (Figura 10B), porém após o animal ser retirado da contenção observamos uma vasodilatação da cauda do animal (Figura 10C).

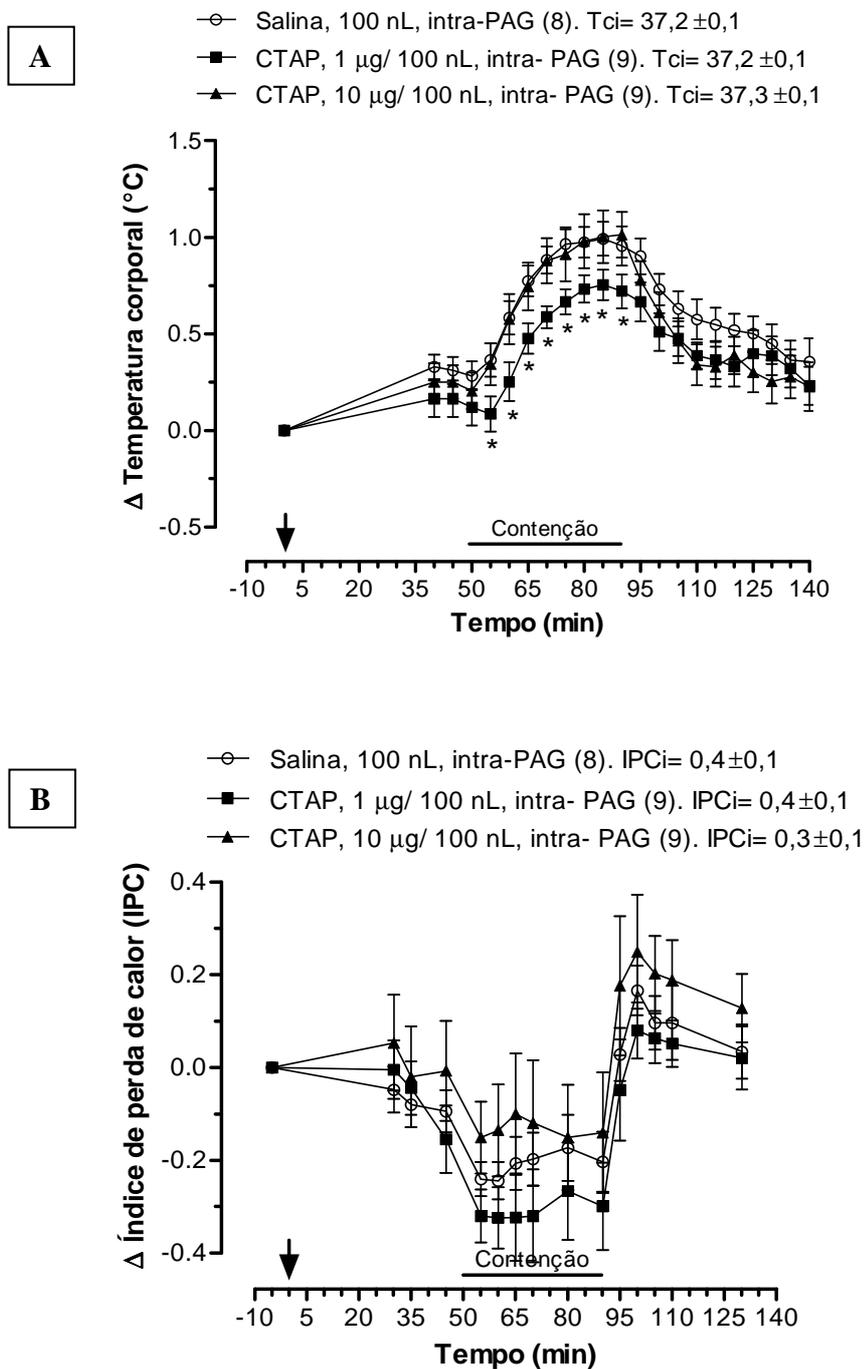


Figura 9. Efeito da microinjeção de antagonista de receptores opióides mu, CTAP (1 and 10 µg/ 100nL/ animal), ou salina (veículo; 100 nL) na substância cinzenta periaquedutal (PAG) sobre a temperatura corporal (A) e o índice de perda de calor (B) de animais submetidos ao estresse de contenção. A seta indica o momento da microinjeção. Número de animais de cada grupo é apresentado entre parênteses. Tci é a temperatura corporal média antes de qualquer tratamento e IPCi é o índice de perda de calor antes de qualquer tratamento. * $p < 0,05$, diferença significativa entre CTAP (1µg) e salina.

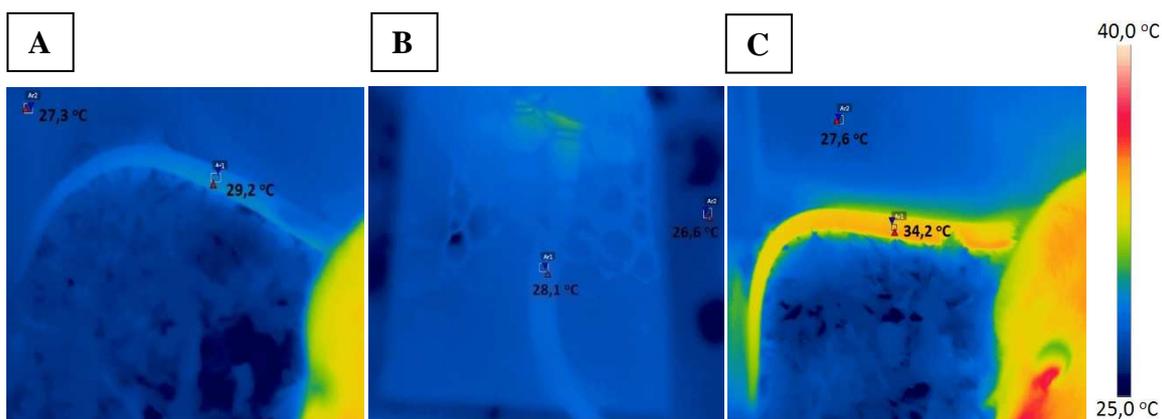


Figura 10. Imagens termográficas mostrando as temperaturas da pele da cauda e do ambiente utilizadas para o cálculo do índice de perda de calor. A) foto aos 10 minutos antes da contenção; B) foto aos 10 minutos de contenção em tubo de tela; C) foto aos 10 minutos após o término da contenção. Animal representativo do grupo salina (veículo, 100 nL).

A Figura 11A mostra que não houve diferença no consumo de oxigênio entre os grupos CTAP e salina nos ratos que não foram submetidos ao estresse de contenção. Durante o estresse contenção, no entanto, o consumo de oxigênio aumentou em ambos os grupos ($p < 0,001$), mas CTAP reduziu essa resposta ($p < 0,05$; Figura 11B).

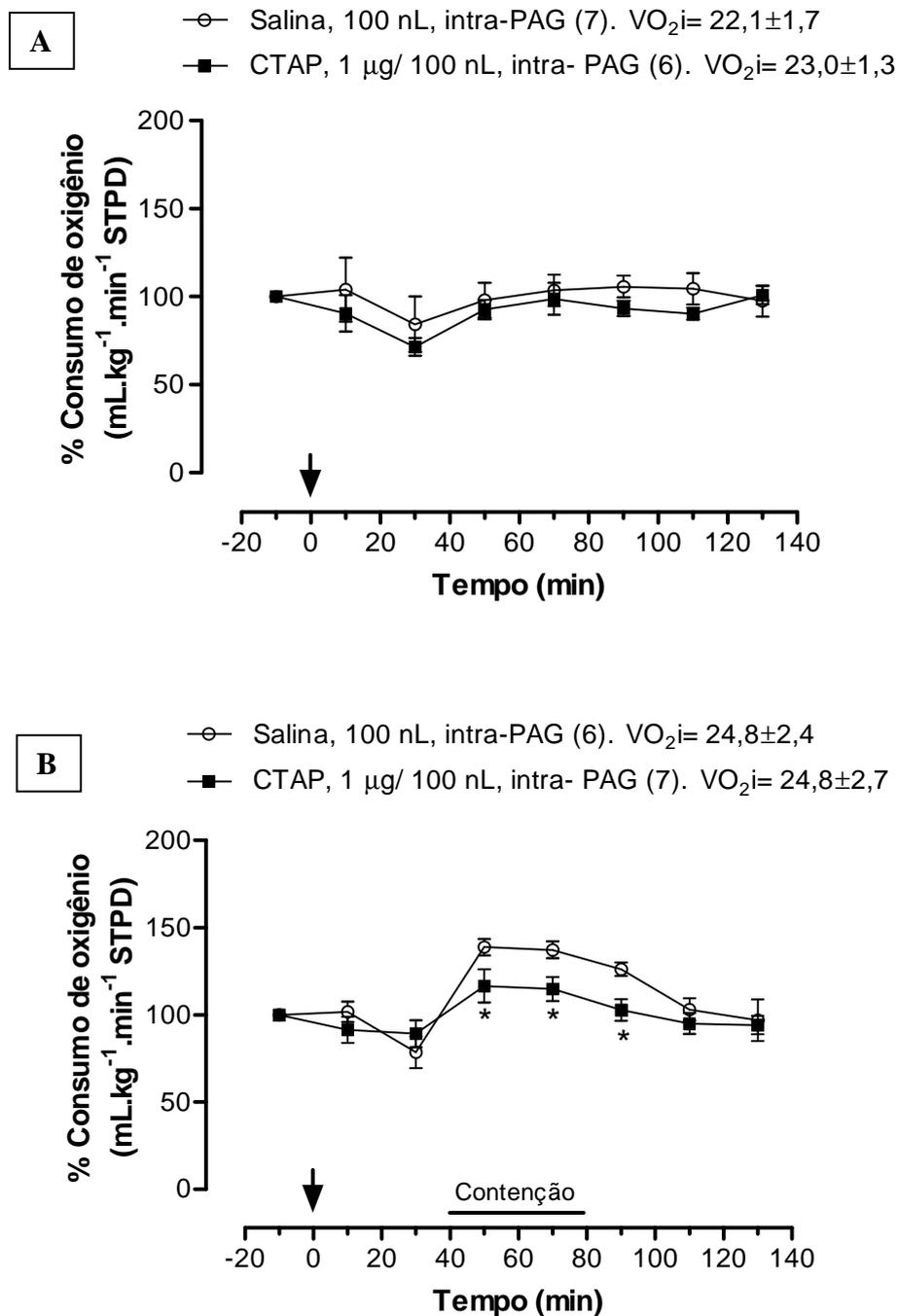


Figura 11. Efeito de microinjeção de antagonista de receptores opióides mu, CTAP (1 μg / 100 nL / animal) ou solução salina (veículo; 100 nL) na substância cinzenta periaquedutal sobre o consumo de oxigênio ($\dot{V}O_2$) de animais não submetidos (A) e submetidos (B) ao estresse de contenção. A seta indica o momento da microinjeção. Número de animais de cada grupo é apresentado entre parênteses. $\dot{V}O_{2i}$ é o consumo de oxigênio antes de qualquer tratamento. * $p < 0,05$, diferença significativa entre CTAP (1 μg) e salina.

4.3. Efeito da microinjeção intra-PAG do antagonista seletivo do receptor opióide kappa, nor-BNI, sobre a temperatura corporal (Tc), o índice de perda de calor (IPC) e o consumo de oxigênio ($\dot{V}O_2$) de ratos submetidos ou não ao estresse de contenção.

A Figura 12A mostra que não houve diferença na Tc de ratos não submetidos ao estresse de contenção e que receberam a microinjeção de salina ou do antagonista seletivo de receptores opióides kappa, nor-BNI, intra-PAG ($p > 0,05$), indicando que as doses de nor-BNI não são suficientes para alterar a Tc. O nor-BNI também não alterou o IPC dos ratos que não foram submetidos ao estresse de contenção quando comparado com o grupo salina, ($p > 0,05$; Figura 12B).

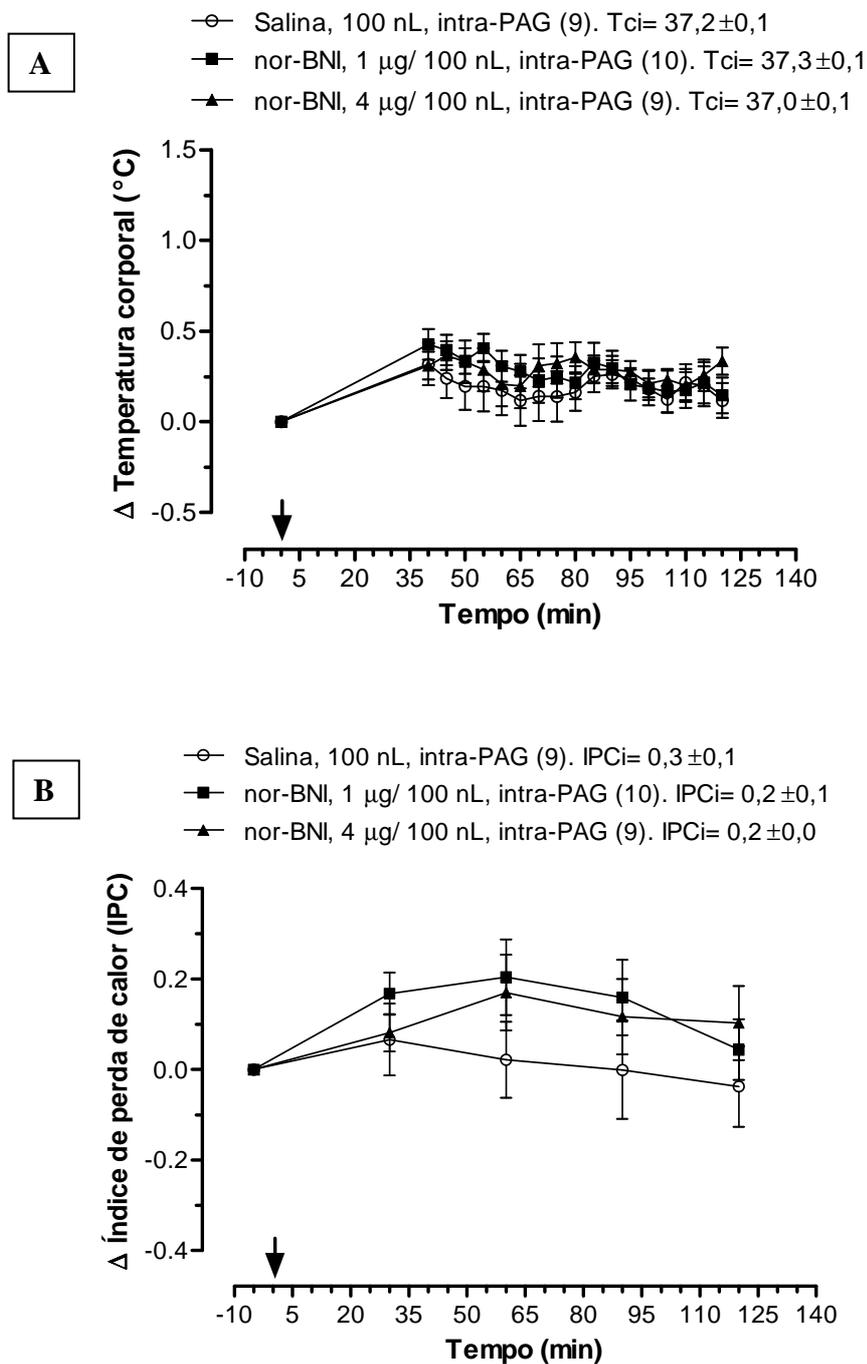


Figura 12. Efeito da microinjeção de antagonista de receptores opióides kappa, nor-BNI (1 and 4 µg/ 100 nL/ animal), ou salina (veículo; 100 nL) na substância cinzenta periaquedutal (PAG) sobre a temperatura corporal (A) e o índice de perda de calor (B) de animais não submetidos ao estresse de contenção. A seta indica o momento da microinjeção. Número de animais de cada grupo é apresentado entre parênteses. Tci é a temperatura corporal média antes de qualquer tratamento e IPCi é o índice de perda de calor antes de qualquer tratamento.

A Tc aumentou durante o estresse de contenção nos grupos que receberam a microinjeção intra- PAG de salina ou do antagonista seletivo de receptores opióide kappa, nor-BNI ($p < 0,001$, Figura 13A). No entanto, os animais tratados com a menor dose de nor-BNI intra-PAG apresentaram um maior aumento da Tc durante o estresse de contenção ($p < 0,05$; Figura 13A). O IPC variou de forma similar entre os grupos, diminuindo durante a contenção e aumentando após os animais serem retirados da contenção ($p < 0,001$; Figura 13B), indicando vasoconstrição e vasodilatação, respectivamente (Figura 10) e isso ocorre paralelamente ao aumento da Tc durante a contenção e ao retorno da Tc após a contenção.

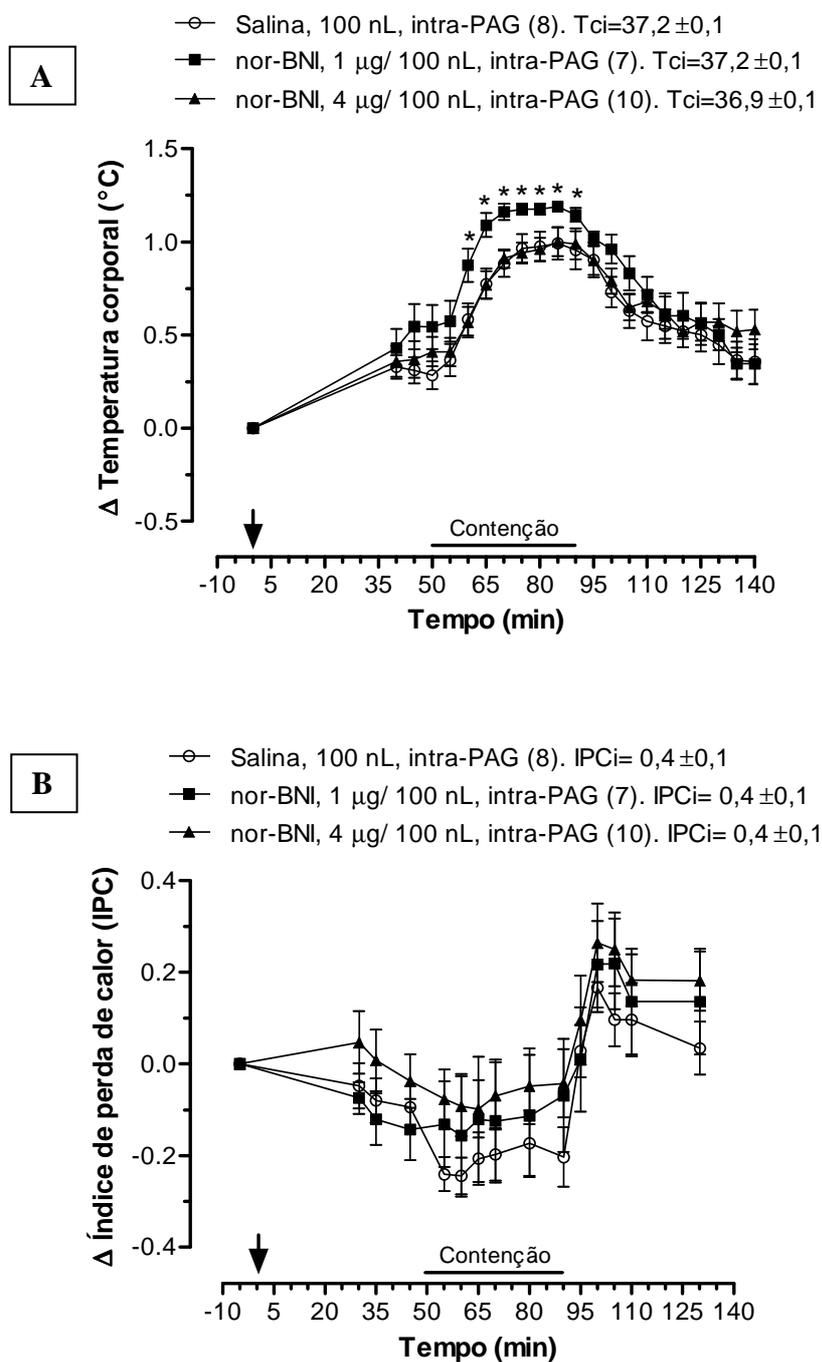


Figura 13. Efeito da microinjeção de antagonista de receptores opióides kappa, nor-BNI (1 and 4 µg/ 100nL/ animal), ou salina (veículo; 100 nL) na substância cinzenta periaquedutal (PAG) sobre a temperatura corporal (A) e o índice de perda de calor (B) de animais submetidos ao estresse de contenção. A seta indica o momento da microinjeção. Número de animais de cada grupo é apresentado entre parênteses. Tci é a temperatura corporal média antes de qualquer tratamento e IPCi é o índice de perda de calor antes de qualquer tratamento. * $p < 0,05$, diferença significativa entre nor-BNI (1 µg) e salina.

A Figura 14A mostra que não houve diferença no consumo de oxigênio entre os grupos nor-BNI e salina, em ratos que não foram submetidos ao estresse de contenção. Durante o estresse de contenção, no entanto, o consumo de oxigênio aumentou em ambos os grupos ($p < 0,001$), e a microinjeção de nor-BNI aumentou ainda mais essa resposta ($p < 0,05$; Figura 14B).

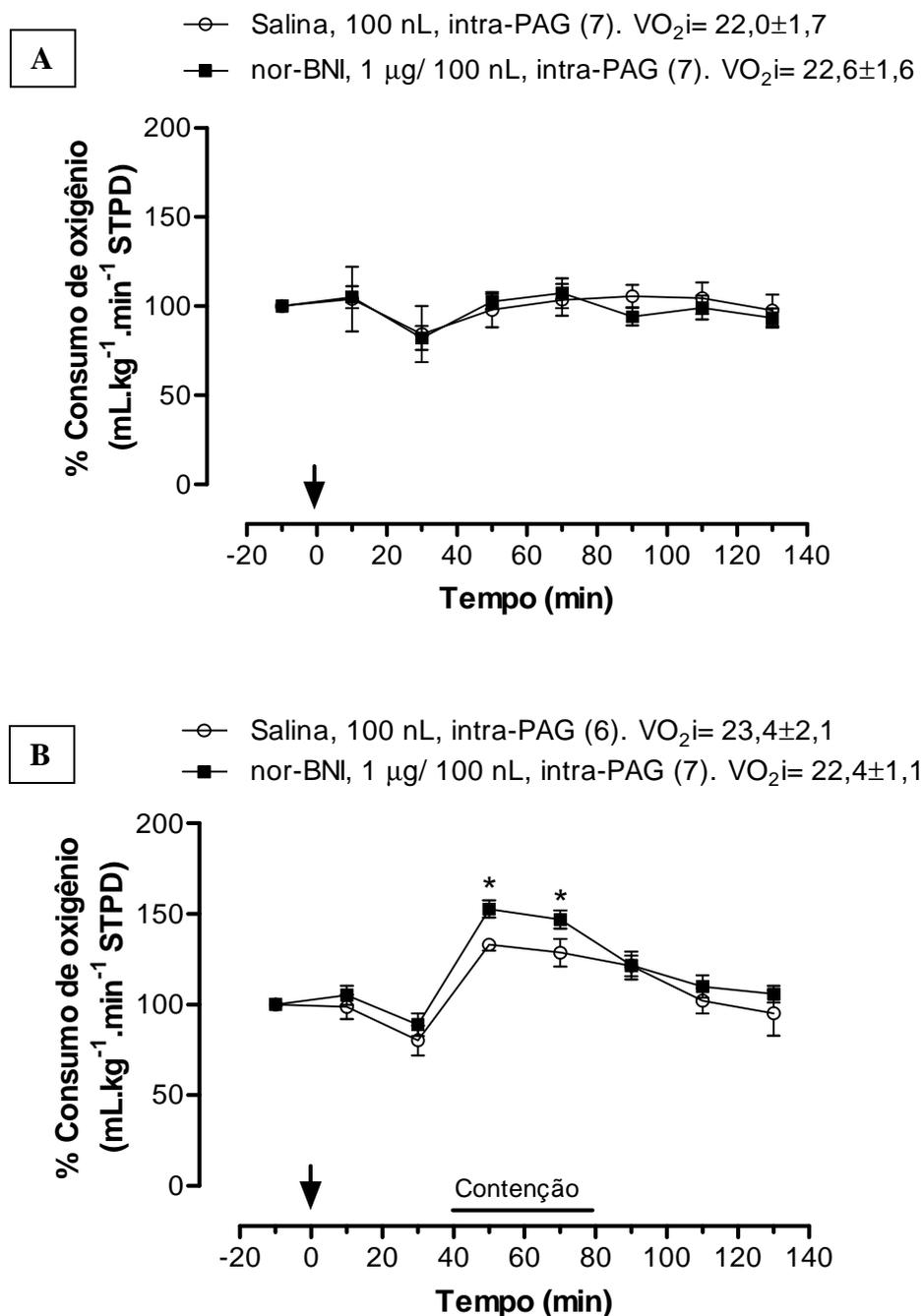


Figura 14. Efeito de microinjeção de antagonista de receptores opióides kappa, nor-BNI (1 μg / 100 nL / animal) ou solução salina (veículo; 100 nL) na substância cinzenta periaquedutal sobre o consumo de oxigênio ($\dot{V}O_2$) de animais não submetidos (A) e submetidos (B) ao estresse de contenção. A seta indica o momento da microinjeção. Número de animais de cada grupo é apresentado entre parênteses. $\dot{V}O_{2i}$ é o consumo de oxigênio antes de qualquer tratamento. * $p < 0,05$, diferença significativa entre nor-BNI (1 μg) e salina.

5. DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo corroboram dados da literatura que indicam que o estresse psicológico é capaz de aumentar a Tc de ratos, assim como na febre induzida por LPS (DE PAULA et al., 2000; OKA et al., 2001; SÓSZYNSKI, 2001; STEINER et al., 2003; DIMICO et al., 2006; SÓSZYNSKI, 2006; OKA, 2015). Os resultados relativos aos termoefetores analisados (consumo de O₂ e índice de perda de calor pela cauda) dão suporte à ideia de que esse aumento de Tc durante o estresse de contenção física é uma resposta febril. A Tc dos animais controle submetidos ao estresse aumentou em até 1°C (Figuras 9A e 13A) sendo acompanhada por ativação de termogênese e de conservação de calor (vasoconstrição cutânea da cauda). Neste contexto, pode-se dizer que os receptores opióides da PAG participam na febre induzida por estresse de contenção física, confirmando a nossa hipótese que os dois receptores mu e kappa desempenham um papel pirogênico e antipirético, respectivamente. Eles parecem apresentar essa ação não afetando a vasoconstrição da cauda (janela térmica), mas sim a termogênese, a qual é aumentada e diminuída pela ativação dos receptores mu e kappa, respectivamente, durante o estresse de contenção física.

O sistema nervoso central responde a um conjunto diversificado de desafios ou estresses, que ameaçam a sobrevivência do organismo, por meio de sinalização apropriada alterando as funções autonômica, endócrina e comportamental. Dessa forma as respostas fisiológicas de ratos expostos a desafios ambientais como infecção, ambiente frio, restrições ou barulho incluem taquicardia, ativação da termogênese e dos mecanismos de conservação de calor (vasoconstrição) e estimulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (DIMICCO et al., 2006).

O estresse psicológico é a tensão mental ou pressão sob a percepção de ameaça iminente, dor ou desconforto e desencadeia várias respostas fisiológicas. Como já foi dito, muitos estressores psicológicos induzem uma elevação aguda da Tc, observada em muitas espécies de mamíferos, e foi visto que esse aumento de temperatura aumenta os desempenhos físico e neural uma vez que promove o aquecimento dos músculos e do sistema nervoso central em alguns graus Celsius (BISHOP, 2003), sendo benéfico para sobrevivência, principalmente em situações de "luta ou fuga" ou em situações em que os animais enfrentam inimigos (KATAKOA et al., 2014).

O mecanismo neural que associa o estresse psicológico a uma elevação aguda ou crônica da Tc ainda não é totalmente esclarecido, porém o estudo de Kataoka et al. (2014) fornece evidências que o aumento da temperatura induzido pelo estresse envolve a participação do hipotálamo dorsomedial (DMH), o qual está envolvido nas respostas induzidas pelo estresse que recebe informações dos neurônios sensíveis ao calor da APO (região que integra sinais térmicos centrais e periféricos) e envia para a rafe medular rostral (rMR). Essa via neural ativa o sistema nervoso simpático responsável por estimular a termogênese do tecido adiposo marrom (TAM), o que acontece também em resposta ao frio ou à exposição a pirogênicos (MORRISON et al., 2014). O DMH também pode estar recebendo informações do núcleo da estria terminal, núcleo septal lateral, amígdala medial, que são regiões envolvidas com o estresse (VINKERS et al., 2008). No caso das exposições ao frio ou a pirogênicos, sabe-se que há a inibição da sinalização gabaérgica da APO, desinibindo os neurônios no DMH e, conseqüentemente da rMR, provocando um aumento da termogênese no TAM e da Tc. Não se sabe exatamente qual a via que o DMH-rMR promove a termogênese do TAM, porém existem especulações que há uma via multissináptica do DMH para rMR através da PAG caudal, transmitindo um impulso simpático para a termogênese do TAM (CHEN et al., 2002, YOSHIDA et al., 2005).

A PAG é uma região envolvida na regulação autonômica durante comportamentos defensivos (DEL-BEN e GRAEFF, 2009), controle da nocicepção, analgesia, medo, ansiedade e termorregulação (BEHBEHANI, 1995; CHEN et al, 2002; MENEZES et al., 2006; NAKAMURA e MORRISON, 2007; ZHANG et al., 2007). Essa região pontina contém β -endorfina (FINLEY et al, 1981) e expressa uma densidade significativa receptores opióides (LAW et al, 1979), especialmente mu e kappa (GUTSTEIN et al., 1998). Foi visto também que a naloxona inibe a hipertermia induzida pela β -endorfina e DAGO (agonista seletivo para os receptores mu) na PAG, o que sugere a ação de receptores mu da PAG para aumentar a Tc (WIDDOWSON et al, 1983). Todos esses fatos tornam este sistema uma rede importante para o desenvolvimento da febre induzida por contenção.

Há várias evidências na literatura sobre a participação dos receptores opióides mu e kappa nas respostas de estresse (AKIL et al., 1984) e na regulação da Tc (ADLER e GELLER, 1988; ADLER et al., 1983, BAKER e MEERT, 2002, BODNAR e KLEIN, 2005; GELLER et al., 1983; GELLER et al., 1986; SCARPELLINI et al., 2009; WILSON e HOWARD, 1996). Sabe-se que a ativação dos receptores mu por agonistas como o

DAMGO (SPENCER et al, 1988) e PL-017 (HANDLER et al., 1994) leva a um aumento da Tc (APPELBAUM e HOLTZMAN, 1986; BRADLEY et al., 199; SPENCER et al., 1988; HANDLER et al., 1992), enquanto a inibição desse tipo de receptor leva a uma redução da Tc ou inibição do seu aumento (KRAMER et al., 1989; BENAMAR et al., 2000; BAKER e MEERT, 2002; SALMI et al., 2003; CHEN et al, 2005; CHIO et al, 2005). Já a ativação de receptores kappa por agonistas como U50,488H (SPENCER et al, 1988) e dinorfina (CAVICCHINI et al., 1988; HANDLER et al., 1994) leva a uma redução da Tc (ADLER et al., 1983; HANDLER et al., 1992; ADLER e GELLER, 1993) e o antagonismo desses receptores parece não reduzir a Tc (HANDLER et al., 1997; BAKER e MEERT, 2002; CHEN et al., 2005).

Existem evidências de que o sistema opióide está envolvido na febre induzida por pirogênicos, uma vez que há aumento de β -endorfina no plasma e no sistema nervoso central (CARR et al., 1982; TSAI et al., 2003; MURPHY e LIPTON, 1983). Foi visto também que os receptores opióides μ no encéfalo parecem desempenhar um papel chave no desenvolvimento da febre induzida por LPS (BENAMAR et al, 2000; BENAMAR et al, 2005; FRAGA et al, 2008) e por pirogênicos endógenos tais como TNF-alfa, IL-6, a endotelina-1, proteína inflamatória de macrófago-1 (MIP-1) (FRAGA et al., 2008). Por outro lado, os receptores kappa da (APO) estão envolvidos na queda regulada de Tc, a anapirexia (resposta oposta à febre) induzida por hipóxia. Neste caso, os receptores opióides μ são importantes para o retorno da Tc ao estado de eutermia normóxia pós-hipóxia (SCARPELLINI et al., 2009). Foi verificado também que a microinjeção de nor-BNI na APO de esquilos promove o aumento de Tc durante a hibernação (YU e CAI, 1993).

Quanto à participação dos opióides endógenos na febre induzida por estresse psicológico, existem dados controversos na literatura (OKA et al, 2001). Alguns estudos demonstraram que a microinjeção de naloxona, um antagonista não seletivo de receptores opióides, na APO, diminui a febre induzida por estresse de manuseio e por exposição a campo aberto (BLASIG et al., 1978; STEWART e EIKELBOOM, 1979; PAE et al., 1985). Outros estudos, entretanto, demonstraram a falha no bloqueio da febre induzida por campo aberto pela naloxona (VIDAL et al., 1983; SINGER et al., 1986).

É interessante notar que a febre induzida por agentes inflamatórios é resultado de ações tanto pirogênicas (indutoras de febre) quanto antipiréticas (inibidoras de febre) endógenas, o que tornava possível esperar que durante a febre induzida pelo estresse de

contenção ocorresse também uma modulação pirogênica e antiperética com a ativação dos receptores opióides mu e kappa da PAG, respectivamente. Os resultados do presente estudo demonstram que o antagonismo dos receptores mu pelo CTAP (1 µg/ 100 nL) reduziu a febre induzida pelo estresse de contenção (Figura 9A), e o antagonismo dos receptores kappa pelo nor-BNI (1 µg/ 100 nL) aumentou essa febre (Figura 13A). As doses maiores dos antagonistas não tiveram efeito significativo sobre o aumento de Tc durante a contenção. Sabe-se que o efeito da administração de opióides depende da espécie estudada, da dosagem, da rota de administração e da temperatura ambiente (HANDLER et al., 1994). A temperatura ambiente não variou durante os experimentos, permanecendo por volta de 26°C. Talvez as doses maiores dos antagonistas utilizadas nos nossos protocolos tenham sido muito elevadas. Chen et al. (2005) sugere que exista um balanço tônico entre os receptores mu e kappa, sendo que com altas doses de um agente farmacológico, este pode passar a agir como antagonista ou agonista de outros receptores. Baker e Meert (2002) mostraram que a hipotermia induzida por opióides pode ser modulada por múltiplos receptores do sistema opióide, os quais têm a habilidade de interagir entre si.

Há uma importante participação da PAG nas vias eferentes da termorregulação autonômica, incluindo evidências de conexões entre a PAG e a APO (YOSHIDA et al., 2002). Estudos mostram que além da PAG ser sinalizada pelo aquecimento local da APO, a PAG rostral de ratos expostos ao calor recebe inputs do núcleo pre-óptico mediano (MnPO), área envolvida em respostas de perda de calor (YOSHIDA et al., 2005). E foi demonstrado também que estimulação química da porção rostral da PAG causa vasodilatação cutânea da cauda de ratos, uma resposta de perda de calor nesses animais (ZHANG et al., 1997 a,b). No mesmo estudo de YOSHIDA et al. (2005), verificou-se que a PAG caudal de ratos submetidos ao frio recebe inputs de neurônios do hipotálamo dorsomedial (DMH), região envolvida na termogênese (YOSHIDA et al., 2005). Além disso, estimulação da porção ventrolateral caudal da PAG estimula a termogênese independente de tremor no BAT (CHEN et al., 2002).

Como a resposta febril é caracterizada pela ativação de mecanismos de conservação de calor (vasoconstrição cutânea) e produção (termogênese) (ALMEIDA et al, 2004; BICEGO et al, 2007). No nosso estudo, durante a contenção, em paralelo com o aumento da Tc foi observada uma redução do IPC (indicando a vasoconstrição periférica) e no final da contenção, paralelo ao retorno de Tc a valores eutermia, o IPC aumentou. Os tratamentos com antagonistas não afetaram a vasoconstrição/vasodilatação da cauda

durante e após a contenção, indicando que os receptores opióides mu e kappa da PAG não estão envolvidos na modulação desse termofetor febril. No caso, ação pirogênica dos receptores mu e antipirética dos receptores kappa parece estar relacionado com o termofetor termogênico. O CTAP reduziu o consumo de oxigênio durante o estresse de contenção (Figura 11B) quando a Tc também foi reduzida em relação ao grupo da solução salina (Figura 9A) e o nor-BNI aumentou o consumo de oxigênio (Figura 14B), durante o estresse de contenção, quando a Tc aumentou em relação ao grupo salina (Figura 13A).

Dessa forma, nossos resultados são compatíveis com a idéia de que os receptores opióides mu e kappa da PAG rostral atuam como moléculas pirogênicas e antipiréticas, respectivamente, durante a febre induzida pelo estresse de contenção, agindo sobre a termogênese (Figura 15).

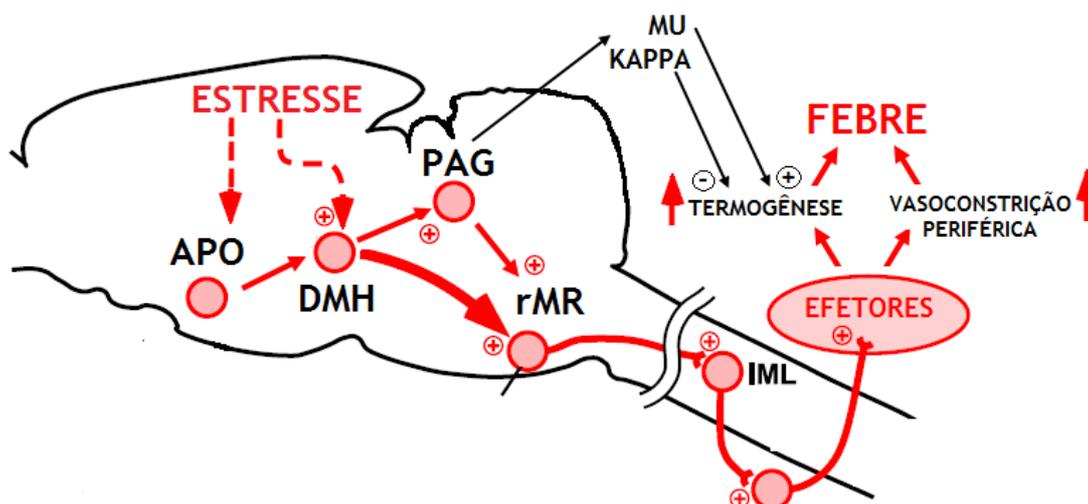


Figura 15. Desenho esquemático (adaptado de Kataoka et al, 2014), sugerindo a participação da substância cinzenta periaquedutal (PAG) na via da febre induzida por estresse psicológico, recebendo aferências do hipotálamo dorsomedial (DMH), que por sua vez recebe da área pré-óptica (APO) e enviando para a rafe medular rostral (rMR), a qual ativa os neurônios da coluna intermedolateral (IML), ativando os efetores, que aumentam a produção de energia térmica (termogênese) e a conservação de energia térmica (vasoconstrição periférica), aumentando a temperatura corporal de forma regulada (febre). Essa febre induzida pelo estresse apresenta uma modulação pelos receptores opióides da PAG, através da termogênese, uma vez que os receptores mu atuam como pirogênicos e os receptores kappa como antipiréticos.

6. CONCLUSÃO

Os resultados encontrados nesse estudo confirmam a nossa hipótese de que os receptores opióides mu e kappa, localizados na PAG dorsal participam da febre induzida pelo estresse de contenção, possuindo ação pirogênica e antipirética, respectivamente. Nossos resultados indicam que esses receptores atuam não afetando a conservação de calor, mas sim a termogênese, uma vez que durante o estresse de contenção os receptores mu aumentam a termogênese e os receptores kappa diminuem a termogênese. Durante a eutermia estes receptores na PAG dorsal não participam da Tc em eutermia.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, M. W.; GELLER, E. B. The opioid system and temperature regulation. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 28, p. 429-449, 1988.

ADLER, M.W., GELLER, E.B. Physiological functions of opioids: temperature regulation. In: Herz, A., Akil, H., Simon, E.J., (Eds.). **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 104/II, p. 205-238, 1993.

ADLER, M.W., HAWK, C., GELLER, E.B. Comparison of intraventricular morphine and opioid peptides on body temperature of rats. In: Lomax, P., Schönbaum, E. (Eds.). **Environment, Drugs and Thermoregulation**, p. 90-93, 1983.

AIHARA, H.; OKADA, Y.; TAMAKI, N. The effects of cooling and rewarming on the neuronal activity of pyramidal neurons in guinea pigs hippocampal slices. **Brain Research**, v. 893, p. 36-45, 2001.

AKIL, H.; WATSON, S. J.; YOUNG, E.; KHACHATURIAN, H.; WALKER, J. M. Endogenous opióides: biology and function. **Annual Review of Neuroscience**, v. 7, p. 223-255, 1984.

ALMEIDA, M. C.; STEINER, A. A.; BRANCO, L. G. S.; ROMANOVSKY, A. A. Cold-seeking behavior as a thermoregulatory strategy in systemic inflammation. **European Journal of Neuroscience**, v. 23, p. 3359-3367, 2006.

ALMEIDA, M. C.; STEINER, A. A.; COIMBRA, N. C.; BRANCO, L. G. Thermoeffector neuronal pathways in fever: a study in rats showing a new role of the locus coeruleus. **The Journal of Physiology**, v. 558, p. 283-294, 2004.

APPELBAUM, B.D., HOLTZMAN, S.G. Stress-induced changes in the analgesic and thermic effects of opioid peptides in the rat. **Brain Research**, v. 377, p. 330-336, 1986.

BAKER, A.K., MEERT, T.F. Functional effects of systemically administered agonists and antagonists of mu, delta, and kappa opioid receptor subtypes on body temperature in mice. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 302, p. 1253-1264, 2002.

BANDLER, R.; DEPAULIS, A. Midbrain periaqueductal gray control of defensive behavior in the cat and the rat. In: _____. **The midbrain periaqueductal gray matter**. New York: Plenum Press, 1991. p. 175-198.

BANDLER, R.; KEAY, K. A. Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray and integration of emotional expression. In: HOLSTEGE, G.; BANDLER, R.; SAPER, C. **Progress in Brain Research**. Amsterdam: Elsevier, 1996. p. 285-300.

BANDLER, R.; SHIPLEY, M. T. Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression? **Trends in Neurosciences**, v. 17, n. 11, p. 379-389, 1994.

BEHBEHANI, M. M. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. **Progress in Neurobiology**, v. 46, n. 6, p. 575-605, 1995.

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

BENAMAR, K.; McMENAMIN, M.; GELLER, E. B.; CHUNG, Y.G.; PINTAR, J. E.; ADLER, M. W. Unresponsiveness of mu-opioid receptor knockout mice to lipopolysaccharide-induced fever. **British Journal of Pharmacology**, v. 144, p. 1029-1031, 2005.

BENAMAR, K.; XIN, L.; GELLER, E. B.; ADLER, M. W. Blockade of lipopolysaccharide-induced fever by a μ -opioid receptor-selective antagonist in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 40, p.161-165, 2000.

BERK, M.L.; HEATH, J.E. Effects of preoptic, hypothalamic, and telencephalic lesions on thermoregulation in the lizard, *Dipsosaurus dorsalis*. **Journal of Thermal Biology**, v. 1, p. 65-78, 1975.

BÍCEGO, K. C.; BARROS, R. C. H.; BRANCO, L. G. S. Physiology of temperature regulation: Comparative aspects. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 147, p. 616-639, 2007.

BISHOP, D. Warm up I: potential mechanisms and the effects of passive warm up on exercise performance. **Sports Medicine**, v. 33, p. 439-454, 2003

BITTENCOURT, M DE.; A.; MELLEU, F.; F.; MARINO-NETO, J. Stress-induced core temperature changes in pigeons (*Columba livia*). **Physiology and Behavior**, v. 139, p. 449-58, 2015.

BLASIG, J.; HOLLT, V.; BAUERLE, U. e HERZ, A. Involvement of endorphins in emotional hyperthermia in rats. **Life Sciences**, v. 23, p. 2525-2531, 1978.

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

BLATTEIS, C. M.; SEHIC, E. Fever: how may circulating pyrogens signal the brain? **News in Physiological Sciences**, v.12, p.1-9, 1997.

BODNAR R. J.; KLEIN, G. E. Endogenous opiates and behavior. **Peptides**, v. 26, p. 2629-2711, 2005.

BORSINI, F.; LECCI, A.; VOLTERRA, G.; MELI, A.A model to measure anticipatory anxiety in mice? **Psychopharmacology (Berl)**, v. 98, p. 207-11, 1989.

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

BOULANT, J. A. Neuronal basis of Hammel's model for set-point thermoregulation. **Journal of Applied Physiology**, v.100, p.1347-1354, 2006.

BOULANT, J. A. Role of preoptic-anterior hypothalamus in thermoregulation and fever. **Clinical Infectious Diseases**, v. 31, p. 157-161, 2000.

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

BRANCO, L. G. S.; GARGAGLIONI. L. H.; BARROS, R. C. H. Anapyrexia during hypoxia. **Journal of Thermal Biology**, v.31, p.82-89, 2006.

BRANCO, L. G. S.; STEINER, A. A.; BÍCEGO, K. C. Regulação Endócrina da Temperatura Corporal. In: José, A.R. **Neurobiologia Básica e Aplicada**. São Paulo, Guanabara Koogan, cap. 8, 2005.

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

BRIESE, E.; CABANAC, M. Stress hyperthermia: physiological arguments that it is a fever. **Physiology and Behavior**, v. 49, p.1153-1157, 1991.

BROCCARDO, M.; IMPROTA, G. Hypothermic effect of D-Ala-deltorphan II, a selective δ opioid receptor agonist. **Neuroscience Letters**, v. 139, p. 209-212, 1992.

BUTTERWECK, V.; PRINZ, S.; SCHWANINGER M. The role of interleukin-6 in stress-induced hyperthermia and emotional behaviour in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 144, p. 49-56; 2003.

CABANAC, M.; DARDASHTI, M. Emotional fever in rats persists after vagotomy. **Physiology and Behavior**, v. 67, p. 347-350, 1999.

CABANAC, M.; GOSSELIN, F. Emotional fever in the lizard *Callopiestes maculatus* (Teiidae). **Animal Behavior**, v. 46, p. 200-202, 1993.

CANTERAS, N.S.; SWANSON, L.W. The dorsal premammillary nucleus: an unusual component of the mammillary body. **Proc Natl Academy Science**, v. 89, p. 10089-10093, 1992.

CARR, D. B, BERGLAND, R.; HAMILTON, A.; BLUME, H., KASTING, N.; ARNOLD, M.; MARTIN, J. B.; ROSENBLATT, M. Endotoxin-stimulated opioid peptide secretion: two secretory pools and feedback control in vivo. **Science**, v. 217, p. 845-848, 1982.

CARRIVE, P. Conditioned fear to environmental context: cardiovascular and behavioral components in the rat. **Brain Research**, v. 858, n. 2, p. 440-445, 2000.

CARRIVE, P. The periaqueductal gray and defensive behavior: functional representation and neuronal organization. **Behavioural Brain Research**, v. 58, n. 1-2, p. 27-47, 1993.

CAVICCHINI, E.; CANDELETTI, S.; FERRI, S. Effects of dynorphins on body temperature of rats. **Pharmacological Research Communication**, v. 20, p. 603-604, 1988.

CHEN, X.; MCCLATCHY, D.B.; GELLER, E.B.; TALLARIDA, R.J. e ADLER, M.W. The dynamic relationship between mu and kappa opioid receptor in body temperature regulation. **Life Sciences**, v. 78, p. 329-333, 2005.

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

CHIO, C.C; TSAI, S.M.; WANG, J. J.; LIN, M. T. 5-HT_{2A}-mu opioid receptor mechanisms in the hypothalamus mediate interleukin-1 β fever in rats. **Neuroscience Letters**, v. 381, p. 6-11, 2005.

COOPER, K. E. **Fever and antipyresis: the role of the nervous system**. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1995.

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

DEL-BEN, C. M.; GRAEFF, F. G. Panic disorder: is the PAG involved? **Neural Plasticity**, 2009:108135, 2009.

DIMICCO, J.A.; SARKAR, S.; ZARETSKAIA, M.V. e ZARETSKY, D.V. Stress-induced cardiac stimulation and fever: Common hypothalamic origins and brainstem mechanisms. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 126, p. 106-119, 2006.

ENDO, Y.; SHIKARI, K. Behavior and body temperature in rats following chronic foot shock or psychological stress exposure. **Physiology and Behavior**, v. 71, p. 263-268, 2000.

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

FELEDER, C.; PERLIK, V.; BLATTEIS, C. M. Preoptic norepinephrine mediates the febrile response of guinea pigs to lipopolysaccharide. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 293, p. R1135–R1143, 2007.

FERREIRA, D.T.; FACCIONE, M. Opiáceos, opióides de ação analgésica e antagonistas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas, Londrina**, v. 26, p. 125-136, 2005.

FINLEY, J. C. W.; LINDSTROM, P.; PETRUSZ, P. Immunocytochemical localization of beta-endorphin-containing neurons in rat brain. **Neuroendocrinology**, v. 33, p. 28-42, 1981.

FRAGA, D.; MACHADO, R. R.; FERNANDES, L. C.; SOUZA, G. E.; ZAMPRONIO, A. R. Endogenous opioids: role in prostaglandin-dependent and independent fever. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v.294, p.411-420, 2008.

GELLER, E. B.; HAWK, C.; KEINATH, S. H.; TALLARIDA, R. J.; ADLER, M. W. Subclasses of opioids based on body temperature change in rats: acute subcutaneous administration. **Journal of Pharmacology and Experimental Theraphy**, v. 225, p. 391-398, 1983.

GELLER, E. B.; ROWAN, C. H.; ADLER, M. W. Body temperature effects of opioids in rats: intracerebrentricular administration. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 24, p. 1761-1765, 1986.

GLOSSARY OF TERMS FOR THERMAL PHYSIOLOGY. 3^aed. **Japanese Journal of Physiology**, v.51, n.2, 2001.

GORDON, C. J. The therapeutic potential of regulated hypothermia. **Emergency Medicine Journal**, v. 18, p. 81-89, 2001.

GOTSEV, T.; IVANOV, A. Psychogenic elevation of body temperature in healthy persons. **Acta Physiologica Hungarica**, v. 1, p. 53-62, 1950.

GRAY, D. A.; MALONEY, S. K.; KAMERMAN, P. R. Restraint increases afebrile body temperature but attenuates fever in Pekin ducks (*Anas platyrhynchos*). **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 294, p. R1666-71, 2008.

GRIFFIN, J. D.; SAPER, C. B.; BOULANT, J. A. Synaptic and morphological characteristic of temperature-sensitive and -insensitive rat hypothalamic neurons. **Journal of Physiology (London)**, v. 537, p. 521-535, 2001.

GRIFFITHS, E. C.; SLATER, P.; WIDDOWSON, P. S., Effects of opioids, neurotensin and thyrotrophin-releasing hormone on rectal temperature after application to periaqueductal grey region of rat brain. **The Journal of Physiology**, 1983.

GUTSTEIN, H. B.; MANSOUR, A.; WATSON, S. J.; AKIL, H.; FIELDS, H. L. Mu and kappa opioid receptors in periaqueductal gray and rostral ventromedial medulla. **NeuroReport**, v. 9, p. 1777-1781, 1998.

GUYTON, A.C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. Elsevier, 11 ed., 2006, 1264p.

HANDLER, C. M.; GELLER, E. B.; ADLER, M. W. Effect of mu-, kappa-, and delta-selective opioid agonists on thermoregulation in the rat. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 43, p. 1209-1216, 1992.

HANDLER, C.M.; PILIERO, T.C.; GELLER, E.B. e ADLER, M.W. Effect of ambient temperature on the ability of mu-, kappa- and delta-selective opioid agonists to modulate thermoregulatory mechanisms in rat. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 268, p. 847-855, 1994.

JAMES, I. F.; GOLDSTEIN, A. Site-directed alkylation of multiple opioid receptors. I. Binding selectivity. **Molecular Pharmacology**, v. 25, p. 337-342, 1984.

JORDAN, B. A.; DEVI, L. A. G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. **Nature**, v. 399 (6737), p. 697-700, 1999.

JORDAN, B.; DEVI, L. A. Molecular mechanisms of opioid receptor signal transduction. **British Journal Anesthesia**, v. 81, p. 12-19, 1998.

KATAOKA, N.; HIOKI, H.; KANEKO, T.; NAKAMURA K. Psychological stress activates a dorsomedial hypothalamus-medullary raphe circuit driving brown adipose tissue thermogenesis and hyperthermia. **Cell Metabolism**, v. 20, p. 346-58, 2014.

KANOSUE, K.; CRAWSHAW, L. I.; NAGASHIMA, K.; YODA, T. Concepts to utilize in describing thermoregulation and neurophysiological evidence for how the system works. **European Journal of Applied Physiology**, v. 109, p. 5-11, 2010.

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

KLUGER, M. J. Fever: role of pyrogens and cryogens. **Physiological Review**, v. 71, p.93-127, 1991.

KLUGER, M. J., O'REILLY, B.; SHOPE, T. R.; VANDER, A. J. Further evidence that stress hyperthermia is a fever. **Physiology and Behavior**, v. 6, p. 763-766, 1987.

KOHLHAUSE, S.; HOFFMANN, K.; SCHLUMBOHM, C.; FUCHS, E.; FLUGGE, G. Nocturnal hyperthermia induced by social stress in male tree shrews: relation to low testosterone and effects of age. **Physiology and Behavior**, v. 104, p. 786-95, 2011.

KOSTERLITZ, H. W.; CORBETT, A. D.; GILLAN, M. G. C.; MCKNIGHT, A. T; PATERSON, S. J.; ROBSON, L. E. Recent developments in the bioassay of opioids. **Regulatory Peptides**, v. 4, p. 1-7; 1985.

KOTEJA. Measuring Energy Metabolism with Open-Flow Respirometric Systems: Which Design to Choose? **Functional Ecology**, vol. 10, p. 675-677, 1996.

KRAMER, T.H.; SHOOK, J.E.; KAZMIERSKY, W.; AYRES, E.A.; WIRE, W.S.; HRUBY, V.J. e BURKS, T.F. Novel peptidic mu opioid antagonists: pharmacologic characterization *in vitro* and *in vivo*. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 249, p. 544-551, 1989.

LAW, P. Y.; LOH, H. H.; LI, C. H. Properties and location of fl-endorphin receptor in rat brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v. 76, p. 5455-5459, 1979.

LEE, B.Y.; PADICK, D. A.; MUCHLINSKI, A. E. Stress fever magnitude in laboratory-maintained California ground squirrels varies with season.

Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology, v. 125, p. 325-30, 2000.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L. COX, M. M. Enzymes. **In: Principles of biochemistry**. W.H. Freeman, New York, NY, USA, 2000.

LEMAY, L. G.; VANDER, A. J.; KLUGER, M. J. The effect of physiological stress on plasma interleukin-6 activity in rats. **Physiology and Behavior**, v. 47, p. 957-961, 1990.

LEPKOVSKY, S.; SNAPIN, N.; FUTURA, F. Temperature regulation and appetitive behavior in chickens with hypothalamic lesions. **Physiology and Behavior**, v. 3, p. 911-915, 1968.

LILLYWHITE, H.B.; Temperature selection by the bullfrog, *Rana catesbeiana*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 40, p. 213-227, 1971.

LINNMAN, C.; MOULTON, E. A.; BARMETTLER, G.; BECERRA, L.; BORSOOK, D. Neuroimaging of the periaqueductal gray: State of the Field. **NeuroImage**, v. 60, p. 505-522, 2012.

LKHAGVASUREN, B.; OKA, T.; NAKAMURA, Y.; HAYASHI, H.; SUDO, N.; NAKAMURA, K. Distribution of Fos-immunoreactive cells in rat forebrain and midbrain following social defeat stress and diazepam treatment. **Neuroscience**, v. 272, p. 34-57, 2014.

LOPES, L. T.; PATRONE, L. G.; BÍCEGO, K. C.; COIMBRA, N. C.; GARGAGLIONI, L. H. Periaqueductal gray matter modulates the hypercapnic ventilatory response. **Pflügers Archiv**, v. 464, p. 155-66, 2012.

MACKOWIAK, P. A. Concepts of fever. **Archives of Internal Medicine**, v.158, p.1870-1881, 1998.

MARAZZITI, D.; DIMURO, A.; CASTROGIVANNI, P. Psychological stress and body temperature changes in humans. **Physiology and Behavior**, v. 52, p. 393-5, 1992.

MARKS, A.; VIANNA, D. M.; CARRIVE, P. Nonshivering thermogenesis without interscapular brown adipose tissue involvement during conditioned fear in the rat. **The American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 296, p. R1239-47, 2009.

McNAUGHTON, N.; CORR, P. J. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 3, p. 285-305, 2004.

MEYER, L. C.; FICK, L.; MATTHEE, A.; MITCHELL, D.; FULLER, A. Hyperthermia in captured impala (*Aepyceros melampus*): a fright not flight response. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 44, p. 404-16, 2008.

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

MOHAMMED, M.; OOTSUKA, Y.; BLESSING, W. Brown adipose tissue thermogenesis contributes to emotional hyperthermia in a resident rat suddenly confronted with an intruder rat. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 306, p. R394-400, 2014.

MORLEY, R. M.; CONN, C. A.; KLUGER, M. J.; VANDER, A. J. Temperature regulation in biotelemetered spontaneously hypertensive rats. **American Journal of Physiology**, v. 258, p. R1064-9, 1990.

MORRISON, S. F.; NAKAMURA, K. Central neural pathways for thermoregulation. **Frontiers in bioscience**, v. 16, p. 74-104, 2011.

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

MORRISON, S.F.; MADDEN, C.J.; TUPONE, D. Central neural regulation of brown adipose tissue thermogenesis and energy expenditure. **Cell Metabolism**, v. 19, p. 741-756, 2014.

MUCHLINSKI, A. E.; BALDWIN, B. C.; PADICK, D.A.; LEE, B. Y, SALGUERO, H. S.; GRAMAJO, R. California ground squirrel body temperature regulation patterns measured in the laboratory and in the natural environment. **Comparative Biochemistry and Physiology PartA: Molecular and Integrative Physiology**, v. 120, p.365-72, 1998.

MURPHY, M.T.; LIPTON, J. M. Beta-endorphin: effect on thermoregulation in aged monkeys. **Neurobiology of Aging**, v. 4, p. 187-190, 1983.

NAKAMURA, K.; MORRISON, S. F. Central efferent pathways mediating skin coolingevoked sympathetic thermogenesis in brown adipose tissue. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 292, n. 1, p. 127-136, 2007.

NEDERGAARD, J.; BENGTSSON, T.; CANNON, B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 293, p. E444-52, 2007.

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

OKA, T. Psychogenic fever: how psychological stress affects body temperature in the clinical population. **Temperature**, v. 2, p. 368-378, 2015.

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

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

OKA, T.; OKA, K.; KOBAYASHI, T.; SUGIMOTO, Y.; ICHIKAWA, A.; USHIKUBI, F.; NARUMIYA, S.; SAPER, C. B. Characteristics of thermoregulatory and febrile responses in mice deficient in prostaglandin EP1 and EP3 receptors. **Journal of Physiology**, v. 551, p. 945-54, 2003.

PAE, Y.S.; LAI, H. e HORITA, A. Hyperthermia in the rat from handling stress blocked by naltrexone injected into the preoptic-anterior hypothalamus. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 22, p. 337-339, 1985.

PATERSON, S.J.; ROBSON, L.E.; KOSTERLITZ, H.W. Classification of opioid receptors. **British Medical Bulletin**, v. 39, p. 31-36; 1983.

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

PARR, L. A.; HOPKINS, W. D. Brain temperature asymmetries and emotional perception in chimpanzees, Pan troglodytes. **Physiology and Behavior**, v. 71, p. 363-71, 2000.

PEDERNERA-ROMANO, C.; RUIZ DE LA TORRE, J. L.; BADIELLA, L.; MANTECA, X. Effect of perphenazine enanthate on open-field test behaviour and stress-induced hyperthermia in domestic sheep. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 94, p. 329-32, 2010.

PELOSO, E.; WACHULEC, M. SATINOFF, E. Stress-induced hyperthermia depends on both time of day and light condition. **Journal of Biological Rhythms**, v. 17, p. 164-170, 2002.

RANDALL, D.; BURGGREN, W.; FRENCH, K. Eckert - **Fisiologia Animal**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2000, 4^a ed, 729 p.

RAWLS, S.M.; COWAN, A. Modulation of delta opioid-evoked hypothermia in rats by WAY 100635 and fluoxetine. **Neuroscience Letters**, v. 398, p. 319-324, 2006.

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

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

SALMI, P.; KELA, J.; ARVIDSSON, U.; WAHLESTEDT, C. Functional interactions between δ - and μ -opioid receptors in rat thermoregulation. **European Journal of Pharmacology**, v. 458, p. 101-106, 2003.

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

SAWCHENKO, P.E. et al. The distribution and cells of origin of serotonergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. **Brain Research**, v. 277, p. 355-360, 1983.

SCARPELLINI, C. S.; GARGAGLIONI, L. H.; BRANCO, L. G. S.; BÍCEGO, K.C. Role of preoptic opioid receptors in the body temperature reduction during hypoxia. **Brain Research**, v. 25, p. 66-74, 2009.

SCHIMIDT-NIELSEN, K. **Fisiologia Animal – Adaptação e Meio Ambiente**. Santos, São Paulo, 2002, 611p.

SCHMELTING, B.; CORBACH-SOHLÉ, S.; KOHLHAUSE, S.; SCHLUMBOHM, C.; FLUGGE, G.; FUCHS, E. Agomelatine in the tree shrew model of depression: effects on stress-induced nocturnal hyperthermia and hormonal status. **Eur Neuropsychopharmacology**, v. 24, p. 437-47, 2014.

SCOTT, G.R.; CADENA, V.; TATTERSALL, G.J.; MILSON, W. Body temperature depression and peripheral heat loss accompany the metabolic and ventilatory responses to hypoxia in low and high altitude birds. **The Journal of Experimental Biology**, v. 211, p. 1326-1335, 2008.

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

SHIBATA, H.; NAGASAKA, T. Contribution of nonshivering thermogenesis to stress-induced hyperthermia in rats. **Japanese Journal of Physiology**, v. 32, p. 991-5, 1982.

SHIBATA, H.; NAGASAKA, T. Role of sympathetic nervous system in immobilization- and cold-induced brown adipose tissue thermogenesis in rats. **Japanese Journal of Physiology**, v. 34, p. 103-11; 1984.

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

SNOW, A. E.; HORITA, A. Interaction of a pomorphine and stressors in the production of hyperthermia in the rabbit. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 220, p. 335-9, 1982.

SORIANO, R. N.; BRANCO, L. G. Reduced stress fever is accompanied by increased glucocorticoids and reduced PGE₂ in adult rats exposed to endotoxin as neonates. **The Journal of Neuroimmunology**, v. 225, p. 77-81, 2010.

SOSZYNSKI, D. Molecular mechanism of emotional fever – the role of nitric oxide. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 57, p. 51-59, 2006.

SOSZYNSKI, D. The inhibition of nitric oxide synthase suppresses LPS- and psychological-stress-induced fever in rats. **Physiology and Behavior**, v. 72, p. 65-72, 2001.

SOSZYNSKI, D.; KOZAK, W.; KLUGER, M. J. Endotoxin tolerance does not alter open field-induced fever in rats. **Physiology and Behavior**, v. 63, p. 689-92, 1998.

SPENCER, R. L.; HRUBY, V. J.; BURKS, T. F. Body temperature response profiles for selective mu, delta, and kappa opioid agonists in restrained and unrestrained rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 246, p. 92-101, 1988.

STEINER, A. A.; BRANCO, L. G. S. Hypoxia-induced anapyrexia: implications and putative mediators. **Annual Review of Physiology**, v.64, p.263-288, 2002.

STEINER, A. A.; BRANCO, L. G. S. Hypoxia-induced anapyrexia: implications and putative mediators. **Annual Review of Physiology**, v.64, p. 263-288, 2002.

STEINER, A. A.; RESTE, G.; BRANCO, L.G.S. Role of the brain heme oxygenase-carbon monoxide pathway in stress fever in rats. **Neuroscience Letters**, v. 341, p. 193-196, 2003.

STEWART, J.; EIKELBOOM, R. Stress masks the hypothermic effect of naloxona in rats. **Life Sciences**, v. 25, p. 1165-1172, 1979.

TATTERSALL, G.; MILSOM, W. K. Transient peripheral warming accompanies the hypoxic metabolic response in the golden-mantled ground squirrel. **Journal of Experimental Biology**, v. 206, p.33-42, 2003.

TATTERSALL, G.; MILSOM, W. K.; ABE, A.; BRITO, S.; ANDRADE, D. The thermogenesis of digestion in rattlesnakes. **Journal of Experimental Biology**, v. 207, p.579-585, 2004.

TSAI, S. M.; LIN, M. T.; WANG, J. J.; HUANG, W. T. Pyrogens Enhance β -Endorphin Release in Hypothalamus and Trigger Fever That Can Be Attenuated by Buprenorphine. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 93, p. 155-162, 2003.

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

VAN DER HEYDEN, J.A.M.; ZETHOF, T.J.J. e OLIVER, B. Stress-induced hyperthermia in single housed mice. **Physiology and Behavior**, v. 62, p. 463-470, 1997.

VIANNA, D. M.; CARRIVE, P. Changes in cutaneous and body temperature during and after conditioned fear to context in the rat. **European Journal of Neuroscience**, v. 21, p. 2505-12, 2005.

VIDAL, C.; SUAUDEAU, C. e JACOB, J. Hyper- and hypothermia induced by non-noxious stress: effects of naloxone, diazepam and gama-acetylenic GABA. **Life Sciences**, v. 33, p. 587-590, 1983.

VINKERS, C.H.,; VAN BOGAERT, M.J.; KLANKER, M.; KORTE, S.M., OOSTING, R.,; HANANIA, T.; HOPKINS, S.C.; OLIVIER, B.; GROENINK, L. (2008). Translational

aspects of pharmacological research into anxiety disorders: the stress-induced hyperthermia (SIH) paradigm. **European Journal of Pharmacology**, v. 585, p. 407-425, 2008.

WASSERSTROM, J. A.; VITES, A. M. Activation of contraction in cat ventricular myocytes: effects of low Cd²⁺ concentration and temperature. **American Journal of Physiology**, v. 277, p.H488- H498, 1999

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. **Anesthesia and Analgesia**, v. 82, p. 810-816, 1996.

WIDDOWSON, P. S.; GRIFFITHS, E. C.; SLATER, P. Body temperature effects of opioids administered into the periaqueductal grey area of rat brain. **Regulatory Peptides**, v. 7, p. 259-267, 1983.

WILSON, J.R., HOWARD, B.A. Effects of cold acclimation and central opioid processes on thermoregulation in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 54, p. 317-325, 1996.

YOKOI, Y. Effect of ambient temperature upon emotional hyperthermia and hypothermia in rabbits. **Journal of Applied Physiology**, v. 21, p. 1795-8, 1966.

YOSHIDA, K., MARUYUMA, M.; HOSONO, T.; NAGASHIMA, K.; FUKUDA, Y.; GERSTBERGER, R.; KANOSUE, K.; Fos expression induced by warming the preoptic area in rats. **Brain Research**, v. 933, p. 109-117, 2002.

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

YU, L. C.; CAI, Y. P. Arousal following intra-preoptic area administration of naltrexone, ICI 174864 or nor-BNI in hibernating ground squirrels. **Brain Research**, v.57, p.31-35, 1993.

ZETHOF, T.J.J.; VAN DER HEYDEN, J.A.M.; TOLBOOM, J.T.B.M. e OLIVIER, B. Stress-induced hyperthermia as a putative anxiety model. **European Journal of Pharmacology**, v. 294, p. 125-135, 1995.

ZHANG, W.; HAYWARD, L. F.; DAVENPORT, P. W. Respiratory responses elicited by rostral versus caudal dorsal periaqueductal gray stimulation in rats. **Autonomic Neuroscience**, v. 134, n. 1-2, p. 45-54, 2007.

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

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