

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Fisiologia e Biofísica
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia

**O papel do óxido nítrico no núcleo paraventricular do hipotálamo
em condições de exercício e hipóxia**

Bruna Lima Costa Zuquim Nunan

Belo Horizonte

2020

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Fisiologia e Biofísica
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia

**O papel do óxido nítrico no núcleo paraventricular do hipotálamo
em condições de exercício e hipóxia**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Glauber dos Santos Ferreira da Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Cândido Celso Coimbra

Belo Horizonte

2020

043

Nunan, Bruna Lima Costa Zuquim.

O papel do óxido nítrico no núcleo paraventricular do hipotálamo em condições de exercício e hipóxia [manuscrito] / Bruna Lima Costa Zuquim Nunan. - 2020.

119 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Glauber dos Santos Ferreira da Silva. Coorientador: Prof. Dr. Cândido Celso Coimbra.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Exercício Físico. 2. Hipóxia. 3. Regulação da Temperatura Corporal. 4. Ventilação. 5. Hipotálamo. 6. Óxido Nítrico. I. Silva, Glauber dos Santos Ferreira da. II. Coimbra, Cândido Celso. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 612

“O PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO NO NÚCLEO
PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO EM CONDIÇÕES
DE EXERCÍCIO E HIPÓXIA.”


BRUNA LIMA COSTA ZUQUIM NUNAN

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia 20 de julho de 2020, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:


Profa. Dra. Kênia Cardoso Bicego


Universidade Estadual Paulista – FCAV/UNESP


Prof. Dr. Marco Antônio Peliky Fontes
Universidade Federal de Minas Gerais


Prof. Dr. Cândido Celso Coimbra

Universidade Federal de Minas Gerais

Co-Orientador


Prof. Dr. Glauber dos Santos Ferreira da Silva
Universidade Federal de Minas Gerais

Orientador

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia
Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte, 20 de julho de 2020

Aos meus pais, Gracy e Rodrigo, meus pilares da vida.

À minha irmã e madrinha, Anna Paula, pela cumplicidade, companheirismo e torcida.

**Aos meus avós Hélcio, Rosa (*in memoriam*) e Aparecida, pelo exemplo de trabalho,
renúncia e amor.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela providência diária, por iluminar o meu caminho e me permitir trilhar essa trajetória de vida.

À minha família, pelo acolhimento e colo. Se cheguei até aqui, é fruto do esforço, exemplo e educação dos meus pais, Gracy e Rodrigo. À minha mãe, pelo diálogo contínuo, empatia e carinho. Ao meu pai, pelo incentivo constante e encorajamento diário. À minha irmã Anna, por toda torcida, incentivo e troca. À Maria, minha “Mainha” mãe do coração, por todo acalento e cuidado. Aos meus avós, por toda sabedoria doada com amor. Sem vocês isso não seria possível.

Ao Professor Glauber, pela acolhida desde o primeiro momento, pela orientação sempre presente, pela compreensão, oportunidades e ensinamentos diários. Obrigada por instigar o questionamento contínuo e acreditar na minha formação.

Ao Professor Cândido, por assumir a co-orientação e nortear os experimentos da termorregulação. Por sempre agregar conhecimento, obrigada por sua atenção.

Aos professores do Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo, Dra. Adelina Martha dos Reis, Dra. Maristela de Oliveira Poletini, Dra. Paula Bargi de Souza e Dr. Raphael Escorsim Szawka, pela constante acolhida, pelas trocas e pelo incentivo constante à minha formação e crescimento profissional.

Aos membros da banca examinadora, Profa. Dra. Kênia Bicego e Prof. Dr. Marco Antônio Peliky pela excelente e valiosa contribuição a este trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani, da UNESP-Araraquara, que tornou esse projeto possível por meio da doação da droga utilizada.

Ao Lucas Rios Drummond, por todo auxílio e disponibilidade, por compartilhar suas experiências e conhecimento.

À Cristiane Amorim de Paula e Quézia Teixeira Rodrigues, minhas “irmãs mais velhas” do coração, pela ajuda contínua, pela paciência e cuidado comigo, pelas trocas infinitas. Vocês estarão para sempre no meu coração.

À Ayla Secio Silva, minha companheira de experimentos e de início de jornada. Pelo crescimento contínuo conjunto.

À Iara Pastor Nogueira, pelo encontro, sinergia e amizade criada. Isto é para a vida. Gratidão pela troca e acolhimento.

Aos amigos do Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo: Ana Clara Campideli, Daniela Gusmão, Fernanda Machado, Gleicy Gonçalves, Hanna Umezu, Flávia Araújo, Kaoma Silva, Nayara Abreu, Nayara Aquino, Paola Fernandes, Patrícia Henriques, Roberta Lopes, Thais Santana e Thatiane Vitoi por todos os momentos de trabalho, alegria e ansiedade compartilhados.

À Simone Pio, pelo auxílio e paciência constantes, por toda disponibilidade e pelos ensinamentos.

Aos professores, técnicos, funcionários e alunos do programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia do ICB-UFMG que contribuíram para a realização desse trabalho.

Aos amigos do departamento por todos os momentos de aprendizagem e troca. Pelas gargalhadas, farras, discussões e viagens. Não citarei nomes para não esquecer ninguém, porém gostaria de frisar que sem vocês esses dois anos teriam sido difíceis. Vocês tornaram os dias mais leves.

À Renata Nunan, minha prima/irmã, pela troca constante, pela sinergia e pelo colo.

Às minhas grandes amigas da vida, Bárbara Campomizzi, Daniela Moutinho, Fernanda Viana e Marcela Siqueira. Gratidão pela escuta acolhedora, pelos momentos de descontração, pelo carinho e amor fraterno de sempre.

A todo grupo GG, pela valiosa amizade construída ao longo dos anos.

Aos amigos que ao longo da vida agregaram sorrisos, conversas e trocas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo concedida, e à população brasileira, que através do CNPq, CAPES e FAPEMIG financiaram esse projeto e contribuíram para mais um passo da minha formação.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, o meu muito obrigada!

“A persistência é o menor caminho para o êxito.”

(Charles Chaplin)

RESUMO

O núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) é um importante sítio de controle autonômico e neuroendócrino do organismo. Além deste núcleo ter conexão direta com a área pré-óptica (APO), principal centro integrativo da termorregulação, seus neurônios pré-autonômicos se projetam diretamente para a coluna intermédio lateral da medula, eferência simpática que inerva os órgãos efetores da termorregulação. É conhecido que os neurônios do PVN expressam a isoforma neuronal da óxido nítrico sintase (nNOS), enzima que converte L-Arginina em óxido nítrico (NO) no Sistema Nervoso Central (SNC). É sabido que o exercício físico aumenta a expressão da nNOS no PVN e que o NO está presente na via da termorregulação durante o exercício físico. Além disso, o PVN tem conexões diretas com núcleos do tronco encefálico responsáveis pelo controle da ventilação, e sabe-se que o PVN participa do quimiorreflexo periférico, e neurônios que expressam nNOS estão ativos na hipóxia aguda. Sendo assim o presente estudo teve três principais objetivos: i) avaliar o papel do NO no PVN na resposta térmica ao exercício progressivo agudo; ii) avaliar o papel do NO no PVN na resposta ventilatória à hipóxia; e iii) avaliar o efeito da inibição da nNOS no PVN na resposta anapirética à exposição à hipóxia. Para isso o estudo foi dividido em 2 protocolos experimentais. Para o protocolo experimental 1, foram utilizados ratos *Wistar* machos. Foram realizadas microinjeções bilaterais da droga Nw-Propyl-L-Arginina (NPLA) nas doses de 0,4 nmol/100nL (N=10), 0,04 nmol/100nL (N=10), ou veículo (NaCl 0,15M) (N=12) e os animais foram submetidos ao exercício progressivo agudo de corrida em esteira rolante. Foram coletadas variáveis térmicas e de desempenho físico. Para o protocolo experimental 2, foram utilizados 16 ratos *wistar* machos. A ventilação pulmonar (\dot{V}_E) e a temperatura abdominal (T_{abd}) foram aferidos no período basal, antes da microinjeção de NPLA no PVN e antes do início da exposição à hipóxia. Após a injeção, os animais iniciaram imediatamente a exposição à hipóxia de 7% de O₂ durante 1 hora. Os dados da ventilação foram coletados a cada 20 minutos. No protocolo de exercício físico os animais que receberam a maior dose da droga (0,4 nmol/100nL) apresentaram atenuação da T_{abd} na fadiga quando comparados ao grupo veículo ($38,28 \pm 0,22$ °C vs. $39,35 \pm 0,16$ °C, $p = 0,005$). Não foi observada diferença na T_{cauda} entre os grupos. Não houve diferença significativa no limiar para dissipação de calor entre os grupos veículo e droga. Em contrapartida foi observado um aumento da sensibilidade (H_{sen}) no grupo NPLA 0,4 comparado com o grupo veículo (NPLA 0,4: $13,74 \pm 1,45$ vs. veículo: $8,84 \pm 0,91$, $p < 0,05$). O acúmulo de calor (cal) foi menor nos animais NPLA 0,4 comparado ao grupo veículo (NPLA 0,4: $335,14 \pm 39,44$ cal vs. VEÍCULO: $569,61 \pm 51,63$ cal, $p = 0,014$). A inibição da nNOS no PVN piorou o desempenho nos animais que receberam a menor dose (0,04 nmol/100nL). No protocolo experimental 2, não foi observada diferença nas respostas ventilatórias e térmica à hipóxia entre os grupos NPLA (n=8) e veículo (n=8). Os dados do presente estudo sugerem que o NO no PVN teria um comportamento excitatório para os mecanismos reguladores da hipertermia provocada pelo exercício progressivo. Em contrapartida, a dose utilizada no protocolo experimental 2, não foi capaz de alterar a resposta ventilatória e térmica à hipóxia aguda.

Palavras-Chave: Exercício Físico. Hipóxia. Regulação da Temperatura Corporal. Ventilação. Hipotálamo. Óxido Nítrico.

ABSTRACT

The paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN) is an important site for autonomic and neuroendocrine control. In addition, this nucleus projects to preoptic area (POA), the main integrative thermoregulation center, and its pre-autonomic neurons also project directly to the intermediolateral column, the main site of sympathetic outflow that controls thermoeffector organs. In addition, PVN neurons express the neuronal isoform of nitric oxide synthase (nNOS), the main enzyme in the conversion of L-Arginine to nitric oxide (NO), a gaseous transmitter in the Central Nervous System. It is known that physical exercise increases nNOS expression in PVN. In addition, PVN has direct connections to brainstem nuclei that control ventilation, and it is known that PVN participates in peripheral chemoreflex and neurons that express nNOS are active in acute hypoxia exposure. Therefore, the present study had three main objectives: i) to evaluate the role of NO in PVN in thermoregulation during acute progressive exercise; ii) evaluate the role of NO in PVN in ventilatory responses to acute hypoxia; and iii) evaluate the effect of nNOS inhibition in PVN in the anapyretic response to exposure to hypoxia. The study was divided into two experimental protocols. For the experimental protocol 1, male *Wistar* rats were used. Bilateral microinjections of the drug Nw-Propyl-L-Arginine (NPLA) were performed in PVN at doses of 0.4 nmol/100nL (N=10) or 0.04nmol/100 nL (n=10) or vehicle (NaCl 0,15M) (n=12), and animals were submitted to an acute progressive exercise running on a treadmill. Thermal and performance variables were collected. For experimental protocol 2, 16 male *Wistar* rats were used. Pulmonary ventilation (\dot{V}_E) and abdominal temperature (T_{abd}) were measured at baseline, before NPLA microinjection into the PVN and before the beginning of hypoxia. After the microinjection, animals remained one hour in hypoxia exposure (7% O₂). Ventilation data were collected every 20 minutes. At progressive exercise protocol, the animals that received the highest dose of the drug (0.4 nmol/100nL) presented an attenuation in fatigue T_{abd} when compared to vehicle group (38.28 ± 0.22 °C vs. 39.35 ± 0.16 °C, $p = 0.005$). There was no difference in T_{tail} and H_{thr} between groups. In contrast, H_{sen} was increased in NPLA 0.4 group, compared to vehicle, indicating that in these animals, T_{abd} was attenuated during exercise (NPLA 0.4: 13.74 ± 1.45 vs. vehicle: 8.84 ± 0.91 , $p < 0.05$). Heat storage was lower in NPLA 0.4 compared to vehicle group vehicle (335.14 ± 39.44 cal vs. 569.61 ± 51.63 cal, $p = 0.014$). The inhibition of nNOS in PVN worsened the performance of animals that received the lowest dose (0.04 nmol/100nL). In experimental protocol 2, there was no difference in the hypoxic ventilatory and thermal responses between NPLA (n=8) and vehicle (n=8) groups. These results suggest that NO in PVN is necessary for the proper thermal regulatory mechanisms during progressive exercise, facilitating regulatory mechanisms of hyperthermia. In contrast, at the dose used in experimental protocol 2, the results suggest that endogenous NO does not play a significant role in the thermal and ventilatory responses to acute hypoxia.

Keywords: Physical Exercise. Hypoxia. Body Temperature Regulation. Ventilation. Hypothalamus. Nitric Oxide.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1. Efeitores termorreguladores. Exemplos de estratégias autonômicas e comportamentais para controle da temperatura corporal (adaptado de Tan & Knight, 2018).....	20
Figura 1.2. . Esquema conceitual do sistema de termorregulação. Sinais sensoriais térmicos são monitorados por termorreceptores na pele e órgãos, e por mediadores pirogênicos (adaptado de Morrison & Nakamura, 2011).....	21
Figura 1.3. Termorregulação em ratos durante a corrida em esteira rolante. Dinâmica da temperatura interna, temperatura da pele da cauda e do consumo de oxigênio durante o exercício com intensidade constante (A) e exercício com aumentos progressivos da intensidade (B) (figura retirada da tese de Drummond. LR, 2018).....	26
Figura 1.4. Figura representativa de um corte sagital do tronco encefálico de rato (ponte e bulbo). Em destaque, os principais núcleos bulbares e pontinhos que participam do controle neural da respiração (adaptado de Zoccal e cols., 2009).....	32
Figura 1.5. Visão esquemática da rede respiratória dividida em cinco componentes principais (adaptado de Greer & Funk, 2016).....	33
Figura 1.6. Visão esquemática da quimiorrecepção no corpo carotídeo, sua localização e as projeções centrais (adaptado de Greer & Funk, 2016).....	35
Figura 3.1. (A) Linha do tempo geral referente ao protocolo experimental 1. (B) linha do tempo do experimento 1.....	56
Figura 3.2. Linha do tempo geral referente ao protocolo experimental 2.....	57
Figura 4.1. Localizações anatômicas das microinjeções. (A) Fotomicrografia de uma secção coronal do encéfalo de um animal do grupo NPLA 0,4, mostrando a localização da microinjeção. (B) Representação esquemática dos locais de microinjeção.....	60

Figura 4.2. Curva da temperatura abdominal (A) e temperatura abdominal mínima (B) e máxima (C) dos animais dos grupos veículo, NPLA 0,04 e NPLA 0,4 submetidos ao teste de exercício progressivo.....	62
Figura 4.3. (A) Curva da temperatura da pele da cauda, (B) temperatura da pele da cauda inicial, (C) mínima e (D) máxima.....	63
Figura 4.4. Relação da temperatura abdominal com a temperatura da pele da cauda (A), limiar térmico para dissipação de calor (B) e sensibilidade para dissipação de calor (C) durante o exercício progressivo.....	65
Figura 4.5. Acúmulo de calor (A) e eficiência térmica (B) durante o exercício progressivo em animais do grupo veículo, NPLA 0,04 e NPLA 0,4.....	66
Figura 4.6. Tempo máximo de corrida (A) e velocidade máxima atingida (B) no teste de exercício progressivo em animais veículo, NPLA 0,04 e NPLA 0,4.....	67
Figura 4.7. Efeito da microinjeção no trabalho (J) no teste de exercício progressivo de animais veículo, NPLA 0,04 e NPLA 0,4.....	68
Figura 4.8. Localizações anatômicas das microinjeções. (A) Fotomicrografia de uma secção coronal do encéfalo de um animal do grupo NPLA, mostrando a localização da microinjeção. (B) Representação esquemática dos locais de microinjeção.....	70
Figura 4.9. Traçado representativo retirado do <i>LabChart</i> de um animal do grupo veículo (A) e um animal do grupo NPLA (B) em normóxia e hipóxia.....	71
Figura 4.10. Efeito da inibição seletiva da nNOS com NPLA na FR (A), V_T (B) e $\dot{V}E$ (C) durante a exposição à hipóxia (7% O_2).....	72
Figura 4.11. Efeito da microinjeção de NPLA no PVN no $\dot{V}O_2$ (A) e equivalente ventilatório $\dot{V}E/\dot{V}O_2$ (B).....	73
Figura 4.12. Efeito da inibição seletiva da nNOS no PVN na frequência dos suspiros (A) e no volume do suspiro (B).....	74

Figura 4.13. Efeito da inibição seletiva de nNOS no PVN na temperatura durante a exposição à hipóxia. Em A, a temperatura no momento da coleta da ventilação. Em B, a dinâmica da temperatura em cada 5 minutos.....76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APO	Área pré-óptica
ANOVA	Análise de variância
BötC	Complexo de Bötzinger
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
CO ₂	Dióxido de Carbono
DMH	Núcleo dorsomedial do hipotálamo
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EPM	Erro padrão da média
FR	Frequência respiratória
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
H _{SEN}	Sensibilidade para a dissipação de calor
H _{THR}	Limiar térmico para a dissipação de calor
ICV	Intracerebroventricular
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
L-NAME	L-NG-nitro-arginina metil éster
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NPLA	Nw-Propyl-L-Arginina
NTS	Núcleo do trato solitário
O ₂	Oxigênio
PaO ₂	Pressão parcial de oxigênio arterial
preBötC	Complexo pré-Bötzinger
PVN	Núcleo paraventricular do hipotálamo
RVLM	Região rostral ventrolateral do bulbo
SNC	Sistema Nervoso Central
T _{abd}	Temperatura corporal interna
T _{cauda}	Temperatura da pele da cauda
\dot{V}_E	Ventilação pulmonar
V _{MÁX}	Velocidade máxima

$\dot{V}O_2$ Consumo de oxigênio

V_T Volume corrente

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1. Controle da temperatura corporal.....	18
1.1.1. Conceitos gerais.....	18
1.1.2. Mecanismos de ganho e perda de calor.....	19
1.1.3. Organização funcional do sistema termorregulador.....	20
1.2. Termorregulação durante o exercício físico.....	24
1.2.1. Modulação nitrérgica no PVN e o exercício físico.....	27
1.3. Hipóxia.....	29
1.3.1. Organização básica do sistema de controle respiratório.....	30
1.3.2. Quimiorreflexo periférico e hipóxia.....	34
1.3.3. Participação de centros hipotalâmicos nas respostas ventilatórias.....	35
1.3.4. Participação do PVN na resposta ventilatória à hipóxia.....	38
1.4. Anapirexia.....	40
1.4.1. Controle da temperatura corporal na anapirexia.....	41
2. OBJETIVOS.....	44
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
3.1. Animais experimentais.....	45
3.2. Procedimentos cirúrgicos.....	46
3.3 Droga.....	48
3.4 Microinjeção bilateral no PVN.....	48
3.5 Familiarização à esteira rolante.....	49
3.6 Protocolo de exercício progressivo.....	50
3.7. Protocolo de exposição à hipóxia.....	50
3.8. Medida de ventilação pulmonar.....	50
3.9. Medidas de consumo de oxigênio.....	52
3.10. Medidas da temperatura abdominal e temperatura da cauda.....	52
3.11. Variáveis calculadas.....	53
3.12. Eutanásia.....	54
3.13. Histologia.....	54

3.14. Delineamentos experimentais.....	55
3.14.1. Protocolo experimental 1: respostas térmicas ao exercício.....	55
3.14.2. Protocolo experimental 2: respostas ventilatórias e térmicas à hipóxia.....	56
3.15. Análise estatística.....	58
4. RESULTADOS.....	59
4.1. Resultados do protocolo experimental 1.....	59
4.1.1. Anatomia.....	59
4.1.2. Temperatura abdominal.....	61
4.1.3. Temperatura da pele da cauda.....	61
4.1.4. Limiar para dissipação de calor e sensibilidade para dissipação de calor.....	64
4.1.5. Acúmulo de calor e eficiência térmica.....	64
4.1.6. Tempo de corrida e velocidade máxima atingida.....	67
4.1.7. Trabalho.....	68
4.2. Resultados do protocolo experimental 2.....	69
4.2.1. Anatomia.....	69
4.2.2. Análise da ventilação.....	71
4.2.3. Análise da temperatura.....	75
5. DISCUSSÃO.....	78
5.1. Termorregulação no exercício progressivo.....	78
5.2. Hipóxia.....	84
6. CONCLUSÃO.....	90
6.1. Termorregulação no exercício progressivo.....	90
6.2. Hipóxia.....	90
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91

1. INTRODUÇÃO

1.1 Controle da Temperatura Corporal

1.1.1. Conceitos gerais

Manter a temperatura corporal interna em limites estreitos é de extrema importância para a homeostasia do organismo. Desvios na temperatura corporal, como seu aumento ou diminuição exacerbados, alteram propriedades moleculares, incluindo a diminuição da eficácia enzimática, que culmina na redução crítica das funções celulares (Morrison & Nakamura, 2011). A termorregulação, portanto, é um importante mecanismo de controle da homeostase. Diante disso, os vertebrados têm sistemas ou mecanismos termorreguladores diferentes, que podem ser denominadas de ectotermia e endotermia. Esses termos classificam os animais pelos mecanismos fisiológicos que determinam a sua temperatura corporal interna.

A ectotermia é uma característica de peixes, anfíbios e répteis. Os animais ectotérmicos são caracterizados pela determinação da temperatura corporal pela temperatura ambiente, ou seja, eles tendem a manter a temperatura corporal igual ou muito próxima à temperatura ambiente. Esses animais têm uma taxa metabólica padrão baixa, e ajustam suas temperaturas essencialmente por mecanismos comportamentais (Bicego *et al.*, 2007a; Tan & Knight, 2018a). Aves e mamíferos estão no grupo de animais endotérmicos. A endotermia é caracterizada pela manutenção da temperatura corporal constante, independente das mudanças na temperatura ambiente (Bicego *et al.*, 2007a; Morrison & Nakamura, 2011; Tan & Knight, 2018a). Para animais endotérmicos, a manutenção da temperatura interna é alcançada por diferentes vias e mecanismos tanto para ganho quanto para a perda de calor.

1.1.2. Mecanismos de ganho e perda de calor

Em ratos, os mecanismos de controle termorregulador consistem em ações integrativas que regulam as taxas de produção e dissipação de calor (Kiyatkin, 2007; Romanovsky, 2007). Esses mecanismos são autonômicos ou comportamentais, e a temperatura interna a variável regulada por esse sistema (Gordon, 1990; Romanovsky, 2007). Dentre os mecanismos autonômicos, pode-se citar a vasodilatação da cauda como via de dissipação de calor; e a termogênese associada ao tremor e o metabolismo do tecido adiposo marrom, como vias de ganho de calor (Gordon, 1990). Em situações de exposição ao calor ou ao frio, essas vias são rapidamente ativadas para proteger o corpo de mudanças na temperatura interna (Tan & Knight, 2018a) (Figura 1.1). As estratégias comportamentais para termorregulação podem variar entre as diferentes espécies. Em roedores, as principais estratégias consistem na dispersão de saliva pelo corpo como estratégia de resfriamento por evaporação; na seleção do ambiente com conforto térmico; e na escolha da posição corporal com maior ou menor superfície exposta ao ambiente (Gordon, 1990; Nagashima *et al.*, 2000; Romanovsky *et al.*, 2002a, 2009; Romanovsky, 2007; Almeida *et al.*, 2015; Wanner *et al.*, 2017) (Figura 1.1).

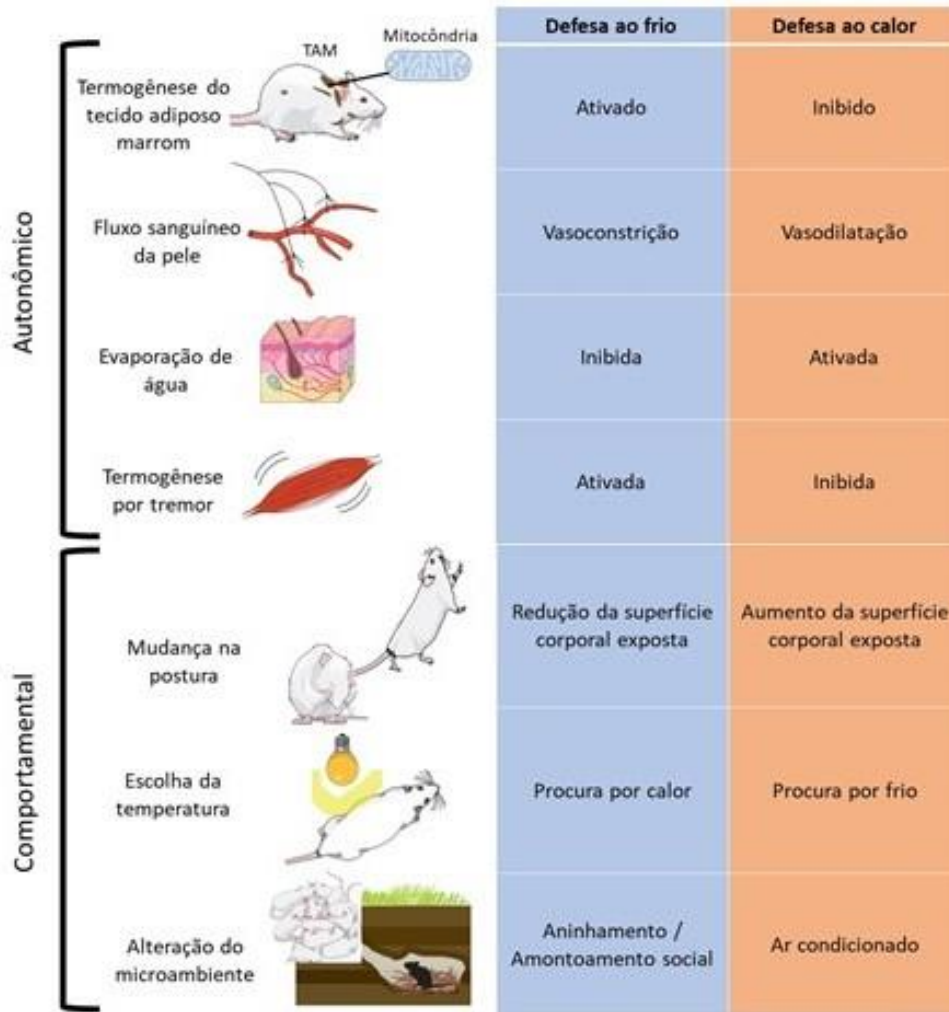


Figura 1.1. Efeitos termorreguladores. Exemplos de estratégias autônômicas e comportamentais para controle da temperatura corporal (figura adaptada de Tan & Knight, 2018).

1.1.3. Organização funcional do sistema termorregulador

A organização funcional do sistema termorregulador é um tema constantemente debatido na literatura. Era descrito como sendo controlado por único centro controlador ou um único “*set point*” (Werner, 1980). O modelo atual, por sua vez, sugere o sistema termorregulador como uma associação de alças efetoras relativamente independentes (Boulant, 2006; Romanovsky, 2007; Romanovsky *et al.*, 2009; Tan & Knight, 2018b). Cada alça termoefetora inclui uma única via neural que controla a resposta efetora correspondente (Nagashima *et al.*, 2000; Morrison *et al.*, 2008).

Diante disso, um complexo sistema neural está envolvido na termorregulação para controlar refinadamente as vias de ganho e perda de calor. Dessa forma, a organização funcional do sistema termorregulador, atua com base em vias aferentes sensoriais, um centro integrador, e vias eferentes termoeffetoras, como mostrado na figura 1.2 (Morrison & Nakamura, 2011).

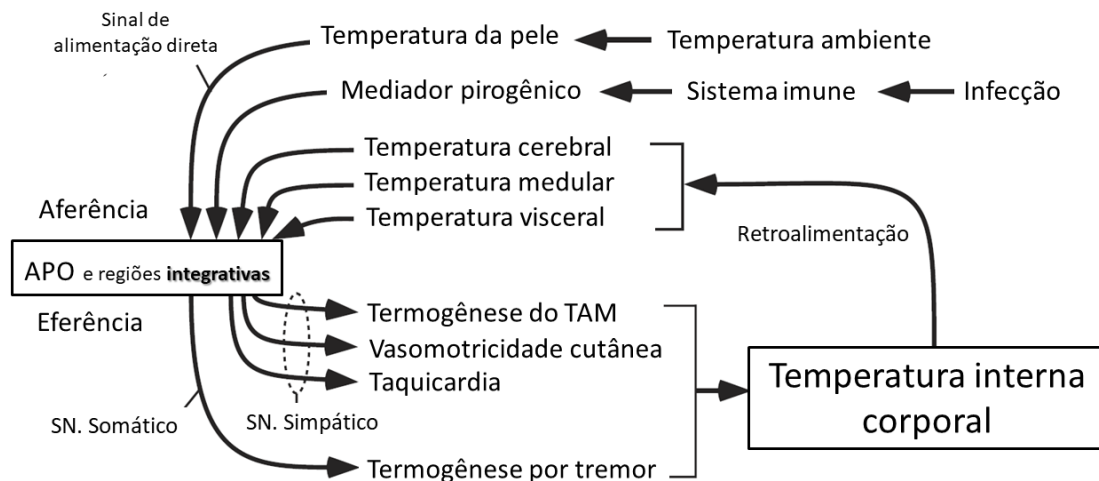


Figura 1.2. Esquema conceitual do sistema de termorregulação. Sinais sensoriais térmicos são monitorados por termorreceptores na pele e órgãos, e por mediadores pirogênicos. Essas aferências são enviadas para regiões integrativas como a APO e outras regiões hipotalâmicas responsáveis pela integração sensorio-motora da termorregulação. Essas regiões fornecem sinais de comando para os efetores periféricos através de eferentes neurais e neuroendócrinos para efetuar a resposta termorreguladora. (figura adaptada de Morrison & Nakamura, 2011).

Por meio de retroalimentação negativa, cada alça termoeffetora utiliza informações aferentes a partir da variável controlada pelo sistema: a temperatura interna. Por sua vez, existe outra variável auxiliar, a temperatura da pele, que funciona por retroalimentação positiva e negativa (Romanovsky, 2014). O uso da variável auxiliar permite um controle mais estável da temperatura interna, a variável de controle. Dessa forma as respostas termorreguladoras ocorrem de maneira mais rápida e eficiente em resposta às alterações da temperatura ambiente.

Dentro desse modelo teórico de organização funcional do sistema termorregulador, um neurônio termossensível não codifica sua temperatura local em sinais frequentes com a

temperatura exata, tempo a tempo, e sim por meio de um sinal elétrico gerado quando a temperatura local atinge o limiar de despolarização desse termorreceptor. Este sinal se espalha pela via neural acima descrita para conduzir posteriormente uma resposta efetora (Kobayashi, 1989; Okazawa *et al.*, 2002).

Embora os termofetores tenham um controle independente da temperatura corporal, o controle homeostático da mesma, portanto, depende dos centros integradores centrais, principalmente a área pré-óptica (APO). As informações térmicas captadas pelos termossensores da pele, vísceras e sistema nervoso central (SNC) compõe a etapa de aferência da termorregulação. Estes sinais das aferências periféricas são transmitidos pela medula espinhal para os centros termorreguladores, sendo o principal a APO, onde as informações térmicas são integradas e a temperatura interna assim, regulada por meio das vias eferentes (Boulant, 2000; Romanovsky *et al.*, 2009; Morrison & Nakamura, 2011; Tan & Knight, 2018b).

Os neurônios da APO também estão conectados com outras áreas hipotalâmicas. Estes neurônios emitem importantes projeções neurais para o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) (Nagashima, 2006; Romanovsky, 2007). O PVN é um importante núcleo integrativo dos controles cardiovasculares (Sawchenko & Swanson, 1982; Patel & Zheng, 2012) e possui neurônios termossíveis (Palkovits & Bratincsá, 2004; Cham *et al.*, 2006) que atuam no controle termorregulador. O PVN compreende duas porções de neurônios distintos. Os neurônios parvocelulares pré-autonômicos são moduladores do sistema nervoso simpático (Ranson *et al.*, 1998), e os neurônios magnocelulares são responsáveis pela modulação neuroendócrina na produção de ocitocina e vasopressina (Kuypers & Maisky, 1975; Swanson & Kuypers, 1980; Busnardo *et al.*, 2007).

Dentre esses neurônios, sabe-se que o PVN possui neurônios termossensíveis (Inenaga *et al.*, 1987). Além disso, a via termorreguladora do PVN emite projeções diretas para a coluna

intermédio lateral da medula espinhal (Cham *et al.*, 2006), onde modula a atividade simpática de órgãos efetores termorreguladores, como tecido adiposo marrom, a glândula salivar e o leito vascular cutâneo da cauda de ratos (Smith *et al.*, 1998; Cham & Badoer, 2008; Madden & Morrison, 2009; Leite *et al.*, 2012).

Outros núcleos hipotalâmicos, como o núcleo supra-óptico (SON) (Takahashi *et al.*, 2001b, 2001a) e o núcleo dorsomedial do hipotálamo (DMH) (Maruyama *et al.*, 2003; de Git *et al.*, 2018; Piñol *et al.*, 2018; Mota *et al.*, 2020) também são regiões importantes para o controle da temperatura corporal. Em resposta à estímulos relacionados à mudança osmótica e o balanço geral dos fluídos (Takahashi *et al.*, 2001a), o SON tem a função primária de secretar hormônios osmorregulatórios. Entretanto, é observado um aumento da temperatura corporal quando realizada microdiálise de neostigmina (inibidor de acetilcolinesterase) no SON de ratos acordados. A estimulação colinérgica provocada com o aumento da concentração extracelular de acetilcolina resultou em um aumento dose-dependente da temperatura corporal dos animais, mas não alterou a ingestão de água (Takahashi *et al.*, 2001b). Além disso, foi demonstrado que a estimulação elétrica do SON em ratos anestesiados, resulta em um aumento da temperatura do tecido adiposo marrom (Holt *et al.*, 1987). Um rápido aumento da temperatura do tecido adiposo marrom e da temperatura abdominal pode ser observado após a microinjeção de glutamato no SON de ratos anestesiados. Esse efeito foi bloqueado quando houve inibição da transmissão simpática pelo propranolol (Amir & De Blasio, 1991). Outro importante núcleo hipotalâmico envolvido na termorregulação é o DMH. Lesões eletrolíticas neste núcleo provocam atenuação da resposta hipotérmica ao choque por LPS modificando as respostas térmicas comportamentais (Wanner *et al.*, 2017). Ratos anestesiados que receberam microinjeções de bicuculina, um antagonista GABA no DMH, tiveram um aumento acentuado e rápido da atividade autonômica simpática do tecido adiposo marrom e da temperatura desse tecido (Cao *et al.*, 2004) que precederam um aumento da temperatura corporal (Zaretskaia *et*

al., 2002). Também foi observado que a ativação aguda do receptor BRS3 (receptor tipo bombesina 3), um receptor órfão acoplado à proteína G que regula a homeostase energética e a frequência cardíaca, aumentou a temperatura corporal e a temperatura do tecido adiposo marrom em camundongos. Já a inibição desse receptor no DMH, diminuiu a temperatura interna (Piñol *et al.*, 2018).

1.2. Termorregulação durante o exercício físico

O exercício físico é uma condição que impõe grande desafio ao sistema termorregulador e à homeostase do organismo. Parte da energia química requerida para a contração muscular é convertida em trabalho mecânico, enquanto a maior parcela (~70-80%) é convertida em calor (Brooks *et al.*, 1984; Coyle, 2000). Desta maneira, a taxa de produção de calor aumenta proporcionalmente à intensidade do exercício, resultando em um processo de hipertermia. Em função disso, uma resposta por feedback é iniciada, como exemplo, o aumento nas taxas de dissipação de calor (Galloway & Maughan, 1997).

Em roedores, a vasodilatação cutânea da cauda exerce importante papel na dissipação de calor durante a corrida. A cauda de roedores por não conter pelos, por possuir densa vascularização e anastomoses arteriovenosas, e por ser caracterizada por alta razão entre área de superfície e volume, é a principal estrutura de dissipação de calor durante o exercício (Romanovsky *et al.*, 2002b). Sendo assim, a resposta à hipertermia provocada pelo exercício é um aumento na temperatura da cauda. Apesar da evaporação de água a partir da dispersão de saliva pelo corpo também ser uma importante via de dissipação (Tanaka *et al.*, 1988), sua avaliação em ambiente experimental é limitada, pois a realização do exercício impossibilita tal comportamento (Wilson *et al.*, 1978).

O estudo da termorregulação durante o exercício constitui um importante modelo para entendimento dos componentes do sistema de controle da temperatura, uma vez que a hipertermia induzida pelo exercício é um fator determinante no desempenho, podendo levar à fadiga e interrupção do mesmo (Cordeiro *et al.*, 2017). O comportamento termorregulador no exercício com velocidade constante apresenta uma fase dinâmica e uma fase estável (Lacerda *et al.*, 2005; Wanner *et al.*, 2015b) (Figura 1.3a). A fase dinâmica é caracterizada no início do exercício, quando a temperatura interna sobe de forma abrupta, onde ainda não há equilíbrio entre a produção e dissipação de calor (Briese, 1998). Há um aumento rápido da taxa metabólica (variável primária) para atender a demanda de energia para as contrações musculares (Soares *et al.*, 2003), associado a vasoconstrição periférica mediada pelo sistema nervoso simpático, o que reduz a dissipação cutânea de calor. Após alguns minutos do exercício com carga constante e com o aumento da temperatura interna, o limiar térmico para a vasodilatação da cauda é atingido, causando a vasodilatação da cauda e o consequente aumento da dissipação de calor. Como consequência, há atenuação da velocidade de aumento da temperatura interna, caracterizando a fase estável (Hartley *et al.*, 1972; McAllister *et al.*, 1995).

Já o exercício com aumento progressivo da velocidade tende a apresentar aumento rápido e constante da temperatura interna corporal, acompanhando o aumento do consumo de oxigênio, até a interrupção do exercício (Wanner *et al.*, 2015b)(Figura 1.3b). Apesar da dissipação de calor pela pele da cauda, a temperatura interna ainda aumenta em função do aumento da intensidade do exercício (Balthazar *et al.*, 2009), sendo menos evidente nesse exercício a fase estável da temperatura interna.

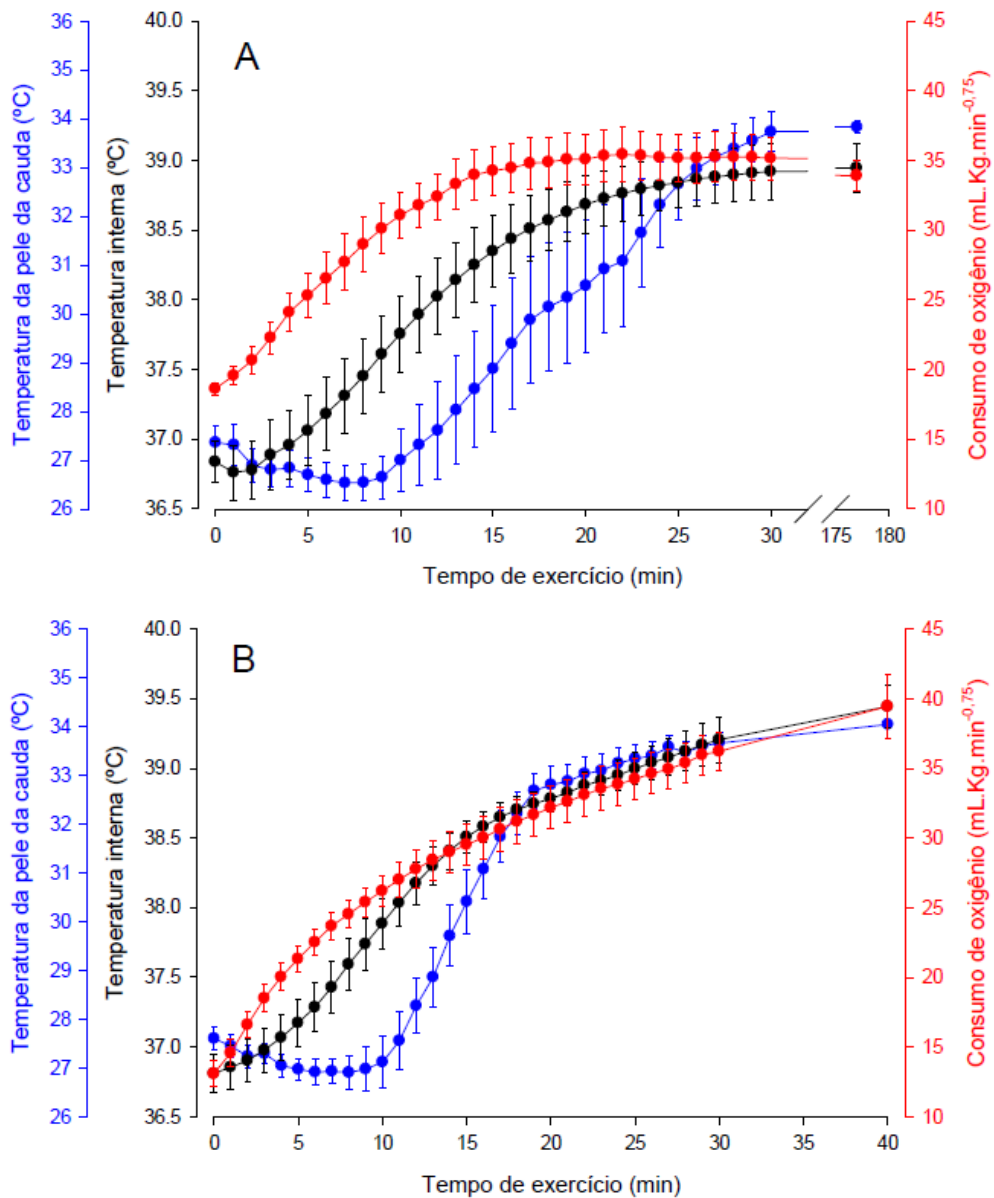


Figura 1.3. Termorregulação em ratos durante a corrida em esteira rolante. Dinâmica da temperatura interna (símbolo preto), temperatura da pele da cauda (símbolo azul; usado como um índice da dissipação de calor) e do consumo de oxigênio (símbolo vermelho, usado como um índice da produção de calor) durante o exercício com intensidade constante (figura A: 60% da velocidade máxima de corrida) e exercício com aumentos progressivos da intensidade (figura B: velocidade inicial de $10 \text{ m} \cdot \text{min}^{-1}$ e aumentos de $1 \text{ m} \cdot \text{min}^{-1}$ a cada 3 minutos) (figura retirada da tese de Drummond. LR, 2018).

1.2.1. Modulação nitrérgica no PVN e o exercício físico

Alguns mecanismos que atuam no hipotálamo regulando as alças de feedback da termorregulação, ou seja, as vias efetoras que promovem a dissipação de calor durante o exercício (vasodilatação da cauda) têm sido exploradas. Destaca-se, nesse contexto as evidências dos efeitos do óxido nítrico (NO) central na termorregulação durante o exercício (Lacerda *et al.*, 2005, 2006; Lima *et al.*, 2014)(Lacerda *et al.*, 2005, 2006; Lima *et al.*, 2014; Wanner *et al.*, 2015a).

O NO é um radical livre gasoso e age como molécula mensageira com diversos papéis fisiológicos. Por ter funções biológicas importantes e diversas, foi amplamente estudada nas últimas décadas, e em 1998, Robert Furchgott, Louis Ignarro e Ferid Murad receberam o prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina por seus trabalhos envolvendo esta molécula (Calabrese *et al.*, 2007). A produção do NO é catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) na conversão de L-arginina em L-citrulina. A partir da ativação da guanilato ciclase solúvel, e o consequente aumento dos níveis do mediador cíclico intracelular GMP (cGMP), o NO exerce a maior parte das suas funções nos tecidos, incluindo o sistema nervoso central (SNC) (Moncada *et al.*, 1991; Dawson & Snyder, 1994; Traystman *et al.*, 1995).

As enzimas NOS são classificadas como constitutivas, que requerem a formação do complexo Ca^{2+} -calmodulina para sua ativação, e induzível, que exerce sua função independentemente de Ca^{2+} (Bredt, 1999). As isoformas endotelial (eNOS) e a neuronal (nNOS) são constitutivas e se expressam respectivamente em células endoteliais vasculares e células do sistema nervoso central e periférico. A isoforma induzível (iNOS) torna-se expressa, em resposta à citocinas e pirógenos externos, em macrófagos e outros tipos celulares nucleados (Bredt *et al.*, 1991).

No sistema vascular, a produção do NO nas células endoteliais controla o relaxamento vascular, agindo sobre as células da musculatura lisa vascular (Huang, 1999). No sistema nervoso central, o NO é um transmissor gasoso que atua por mecanismos dependentes de GMPc (Guix *et al.*, 2005). Foi demonstrado que o NO atua em várias funções no SNC, como no desenvolvimento neural (Cheng *et al.*, 2003) e plasticidade sináptica (Dinerman *et al.*, 1994), na percepção da dor (Yamamoto *et al.*, 1993) e no controle do sono, apetite e temperatura corporal (Monti & Jantos, 2004).

No PVN, o NO atua como um modulador do disparo autonômico simpático, dependente do estímulo (Zhang *et al.*, 1997c; Leite *et al.*, 2012; Busnardo *et al.*, 2013; Raquel *et al.*, 2018; Busnardo *et al.*, 2019) mediando dessa forma, as respostas autonômicas cardiorrespiratórias, e inclusive, termorreguladoras (Monda *et al.*, 1995; Zhang & Patel, 1998). Os efeitos do NO central na termorregulação durante o exercício também foram demonstrados (Lacerda *et al.*, 2005, 2006; Lima *et al.*, 2014; Wanner *et al.*, 2015b). A inibição não seletiva das NOS com injeção de L-NAME no ventrículo cerebral lateral, diminui a dissipação de calor aumentando assim o acúmulo de calor em ratos durante o exercício (Lacerda *et al.*, 2005, 2006). Em contrapartida, a injeção intracerebroventricular de L-arginina, doador de NO, aumenta a dissipação de calor, atenuando o aumento da temperatura interna e melhorando a tolerância ao exercício em ratos (Wanner *et al.*, 2015a). Nesses estudos foram realizadas microinjeções intracerebroventriculares, ou seja, as manipulações experimentais (injeção de fármacos) ocorreram sem especificidade do local de ação. Mesmo assim, indicam que o NO central aumenta a dissipação de calor, evitando o aumento da temperatura durante a realização do exercício.

Considerando as variáveis e evidências já descritas na literatura, pouco se conhece a respeito da modulação nitrérgica no PVN no controle termorregulador durante o exercício. De

acordo com estudos recentes, é importante considerar que: 1º) o PVN tem conexão direta com a APO (Nagashima, 2006; Romanovsky, 2007); 2º) o PVN emite projeções para a coluna intermédia lateral da medula, principal sitio de efluxo simpático (Cham *et al.*, 2006); 3º) quantidade significativa de NOS é expressa no PVN, e os neurônios que se projetam para a medula produzem NO (Cham *et al.*, 2006); 4º) a inibição do NOS pelo L-NAME causa alterações na termorregulação em ratos durante o exercício (Lima *et al.*, 2014); 5º) o PVN contém neurônios sensíveis à temperatura (Inenaga *et al.*, 1987). Dessa forma, relacionado à termorregulação, o presente estudo propõe que a inibição da atividade do nNOS no PVN, reduzindo a produção endógena de NO, afetaria a resposta termorreguladora durante o exercício, com aumento exacerbado da temperatura interna e diminuição da vasodilatação da cauda e da dissipação de calor, diminuindo assim a tolerância dos animais ao exercício.

1.3.Hipóxia

O suprimento de oxigênio (O₂) aos tecidos é um processo complexo e fundamental, uma vez que havendo déficits transitórios deste suprimento, danos celulares irreversíveis podem ocorrer, como a necrose celular e tecidual (López-Barneo *et al.*, 2001). Uma variedade de espécies passa por períodos em altas altitudes ou dentro de tocas fechadas, situações onde há a redução da taxa metabólica equilibrando-se a oferta e a demanda de O₂. Outras espécies experimentam a hipóxia em estados patológicos, como por exemplo em doenças pulmonares e síndromes de apneia e/ou hipoventilação. A redução da disponibilidade de O₂ provoca respostas fisiológicas, como a hiperventilação e a diminuição regulada da temperatura interna corporal (anapirexia) (Gellhorn & Janus, 1936; Cross *et al.*, 1958; Hill, 1959; Wood & Malvin, 1991; Wood, 1991; Wood & Gonzales, 1996; Steiner & Branco, 2002).

1.3.1. Organização básica do sistema de controle respiratório

A ventilação pulmonar, como um processo de convecção, é aparentemente simples pois consiste na movimentação do ar para dentro e para fora dos pulmões de maneira rítmica, a fim de regular os níveis de oxigênio e dióxido de carbono do organismo. Entretanto, o sistema de controle neural por detrás desse processo é extremamente robusto e complexo. Os centros de controle respiratório estão localizados no tronco encefálico, especificamente na ponte e no bulbo. Estes, contém grupamentos neurais com propriedades eletrofisiológicas distintas, que a partir de contatos sinápticos mútuos controlam de maneira precisa o padrão e o ritmo de contração da musculatura respiratória (Smith *et al.*, 2013). São três os grupamentos respiratórios bulbares, denominados de coluna respiratória ventral (CRV), grupamento respiratório dorsal (GRD) e grupamento respiratório parafacial (pFRG), e um pontinho, denominado grupo respiratório pontinho (GRP).

Após anos de estudos sistematizados, resultados evidenciaram que a geração do padrão respiratório basal ocorre primariamente na região do CRV. A CRV é uma coluna de neurônios bulbares localizados bilateralmente na região ventral do bulbo, e que se estende do núcleo do nervo facial até a medula espinal. Esta é subdividida funcionalmente em 4 grupamentos distintos. Especificamente, de rostral a caudal, estão: 1) o complexo de Bötzinger (BötC), que contém interneurônios expiratórios; 2) o complexo pré-Bötzinger (preBötC), região que contém principalmente interneurônios inspiratórios, e é a fonte do ritmo inspiratório básico (Smith *et al.*, 1991, 2013; Feldman & Del Negro, 2006; Cui *et al.*, 2016; Del Negro *et al.*, 2018); 3) o grupo respiratório ventral rostral (rVRG), contendo principalmente neurônios bulbo-espinhais inspiratórios; e 4) o grupo respiratório ventral caudal (cVRG) região que contém principalmente neurônios bulbo-espinhais expiratórios (Figura 1.4) (Bianchi *et al.*, 1995; Richter & Smith, 2014).

A respiração eupneica, aquela observada em condições de normóxia e normocapnia, é gerada a partir da rede neural descrita acima que determina a duração e a transição das fases de inspiração e expiração, bem como o padrão da atividade neuronal, coordenando a contração e relaxamento da musculatura respiratória. Isso se deve às propriedades eletrofisiológicas intrínsecas dos neurônios respiratórios especializados dessa região. Além disso, evidências recentes indicam a importante participação dos outros grupamentos respiratórios na geração da respiração, que tem conexão direta com as regiões da CRV. O GRP está localizado na região dorsolateral da ponte e inclui os núcleos parabraquial e Kolliker-Fuse. Esta é uma região importante para controle sinérgico da respiração com a deglutição, fala e tosse, além de ser essencial para a atividade pós-inspiratória. O GRD, que está localizado dentro do núcleo do trato solitário (NTS), é um importante sítio integrativo que recebe as aferências do quimio e mecanorreflexo, e o pFRG é o local considerado oscilador expiratório, responsável pela geração da expiração ativa (Smith *et al.*, 1991; Richter & Smith, 2014).

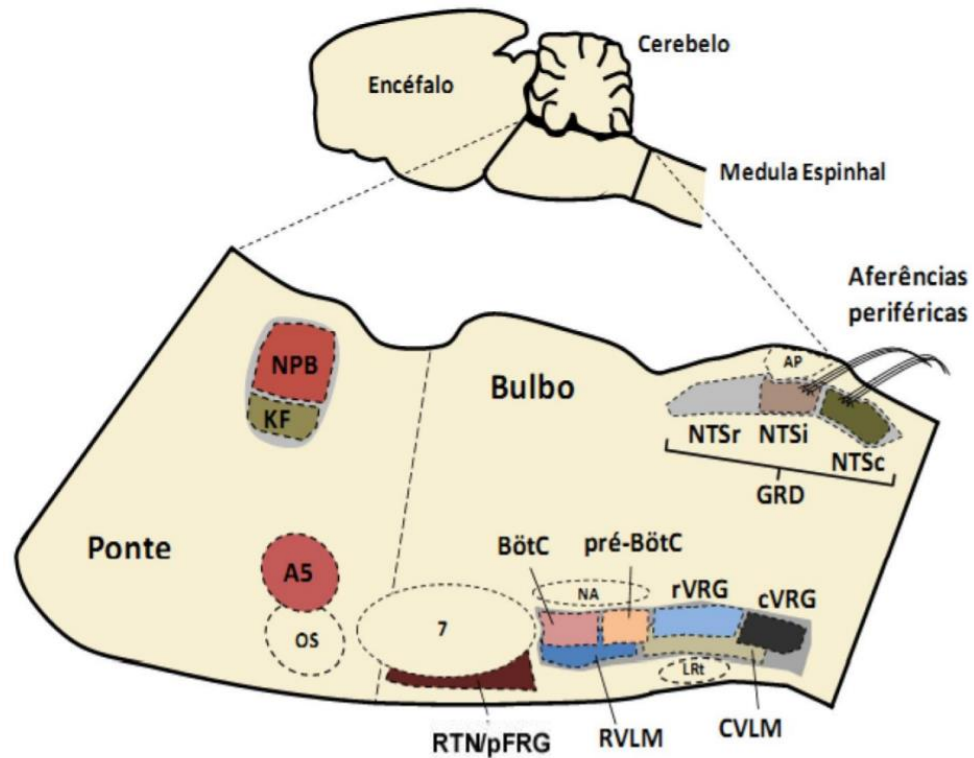


Figura 1.4. Figura representativa de um corte sagital do tronco encefálico de rato (ponte e bulbo). Em destaque, os principais núcleos bulbares e pontininhos que participam do controle neural da respiração. Abreviaturas: NPB: núcleo parabraquial; KF: Kolliker-Fuse; A5: área catecolaminérgica A5 da ponte; OS: oliva superior; 7: núcleo facial; RTN/pFRG: núcleo retrotrapezóide/região parafacial lateral; NA: núcleo ambíguo; BötC: complexo de Bötzinger; préBötC: complexo de pré-Bötzinger; rVRG: grupamento respiratório ventral rostral; cVRG: grupamento respiratório ventral caudal; RVLM: região rostral ventrolateral do bulbo; CVLM: região caudal ventrolateral do bulbo; LRt: núcleo reticular lateral; AP: área postrema; NTSr: porção rostral do núcleo do trato solitário; NTSi: porção intermediária do núcleo do trato solitário; NTSc: porção caudal do núcleo do trato solitário; GRD: grupo respiratório dorsal. (Adaptado de Zoccal e cols., 2009).

O controle fino da respiração, e inclusive a geração da respiração normal ou eupneica, requer informações de diversas áreas centrais e periféricas, como exemplo, as conexões sinápticas excitatórias e inibitórias advindas do GRP e do GRD, que são particularmente importantes para a integração sensório-motora do processo respiratório. Ademais, muitos estímulos e reflexos podem modular a atividade da CRV, como mecanorreflexo originário dos pulmões, caixa torácica e músculos, alterações cardiovasculares, quimiorreflexo central e periférico, e inclusive, modulações advindas de regiões superiores, como hipotálamo e áreas

corticais (Pfaff & Volkow, 2016; Ikeda *et al.*, 2017). O sistema de controle respiratório pode ser dividido funcionalmente, como mostra a figura 1.5.

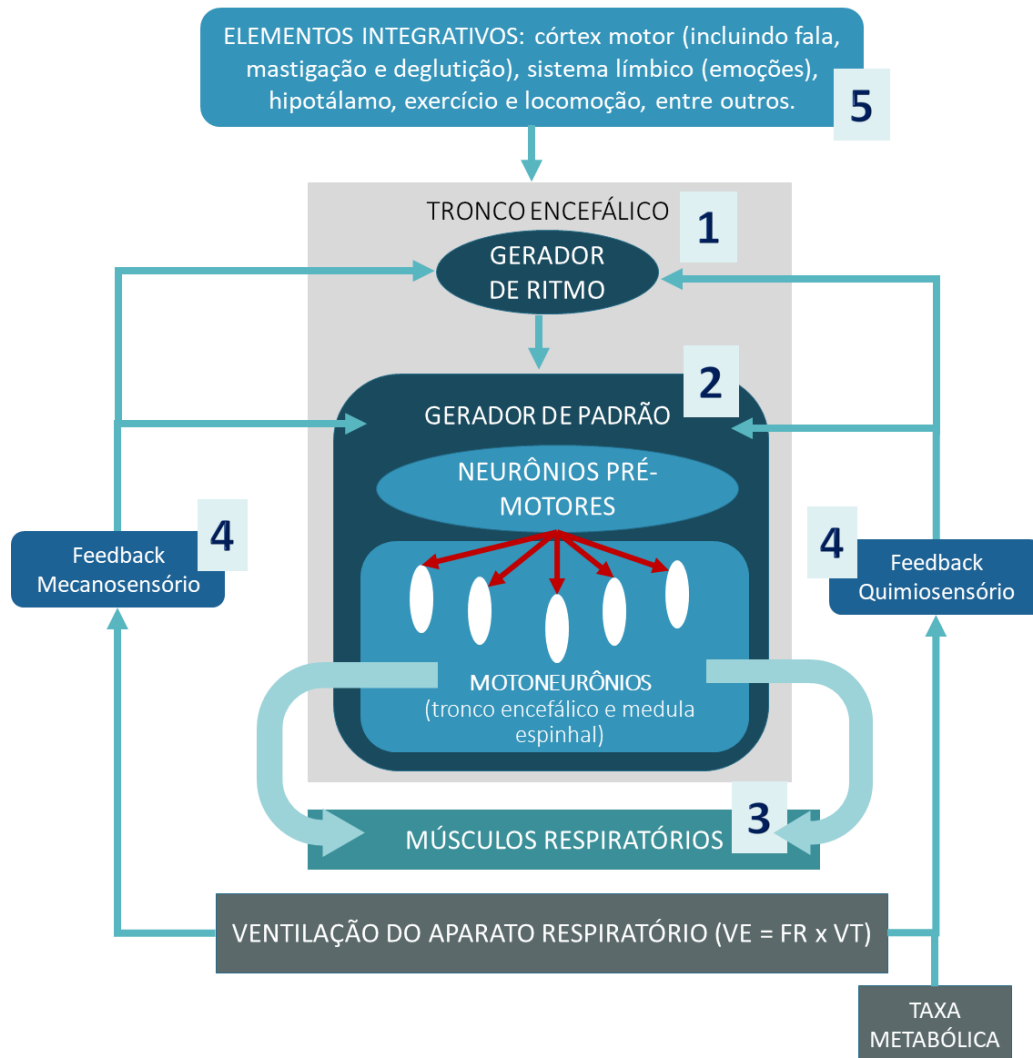


Figura 1.5. Visão esquemática da rede respiratória dividida em cinco componentes principais. O centro gerador de padrão é composto por microcircuitos que geram ritmo (1) e padrão (2), e estes são localizados no bulbo. Núcleos motores espinais e cranianos inervam o músculo diafragma e músculos acessórios da respiração, e a musculatura das vias aéreas (3). Mecanorreflexos (4) deflagrados pelos alvéolos e tecidos torácicos, e o quimiorreflexo (4) em resposta às trocas gasosas e ao pH sanguíneo compõe o feedback sensorial para o centro gerador de padrão. Elementos integrativos (5) compõe a rede respiratória como outros moduladores da respiração, e atuam diretamente no centro gerador de padrão. (Adaptado de Greer & Funk, 2016).

1.3.2. Quimiorreflexo periférico e hipóxia

Uma vez exposto à hipóxia (queda da pressão parcial de O₂ no ar inspirado e consequentemente no sangue arterial – PaO₂), o sistema de controle da ventilação responde com uma série de eventos. Essa sinalização para o sistema de controle da ventilação ocorre a partir de um reflexo químico deflagrado pelos quimiorreceptores periféricos que estão localizados bilateralmente na bifurcação das artérias carótidas e no arco aórtico (Pfaff & Volkow, 2016). A resposta ventilatória à hipóxia aguda é uma resposta reflexa clássica da aferência sensorial dos quimiorreceptores arteriais periféricos. Dentre os quimiorreceptores arteriais mais importantes para a maioria dos mamíferos, estão os corpos carotídeos, cujo estímulo é a PaO₂ (Teppema & Dahan, 2010; Cui *et al.*, 2012).

A sinalização ocorre a partir dos neurônios aferentes que partem do corpo carotídeo por um ramo do nervo glossofaríngeo, o nervo sinusal carotídeo. A sinapse primária no SNC ocorre no NTS (Housley & Sinclair, 1988), onde as informações do quimiorreflexo são integradas com outras informações sensoriais e de núcleos superiores do SNC. O NTS tem conexão com diversos outros núcleos superiores e com neurônios que compõem o sistema de controle neural respiratório, como exemplo, neurônios da CRV e GRP, que refinam a resposta quimiorreflexa. Uma vez integrado, as vias eferentes do quimiorreflexo induzem estimulação da musculatura respiratória, como o diafragma, a musculatura das vias aéreas superiores e músculos acessórios da inspiração e expiração (Smith *et al.*, 1993; Fregosi & Mitchell, 1994; Lee & Fuller, 2010) (Figura 6). Portanto, a resposta ventilatória aguda à hipóxia é caracterizada pelo aumento imediato da atividade ventilatória, com um aumento da FR e VT (Powell *et al.*, 1998).

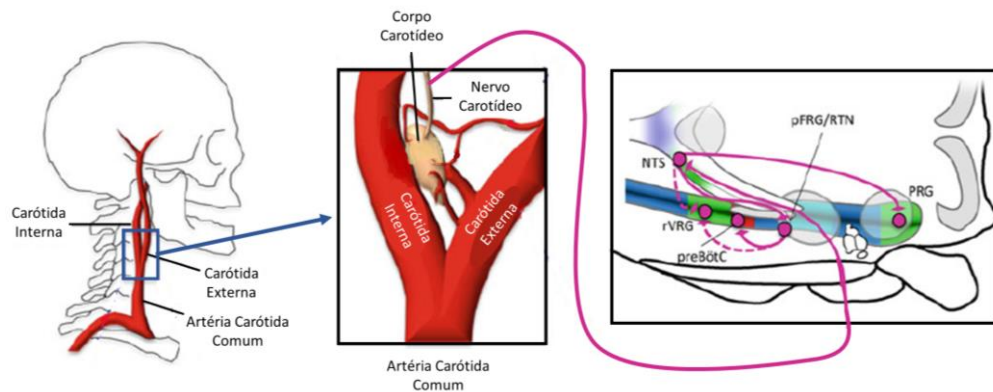


Figura 1.6. Visão esquemática da quimiorrecepção no corpo carotídeo, sua localização e as projeções centrais. Os corpos carotídeos estão localizados bilateralmente na bifurcação da artéria carótida comum. As projeções centrais das fibras aferentes do nervo carotídeo tem sua primeira sinapse excitatória no núcleo do trato solitário (NTS). Esses neurônios se projetam para o grupo respiratório pontinho (na imagem, GRP) e para neurônios quimiossensíveis no pFRG/RTN que, por sua vez, emitem projeções excitatórias para o complexo pré-Bötzing (preBötC) e possivelmente para outras regiões da CRV. (Adaptada de Greer & Funk, 2016).

1.3.3. Participação de centros hipotalâmicos nas respostas ventilatórias

O hipotálamo é uma região conhecida pela sua importante função na regulação da homeostase sistêmica. Entretanto essa região cerebral é responsável por outras funções proeminentes, como o controle do ciclo circadiano e o ciclo do sono e vigília (Willie *et al.*, 2001; Saper *et al.*, 2005), regulação neural cardiovascular (Dampney, 2016) e homeostase energética (Sakurai *et al.*, 1998), além de participar dos circuitos de controle da ventilação.

Os primeiros estudos que demonstraram a importância do hipotálamo no sistema de controle da ventilação, realizaram a remoção do diencéfalo, incluindo o hipotálamo, e observaram uma diminuição significativa da ventilação em gatos acordados (Fink *et al.*, 1962). Esses estudos corroboraram para o início do conhecimento do hipotálamo como uma importante região suprabulbar de controle respiratório (Fukushi *et al.*, 2019). Sabe-se que o hipotálamo participa da modulação da respiração em condições de hipercapnia, hipóxia e normóxia, na modulação da respiração no sono e na vigília, além de, em condições disfuncionais

hipotalâmicas, é observado padrões respiratórios anormais e síndromes hipoventilatórias (Fukushi *et al.*, 2019). Evidências mostraram a participação específica de regiões como o DMH, a área perifornical (PFA) e o PVN, como os principais núcleos hipotalâmicos envolvidos no controle respiratório (Berquin *et al.*, 2000; Kuwaki, 2010a; Fukushi *et al.*, 2019).

O DMH, já discutido anteriormente, possui conexões diretas com o NTS, RVLM e raphe pallidus (RH *et al.*, 1996; Sakurai *et al.*, 1998; Peyron *et al.*, 1998; Nambu *et al.*, 1999; Sarkar *et al.*, 2007; Kuwaki, 2010b), núcleos importantes para o controle ventilatório. McDowall e colaboradores (2007) microinjetaram bicuculina (antagonista de receptores GABA) no DMH de ratos anestesiados, e observaram uma resposta de aumento dose-dependente em sua atividade respiratória, indicando que a desinibição dos neurônios do DMH aumenta o *drive* respiratório central e induzem a hiperventilação (McDowall *et al.*, 2007). Outros estudos evidenciaram a importância desse núcleo como regulador das respostas autonômicas ao estresse e inclusive nas respostas ventilatórias a esses eventos (Suess *et al.*, 1980; Kabir *et al.*, 2010; Bondarenko *et al.*, 2014, 2015).

A PFA também é uma área interconectada com os centros do tronco encefálico envolvidos no controle respiratório, como o NTS, RVLM, Kolliker-Fuse, e núcleo parabraquial (Sakurai *et al.*, 1998; Peyron *et al.*, 1998; Nambu *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2005; Carrive & Gorissen, 2008; Kuwaki, 2010b). A estimulação elétrica do PFA aumentou a atividade respiratória em gatos anestesiados (Abrahams *et al.*, 1960) e a desinibição desses neurônios também aumentou a atividade respiratória em ratos anestesiados (Iigaya *et al.*, 2012). Além disso, o PFA possui extensa conexão com o DMH (Thompson *et al.*, 1996; Thompson & Swanson, 1998; Bondarenko *et al.*, 2015), o que é discutido como uma possível via reguladora da atividade autonômica e respiratória em resposta ao estresse. Estudos evidenciaram que o PFA, juntamente com o hipotálamo lateral (LH) são um sítio de quimiorrecepção central ao

CO₂/pH. Evidências de estudos *in vitro* mostraram que esses núcleos atuam de maneira dependente do estado sono/vigília por meio de neurônios orexinérgicos na quimiorrecepção central (Williams *et al.*, 2007). Já a realização de microdiálise focal de CO₂ no PFA/LH em ratos não anestesiados aumentou a ventilação dos animais em estado de vigília, mas não no sono, sugerindo que, além dessa região ser um importante sítio de quimiorrecepção central ao CO₂, sua atividade proeminente na modulação ventilatória ocorre em estado de vigília (Li *et al.*, 2013).

O PVN, além de possuir direta projeção para a medula espinhal, contém uma vasta população de neurônios conectados com regiões do tronco encefálico responsáveis pelo controle da ventilação (Geerling *et al.*, 2010), como o núcleo dorsal da rafe, pré-locus coeruleus, locus coeruleus, núcleo parabraquial, RTN, RVLM, núcleo ambíguo, neurônios A1, neurônios catecolaminérgicos caudais C1, e o NTS (Yeh *et al.*, 1997; Schlenker *et al.*, 2001; Kc *et al.*, 2002, 2010; Kc & Dick, 2010; Geerling *et al.*, 2010) Especificamente, neurônios vasopressinérgicos e ocitocinérgicos do PVN tem projeção direta para o preBötC (gerador do ritmo inspiratório) e para o núcleo do nervo frênico (Kc *et al.*, 2002). Estudos evidenciaram que o PVN desempenha um importante papel na respiração basal. A injeção de glutamato nesse núcleo aumentou a atividade eletromiográfica do diafragma em ratos anestesiados (Yeh *et al.*, 1997). Além disso, a estimulação elétrica do PVN aumenta a frequência respiratória de coelhos anestesiados (Duan *et al.*, 1997). A desinibição desse núcleo com bicuculina dobra a frequência respiratória e aumenta o volume corrente em ratos não anestesiados, sugerindo que o sistema GABAérgico suprime a atividade de controle respiratório do PVN (Schlenker *et al.*, 2001). Entretanto, o papel mais importante do PVN no contexto do controle ventilatório, é seu envolvimento na mediação das respostas ventilatórias à hipóxia.

1.3.4. Participação do PVN na resposta ventilatória à hipóxia

Após a detecção da hipóxia pelos corpos carotídeos, a primeira sinapse do quimiorreflexo no SNC ocorre no NTS, e a via clássica do quimiorreflexo, nas respostas cardiorrespiratórias, envolve projeções do NTS para o RVLM e para a CRV (Koshiya & Guyenet, 1996; Guyenet, 2006; Alheid *et al.*, 2011). Entretanto, o NTS também emite importantes projeções para o PVN (King *et al.*, 2012), e esta via é mais ativada na hipóxia aguda comparada via NTS-RVLM (King *et al.*, 2012). Estudos demonstraram que esse núcleo é responsável pela integração quimiossensorial dos sinais aferentes do NTS em gatos e ratos não anestesiados (Miller & Tenney, 1975; Schlenker *et al.*, 2001; Reddy *et al.*, 2005). Reddy e colaboradores (2005) realizaram microinjeções bilaterais no PVN em ratos anestesiados de lidocaína, um bloqueador rápido dos canais de sódio, ação que inibe a fase de despolarização da membrana neuronal, bloqueando a condução. Os autores observaram uma atenuação da atividade no nervo frênico em resposta à ativação dos quimiorreceptores periféricos, por meio de administrações de cianeto de potássio (KCN) (Reddy *et al.*, 2005). Outros estudos demonstraram a ocorrência de ativação de neurônios do PVN em ratos quando expostos a hipóxia aguda ou intermitente. Especificamente, neurônios catecolaminérgicos estão presentes na via do quimiorreflexo, e a minoria, GABAérgicos (King *et al.*, 2012, 2013; Silva *et al.*, 2016).

A ativação do PVN na hipóxia envolve neurônios neuroendócrinos vasopressinérgicos, ocitocinérgicos, e neurônios que produzem hormônios liberador de corticotrofina (CRH) (Coldren *et al.*, 2017; Oliveira Maruyama *et al.*, 2019). Apesar da atividade do sistema nervoso simpático estar aumentado na hipóxia (Murasato *et al.*, 1998), neurônios pré-simpáticos no PVN não são ativados na hipóxia moderada (10% O₂ por duas horas), o que sugere que a simpatoexcitação em resposta à esse estímulo é mediada por uma via quimiorreflexa que não inclui necessariamente os neurônios pré-simpáticos do PVN, e sim, neurônios neuroendócrinos

e suas projeções (Coldren *et al.*, 2017). Grande parte desses neurônios expressam nNOS e tem sua produção aumentada.

Como discutido anteriormente, o NO no PVN aparenta ter uma relação estreita com a liberação de GABA, que pode ter um efeito inibitório na atividade simpática, inclusive na modulação da respiração (Kuriyama & Ohkuma, 1995; Ohkuma *et al.*, 1995, 1996; Zhang & Patel, 1998). Huang e colaboradores (2007) demonstraram que a hipóxia intermitente crônica, que mimetiza a apneia obstrutiva do sono, regula para baixo a expressão de mRNA de nNOS e diminui a pós transcrição da proteína nNOS no PVN, sugerindo um potencial efeito do NO na simpatoexcitação em animais expostos à hipóxia intermitente crônica (Huang *et al.*, 2007). Já na exposição à hipóxia aguda, Coldren e colaboradores (2017) observaram que apesar de a hipóxia ativar neurônios nNOS em todo o PVN, somente neurônios corticotrofinérgicos que expressavam essa proteína estavam ativos na hipóxia aguda (Coldren *et al.*, 2017).

Considerando as evidências já descritas na literatura, ainda não se sabe se a modulação nitrérgica no PVN interfere diretamente na resposta ventilatória à hipóxia aguda. Portanto, tendo em vista que o PVN: 1º) tem conexão direta com centros respiratórios do tronco encefálico, como preBötC, RVLM, RTN, núcleo parabraquial e NTS (Yeh *et al.*, 1997; Kc *et al.*, 2002; Geerling *et al.*, 2010; King *et al.*, 2012); 2º) integra sinais aferentes do quimiorreflexo via NTS (King *et al.*, 2012; Ruyle *et al.*, 2019a); 3º) está ativo na exposição à hipóxia (King *et al.*, 2012, 2013; Coldren *et al.*, 2017); 4º) emite projeção direta para coluna intermédia lateral da medula (Ranson *et al.*, 1998; Cham *et al.*, 2006); 5º) tem projeção direta para o núcleo do nervo frênico (Mack *et al.*, 2002); 6º) modula a atividade simpática em respostas cardiorrespiratórias à hipóxia (Olivan *et al.*, 2001); 7º) expressa grande quantidade de nNOS (Coldren *et al.*, 2017); a hipótese desse estudo é que a inibição da atividade do nNOS no PVN

aumentará a resposta ventilatória à hipóxia, com aumento da frequência respiratória, volume corrente e ventilação pulmonar.

1.4. Anapirexia

Segundo o Glossário de Termos de Fisiologia Térmica (2001), a anapirexia é definida como uma redução regulada da temperatura corporal (IUPS Thermal Commission, 2001). Distinguindo-se da hipotermia, a anapirexia ocorre devido a uma indução de respostas termorreguladoras que culminam em queda da temperatura corporal, seja por ativação das vias de perda de calor, ou inibição dos mecanismos responsáveis pela conservação ou produção de calor (Gordon, 2001; Steiner *et al.*, 2002). Uma vez que a temperatura corporal tem um efeito marcante no consumo de oxigênio ($\dot{V}O_2$) de repouso, a hipertermia é prejudicial para animais hipóxicos (Wood, 1991). Dessa forma, a anapirexia é uma forma de proteção contra a baixa disponibilidade de oxigênio, predominantemente nos tecidos altamente sensíveis a hipoxemia, como o cérebro e o coração (Wood & Malvin, 1991; Wood, 1995; Palkovits & Bratinca, 2004).

É bem documentado que a redução da temperatura interna em animais ectotérmicos leva a uma redução do consumo de oxigênio (Wood & Malvin, 1991; Wood, 1991). Isso é importante na exposição à hipóxia. Uma vez que uma das respostas fisiológicas primordiais a esse processo é o aumento da ventilação, esse processo é acompanhado de um aumento na demanda de oxigênio pela musculatura respiratória. Entretanto, com a resposta da queda regulada da temperatura corporal na anapirexia, há uma redução na demanda metabólica de O_2 e, portanto, no consumo de oxigênio. Não é necessário um aumento tão grande na ventilação para suprir a demanda metabólica, portanto há uma diminuição das respostas energeticamente dispendiosas à exposição à hipóxia. Outro fator importante a ser observado, é que a redução na temperatura interna produz um desvio para a esquerda na curva de dissociação da hemoglobina, aumentando a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, melhorando a captação de oxigênio

pelos pulmões e otimizando o transporte gasoso em condições de hipóxia (Branco *et al.*, 1993; Steiner & Branco, 2002).

1.4.1. Controle da temperatura corporal na anapirexia

Previamente discutida, a termorregulação é um processo complexo que envolve termorreceptores, vias neurais aferentes, vários sítios integradores no SNC, inúmeras vias eferentes e órgãos efetores (Nagashima *et al.*, 2000; Romanovsky, 2007; Bicego *et al.*, 2007b; Morrison *et al.*, 2008; Tan & Knight, 2018a). Diante disto, a resposta da anapirexia é caracterizada como qualquer resposta termorreguladora na qual os efetores de produção de calor são alterados de forma regulada afim de permitir a diminuição intencional da temperatura, ainda podendo ser associada a um comportamento termorregulador apropriado, mais comumente a preferência por um ambiente frio (Bicego *et al.*, 2007b; Branco *et al.*, 2014).

Teorias indicam que a regulação hipotalâmica da temperatura corporal em hipóxia ativa mecanismos de perda de calor e reduzem a taxa metabólica. Gatos expostos concomitantemente à hipóxia e ao frio, tem redução das respostas de tremor (Gautier *et al.*, 1987), e diante dessa resposta, discussões foram colocadas quanto a possibilidade de a hipóxia atuar coordenadamente nas vias hipotalâmicas termorreguladoras, e a inibição da termogênese seria apenas uma via efetora afetada. Ratos anestesiados apresentaram bloqueio na ativação do tecido adiposo marrom induzido pelo frio quando expostos à hipóxia (Madden & Morrison, 2005), o que corrobora com a discussão acima. Esquilos expostos à 7% de O₂ apresentaram diminuição da temperatura corporal, concomitantemente a um aumento da temperatura da pele, principalmente orelhas, focinho e patas, indicadores de ativação de perda de calor, indicando uma ação conjunta dos efetores do sistema termorregulador (Tattersall & Milsom, 2003).

Entendendo que a via de sinalização das respostas ventilatória à hipóxia é a via clássica do quimiorreflexo, estudos mostraram que a anapirexia é independente dessa via. Animais com denervação dos quimiorreceptores periféricos continuaram com a resposta anapirética à hipóxia, indicando que os efeitos da hipóxia na produção de calor independem do quimiorreflexo periférico (Fenelon *et al.*, 2000). Outros estudos sugerem a presença de sensores de hipóxia no hipotálamo. Tamaki e Nakayama (1987) realizaram um estudo *in vitro* com exposição à hipóxia de fatias isoladas do hipotálamo de ratos, e observaram um aumento da sensibilidade térmica de neurônios sensíveis ao calor, o que indicava um aumento da sensibilidade para a ativação das respostas de perda de calor (Tamaki & Nakayama, 1987).

Apesar de amplamente discutida a possibilidade de o controle da temperatura durante a anapirexia funcionar a partir da sinalização central da redução da disponibilidade de oxigênio (Wood, 1991; Steiner & Branco, 2002), não se sabe ao certo o mecanismo e a localização dos sensores que detectam a hipóxia e dão início à resposta anapirética. Entretanto, considerando os centros integrativos da termorregulação, os núcleos centrais envolvidos já foram previamente descritos. Estão envolvidos na anapirexia a área pré-ótica (APO), o núcleo supra-ótico (SON), o núcleo dorsomedial do hipotálamo (DMH) e o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN). Outros núcleos como o núcleo do trato solitário (NTS) e locus coeruleus também estão envolvidos nessa resposta (Steiner *et al.*, 2000; Steiner & Branco, 2002).

A resposta anapirética à hipóxia mediada pelo SNC envolve uma diversidade de mediadores, como a adenosina (H. Barros & S. Branco, 2000; Barros & Branco, 2002; Barros *et al.*, 2006), dopamina (Barros *et al.*, 2004), opioides (da Silveira Scarpellini *et al.*, 2009), serotonina (Gargaglioni *et al.*, 2005, 2006), e neurotransmissores gasosos como o óxido nítrico (Steiner *et al.*, 2000), monóxido de carbono (Paro *et al.*, 2002) e sulfeto de hidrogênio (Kwiatkoski *et al.*, 2012).

Evidências experimentais mostraram que o NO desempenha um importante papel no controle da temperatura corporal na anapirexia, tanto em tecidos periféricos como o tecido adiposo marrom, tecido músculo esquelético e tecido endotelial (De Luca *et al.*, 1995; Galler *et al.*, 1997; Kellogg, 2006), quanto no SNC (Fabris *et al.*, 1999; De Paula & Branco, 2003). O NO na APO age a favor da anapirexia, onde induz aumento das concentrações intracelulares de GMPc e, conseqüentemente, aumento da atividade celular e diminuição da temperatura corporal (Pereira *et al.*, 2006). Entretanto, ainda não é sabido o papel do NO diretamente no PVN nas respostas da temperatura interna à exposição à hipóxia.

Considerando evidências prévias já descritas na literatura, e tendo em vista que o PVN: 1º) tem conexão direta com a APO (Nagashima, 2006; Morrison *et al.*, 2008); 2º) é um importante local de integração do sistema nervoso simpático (Li *et al.*, 2006); 3º) emite projeções para a coluna intermédio lateral da medula, principal sítio de efluxo simpático (Ranson *et al.*, 1998; Cham *et al.*, 2006); 4º) está ativo durante a hipóxia e tem conexão direta com o NTS (King *et al.*, 2012); 5º) expressa significativa quantidade de NOS e neurônios que se projetam para a medula produzem NO (Cham *et al.*, 2006); a hipótese desse estudo é que a inibição da nNOS no PVN atenuará a resposta anapiréxica à hipóxia.

2. OBJETIVOS

Considerando as três subdivisões do estudo, este possui três principais objetivos:

- 1) Avaliar o papel da redução endógena de NO no PVN na resposta termorreguladora no exercício progressivo agudo;
- 2) Avaliar o papel da redução endógena de NO no PVN na resposta ventilatória à hipóxia aguda;
- 3) Avaliar o efeito da redução endógena de NO no PVN na resposta anapirética à exposição à hipóxia.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais experimentais

Os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos para a experimentação animal, estabelecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais, com o protocolo nº 421/2018.

Foram utilizados ratos *Wistar* adultos, com massa corporal de 280 a 310 gramas, provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB/UFMG). Os animais foram alojados em caixas com livre acesso à água e ração (marca da ração: PRESENCE®, SP, Brasil), e mantidos em uma sala com a temperatura de $24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12h de luz e 12h no escuro, sendo as luzes acesas as 7 horas e apagadas as 19 horas. Antes da realização dos procedimentos cirúrgicos, os animais foram alojados em caixas coletivas de polipropileno (35x50x17 cm), com no máximo 4 animais por caixa. Após os procedimentos cirúrgicos, os animais foram alocados para caixas individuais (20x30x12 cm).

O cálculo do tamanho amostral para o experimento da temperatura foi realizado a partir da fórmula proposta por Armitage e Berry (1987):

$$n = \left[\frac{(Z_{2\alpha} + Z_{2\beta})\sigma}{\delta_1} \right]^2$$

Onde:

2α = nível de significância

2β = 1 – poder do teste

$Z_{2\alpha}$ = quantil $\alpha/2$ da distribuição normal

$Z_{2\beta}$ = quantil $\beta/2$ da distribuição normal

σ = desvio padrão

δ = diferença a ser detectada

Portanto:

$$n = \left[\frac{(Z_{2\alpha} + Z_{2\beta})\sigma}{\delta_1} \right]^2 \rightarrow n = \left[\frac{(3,92 + 2,56)0,39}{0,65} \right]^2 \rightarrow n = \left[\frac{2,52}{0,65} \right]^2 \rightarrow n = 7,776$$

O número inteiro logo acima de 7,776 é 8. Portanto, o n utilizado foi de no mínimo 8 animais por grupo. Para o delineamento desse estudo, foi utilizada a variável da temperatura abdominal. Como fonte dos dados descritos acima, foi utilizado o trabalho de Drummond *et al* (2016). O nível de significância adotado foi de 5% e o poder do teste de 90%. O desvio padrão considerado, 0,39°C e a diferença a ser detectada de 0,65°C.

O mesmo cálculo foi utilizado para o experimento da ventilação, sendo seu resultado como o n mínimo de 8 animais por grupo. O nível de significância adotado foi de 5% e o poder do teste de 90%.

3.2. Procedimentos Cirúrgicos

Os animais foram pesados em balança de precisão (Marte, MG, Brasil) e anestesiados com Cetamina (80 mg/kg i.p.) e Xilazina (10 mg/kg i.p.), sendo os reflexos palpebral, interdigital dos membros pélvicos e da cauda verificados para avaliação do estado anestésico. Em seguida foram realizados dois procedimentos cirúrgicos em sequência: laparotomia para inserção dos sensores de temperatura e estereotaxia para implantar as cânulas guias no sistema nervoso central.

Para a inserção do sensor de temperatura abdominal, após a indução anestésica, o rato foi posicionado em decúbito dorsal sobre uma mesa cirúrgica de acrílico (Bonther®, Ribeirão Preto, SP, Brasil) e foi realizada uma tricotomia da região abdominal, seguida da aplicação tópica de uma solução de clorexidina 2% para a assepsia. Uma incisão ventral mediana de aproximadamente 2 cm foi efetuada, seguida de incisão na linha alba do músculo reto

abdominal, possibilitando assim acesso à cavidade abdominal. O sensor de temperatura (G2 E-Mitter, modelo ER-4000, Mini-Mitter) foi ancorado à fáscia interna do músculo reto abdominal para não ficar solto na cavidade. Após esse procedimento foram realizadas suturas de padrão interrompido simples para fechamento do músculo reto abdominal e da pele.

Imediatamente ao término da laparotomia, o rato foi posicionado em decúbito ventral para se realizar uma tricotomia da região superior da cabeça. A pele foi assepsiada com uma solução de Clorexidina (2%). Foi realizada uma incisão longitudinal na pele e tecido subcutâneo. Uma injeção de anestésico local foi realizada (Cloridrato de Lidocaína 2%; adrenalina 1:200000), e o perióstio foi afastado (Wanner 2006), facilitando a exposição do bregma e lambda. Em seguida o animal foi posicionado e fixado em um aparelho estereotáxico para pequenos animais (Kopf, EUA) e uma cânula guia dupla de aço inoxidável (17 mm de comprimento, 26 gauge) foi implantada. A cânula dupla era previamente fixada com acrílico odontológico auto-polimerizável (Dental Vip, SP, Brasil) em um aparato com distância de 1 mm entre as cânulas. Com o objetivo de atingir o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) bilateralmente, a implantação da cânula seguiu as seguintes coordenadas, segundo o atlas cerebral (Paxinos & Watson, 2007): anteroposterior: -1,6mm posterior ao bregma; látero-lateral: 0,4 a 0,5 à linha média (após a abertura do crânio, a referência látero-lateral foi o seio venoso, por onde as cânulas passavam justas à ele); ventral: 6,8mm de profundidade a partir do crânio. Os orifícios para a inserção da cânula e dos parafusos (que serviram de suporte para a fixação do acrílico) foram realizados com uma broca odontológica (Beltec Micromotores, LB2000, SP, Brasil). A cânula e os parafusos fixados na calota craniana foram envolvidos com acrílico auto-polimerizável (Dental Vip, SP, Brasil). Para evitar a obstrução da cânula, foi inserido um mandril feito com uma cânula de 33 gauge. A cânula dupla foi usada como guia para a inserção da agulha injetora da droga ou veículo antes dos experimentos. O tempo total de cirurgia foi aproximadamente 60 minutos. Imediatamente após a cirurgia, foi administrado

0,1 mL de antibiótico em cada membro pélvico, totalizando 0,2 mL de antibiótico (48000 UI/kg – Pentabiótico Veterinário, intramuscular) e 0,1 mL de analgésico na região torácica dorsal (Flunixin Meglumina, 1,1 mg/kg, subcutâneo).

3.3. Droga

A droga utilizada foi a Nw-Propyl-L-Arginina (NPLA). Esta droga é um potente inibidor seletivo da óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) (Zhang *et al.*, 1997a). As doses escolhidas foram de 0,04 nmol/100nL e 0,4nmol/100nL de acordo com estudos recentes com microinjeções intra PVN com essa droga (Raquel *et al.*, 2018; Busnardo *et al.*, 2019).

A droga foi diluída no veículo salina (NaCl 0,15M), dividida em alíquotas de 3 µL e armazenada imediatamente em um freezer a -20°C. No dia do experimento, a alíquota era retirada imediatamente antes do procedimento de microinjeção. Cada alíquota, previamente diluída antes do congelamento, foi usada para um animal.

3.4. Microinjeção bilateral intra PVN

Durante o protocolo experimental 1 (descrito adiante), os animais receberam uma das doses da droga (0,04 nmol/100 nL ou 0,4 nmol/100 nL) ou veículo (NaCl 0,15M). No protocolo experimental 2, somente a dose de 0,4 nmol/100 nL ou o veículo (NaCl 0,15M) foram utilizados, com base nos resultados do protocolo 1. As microinjeções foram bilaterais, dentro do PVN. O volume de cada microinjeção de NPLA ou veículo no PVN foi de 100 nL em cada injeção. As coordenadas estereotáxicas utilizadas para a microinjeção foram descritas acima. A cânula injetora (30G) tinha 0,2 mm a mais que a cânula guia para alcançar a profundidade ventral de 7 mm a partir do crânio (Paxinos & Watson, 2007). Esta foi conectada à uma seringa Hamilton (1µL) através de uma cânula PE10.

Após a conexão das cânulas injetoras nas cânulas guias bilaterais, a microinjeção era realizada simultaneamente bilateralmente, em um período de aproximadamente 30 segundos, e permaneceu posicionada por 1 minuto adicional para evitar o refluxo da droga ou veículo. Os animais que receberam microinjeções fora da região de interesse foram separados em outro grupo experimental como um segundo grupo controle (grupo Peri-PVN).

3.5. Familiarização à corrida em esteira rolante

Previamente aos procedimentos cirúrgicos e ao protocolo de corrida progressiva, os animais foram familiarizados à esteira rolante (AVS Projetos, Brasil) durante 5 dias consecutivos. A sessão diária consistiu em 10 minutos de familiarização. Durante os 5 primeiros minutos, a esteira permaneceu desligada. Neste momento o rato pôde explorá-la e se movimentar livremente. Nos 5 minutos subsequentes, a esteira foi ligada para que se realizasse uma habituação ao sentido da corrida e ao exercício. A inclinação da esteira permaneceu em 5 graus e o estímulo elétrico em 0,2 mA. A velocidade foi ajustada diariamente, e a cada 2,5 minutos, sendo iniciada em 10 m/min. Sendo assim, o esquema da familiarização foi: 1º dia: 10 m/min e 11m/min; 2º dia: 11 m/min e 12 m/min; 3º dia: 12 m/min e 13 m/min; 4º dia: 13 m/min e 14 m/min; 5º dia: 14 m/min e 15 m/min.

Após a familiarização, os animais passaram pelos procedimentos cirúrgicos (ver adiante), e após 5 dias de recuperação pós-cirúrgica, os animais foram familiarizados novamente à esteira durante dois dias, com velocidades de 11 m/min a 12 m/min, e 13 m/min a 14 m/min. Essa familiarização pós-cirúrgica teve o objetivo de reabilitar os animais ao sentido da corrida, e avaliar se os mesmos ainda eram capazes de correr. Durante esses dois dias, um termopar (Yellow Springs Instruments, 4600 Precision Thermometer) foi preso à cauda do animal. O objetivo dessa familiarização foi, além de ensinar os ratos em qual direção correr, evitar que os mesmos ficassem presos ou entrelaçados no fio do termopar, além de diminuir a

exposição dos mesmos ao estímulo elétrico durante os experimentos (Wanner *et al.*, 2007). A familiarização foi realizada em temperatura ambiente de 24 ± 2 °C.

3.6. Protocolo de exercício progressivo

O exercício progressivo foi utilizado como teste experimental. Dessa forma o exercício consistiu em um protocolo único, para todos os animais. A inclinação da esteira se manteve em 5 graus e o estímulo elétrico em 0,2 mA. A velocidade inicial da esteira foi de 10 m/min com incremento de 1 m/min a cada 3 minutos, até o momento que o rato não conseguisse manter o desempenho físico. A fadiga consistiu no momento em que o animal não conseguiu manter a corrida na esteira, permanecendo por mais de 10 segundos no estímulo elétrico (Lacerda *et al.*, 2005).

3.7. Protocolo de exposição à hipóxia

Os animais foram colocados numa câmara cilíndrica de acrílico de 5L. A câmara foi inicialmente ventilada com ar atmosférico (bomba de ar; fluxo 1500 mL/min) por um período de aclimatação (ou habituação) do animal ao aparato, de no mínimo 30 min. Após esse período e a injeção da droga ou veículo, o animal foi exposto à condição de hipóxia (7% O₂, 93% N₂, com fluxo de 1500 mL/min) durante 60 minutos. A mistura gasosa foi produzida por meio de aparelho misturador de gases.

3.8. Medida da ventilação pulmonar (pletismografia de corpo inteiro)

As medidas de ventilação pulmonar (\dot{V}_E) foram obtidas por pletismografia de corpo inteiro, em um sistema fechado (Bartlett & Tenney, 1970; Malan, 1973). Durante a realização dessa medida, o fluxo de ar é interrompido e a câmara permanece totalmente vedada por um período de tempo (~2 minutos). As oscilações de pressão causadas pela respiração do animal (as

moléculas do ar aquecido internamente no animal se expande, e as moléculas do ar resfriado na expiração, contrai) são captadas por um transdutor de diferencial de pressão e um amplificador de sinais (ML141 Spirometer, PowerLab, ADInstruments). Esse sinal é enviado à um sistema de aquisição e análise de dados (PowerLab, ADInstruments). A calibração do instrumento foi aferida durante cada experimento, através da injeção do volume de 1 mL dentro da câmara. As variáveis medidas foram a frequência respiratória (FR) e o volume corrente (V_T), além da ventilação (\dot{V}_E). Essas variáveis foram corrigidas pela pressão barométrica ambiente de 690 torr e pela temperatura corporal do animal em cada momento da exposição à hipóxia.

O volume corrente (V_T) foi calculado através da fórmula (Bartlett & Tenney, 1970):

$$V_T = \frac{P_T}{P_K} \times V_K \times \frac{T_{abd}(P_B - P_A)}{T_{abd}(P_B - P_A) - T_A(P_B - P_C)}$$

Sendo:

V_K : volume de ar injetado na câmara do animal para calibração;

P_T : deflexão de pressão associada com cada volume de ar corrente;

P_K : deflexão de pressão associada com cada volume de ar injetado para calibração,

T_{abd} : temperatura abdominal;

T_{amb} : temperatura ambiente;

T_A : temperatura do ar dentro da câmara;

P_B : pressão barométrica;

P_C : pressão de vapor d'água à temperatura corporal

P_A : pressão de vapor d'água à temperatura ambiente dentro da câmara

A ventilação (\dot{V}_E): A \dot{V}_E foi calculada pelo produto da FR pelo V_T . A \dot{V}_E e o V_T estão apresentados nas condições de pressão barométrica ambiente, à T_{abd} e saturados com vapor d'água (BTPS). O tempo para realizar as medidas de ventilação será explicado no item protocolo experimental.

3.9. Medidas do consumo de oxigênio

Na mesma câmara utilizada para a medição da \dot{V}_E , o consumo de oxigênio ($\dot{V}O_2$) foi mensurado. Através de um sistema aberto, utilizando a diferença entre a fração de O_2 no gás de entrada e saída, e o fluxo de ar através da câmara (Frappell *et al.*, 1992). A fração de O_2 no fluxo de entrada foi medida como analisador de gases (ML206 Gas Analyser, PowerLab, ADInstruments) no início de cada coleta da ventilação e o valor de saída durante todo o experimento. O $\dot{V}O_2$ foi calculado pela diferença entre as frações de entrada e saída e multiplicada pelo fluxo (Frappell *et al.*, 1992). Os valores do $\dot{V}O_2$ foram normalizados para mL/kg/min e expressos em STPD.

3.10. Medidas da temperatura abdominal e cauda

A temperatura abdominal (T_{abd}) foi considerada como temperatura corporal e foi aferida utilizando um sistema de telemetria, através de um sensor de temperatura (G2 E-Mitter, modelo ER4000, Mini-Mitter, OR, EUA) implantado na cavidade abdominal. O sensor envia pulsos com diferentes frequências de ondas de rádio de acordo com diferentes temperaturas, à uma placa receptora (modelo ER-4000 energizer/receiver, Respironics INC. Company, Mini) posicionada ao lado da esteira ou abaixo da câmara de medida da \dot{V}_E . Os dados foram coletados a cada 5 segundos e convertidos em valores de temperatura no software Vital View (Mini-Mitter, OR, EUA).

A temperatura da pele da cauda (T_{cauda}) foi aferida através de um termopar (Yellow Springs Instruments, 4600 Precision Thermometer) fixado na lateral da cauda há aproximadamente 2 cm da base da cauda do rato, utilizando-se um esparadrapo. De acordo com Young e Dawson (1982) essa posição é a mais adequada para a fixação do termopar (Young &

Dawson, 1982). As alterações do fluxo sanguíneo local, alteram a temperatura da pele na região da base da cauda. O dado foi colhido de minuto a minuto.

A temperatura ambiente foi aferida através do termopar (Yellow Springs Instruments, 4600 Precision Thermometer), que foi fixado na parede da esteira ou na parede da câmara de análise da \dot{V}_E . A temperatura ambiente foi coletada de minuto a minuto.

3.11. Variáveis Calculadas

- Trabalho (J): Para o cálculo do trabalho, foi usada a seguinte fórmula (Brooks *et al.*, 1984):

$$W = mc \cdot g \cdot v \cdot \text{sen}\theta \cdot TE$$

Sendo:

W: Trabalho (J);

mc: massa corporal (kg);

g: aceleração da gravidade ($\text{m} \cdot \text{s}^{-2}$);

v: velocidade da esteira ($\text{m} \cdot \text{min}^{-1}$);

sen θ : inclinação da esteira

TE: tempo total de exercício (min)

- Limiar térmico para dissipação de calor (H_{thr}): O H_{thr} corresponde ao valor médio de temperatura interna registrado no momento em que a T_{cauda} começa a aumentar (estatisticamente, $p < 0,05$) em comparação com o seu menor valor atingido (nadir) após o início do exercício, adaptado de Drummond *et al.* (2016)

- Sensibilidade para dissipação de calor (H_{sen}): O H_{sen} foi determinado através da regressão linear dos cinco valores de T_{abd} e T_{cauda} correspondentes ao aumento exponencial da T_{cauda} após o alcance do H_{thr} (Drummond *et al.*, 2016).

- Eficiência térmica: A eficiência térmica foi calculada pela razão entre o acúmulo de calor e o trabalho realizado. Quanto menor o valor encontrado, maior é a eficiência térmica.

- Taxa de acúmulo de calor (cal/min) = (variação da temperatura corporal interna)·m·c/TTE, onde m = massa corporal em gramas; e c = calor específico dos tecidos do animal (0.826 cal/g·°C).

3.12. Eutanásia

Nos delineamentos experimentais 1 e 2, após a finalização dos experimentos, os ratos foram submetidos à eutanásia por sobredose anestésica (pelo menos 3x a dose) com Cetamina (240 mg/kg, i.p.) e Xilazina (31,5 mg/kg, i.p.). Após a confirmação da morte do animal, seu cérebro foi cuidadosamente retirado para posteriores análises histológicas. Os cérebros foram fixados por 48h em paraformaldeído 4%, à 4°C, e então colocados em solução de sacarose (30%) por 72h também, a 4°C. Após esse procedimento, os cérebros foram congelados no isopentano a -50°C, por imersão de 1 minuto, enrolados em papel alumínio e imediatamente armazenados em freezer a -80°C.

3.13. Histologia

Após o procedimento de congelamento, os cérebros foram preparados para os cortes no criostato (Leica microsystems, Srt. Heidelberg, Alemanha). Para a análise do PVN foram realizados cortes coronais de 40 µm, seguindo as referências do atlas cerebral (Paxinos & Watson, 2007). Os cortes foram dispostos em uma lâmina de microscopia. Após a secagem da lâmina deu-se início à coloração Vermelho-Neutro (vermelho neutro 1% p/v, acetato de sódio anidro 0,3% p/v, ácido acético glacial 0,12% v/v). A técnica consiste na colocação da lâmina por 10 minutos em imersão em vermelho neutro, e na sequência imersão por 45 segundos de imersão nas seguintes soluções: água destilada, etanol 70%, etanol 80%, etanol 90%, etanol 100% e xilol. Após essa sequência, a lâmina foi finalizada com a aplicação de entellan e lamínula.

3.14. Delineamentos Experimentais

O estudo foi dividido em dois protocolos experimentais. O primeiro protocolo consistiu na avaliação da termorregulação de animais submetidos ao exercício progressivo agudo com inibição seletiva da óxido nítrico sintase neuronal no PVN. No segundo protocolo, foram analisadas as respostas termorregulatórias e ventilatórias na inibição seletiva da óxido nítrico sintase neuronal durante a exposição à hipóxia.

3.14.1. Protocolo Experimental 1: respostas termorregulatórias ao exercício.

No protocolo experimental 1 (Figura 3.1) os animais primeiramente foram habituados à corrida na esteira rolante durante 5 dias, com velocidades de 10 m/min no primeiro dia, até 15 m.min⁻¹ no último dia, durante 5 minutos. Após esse período, os animais foram submetidos aos procedimentos cirúrgicos para implante do sensor de temperatura abdominal e estereotaxia para implantação da cânula guia bilateral no PVN. Após 5 dias de recuperação, foi permitido aos animais mais dois dias de habituação na esteira. No 7º dia pós-cirúrgico, foi realizado o protocolo experimental de teste progressivo na esteira (Figura 3.1). Após a microinjeção bilateral de Nw-Propyl-L-Arginina (NPLA 0,4 nmol/100nL ou 0,04 nmol/100nL) ou veículo (NaCl 0,15M), randomizadas por sorteio, os animais foram imediatamente colocados na esteira dando início ao exercício. O exercício consistiu em velocidade inicial de 10 m/min com incremento de 1 m/min a cada 3 minutos, em inclinação de 5% até a fadiga do animal. A fadiga consistiu no momento em que o animal não conseguiu manter a cadência de corrida na esteira, permanecendo por mais de 10 segundos no choque (Lacerda *et al.*, 2005, 2006). Na sequência, foram submetidos a eutanásia por sobredose de anestésico. Após confirmação de morte do animal (ausência de movimento respiratório; ausência de batimentos cardíaco, mucosas pálidas e perda do reflexo corneal), o encéfalo foi dissecado e removido para as análises histológicas

subsequentes. Para verificar o local da microinjeção foi realizada histologia pelo método de Vermelho-neutro.

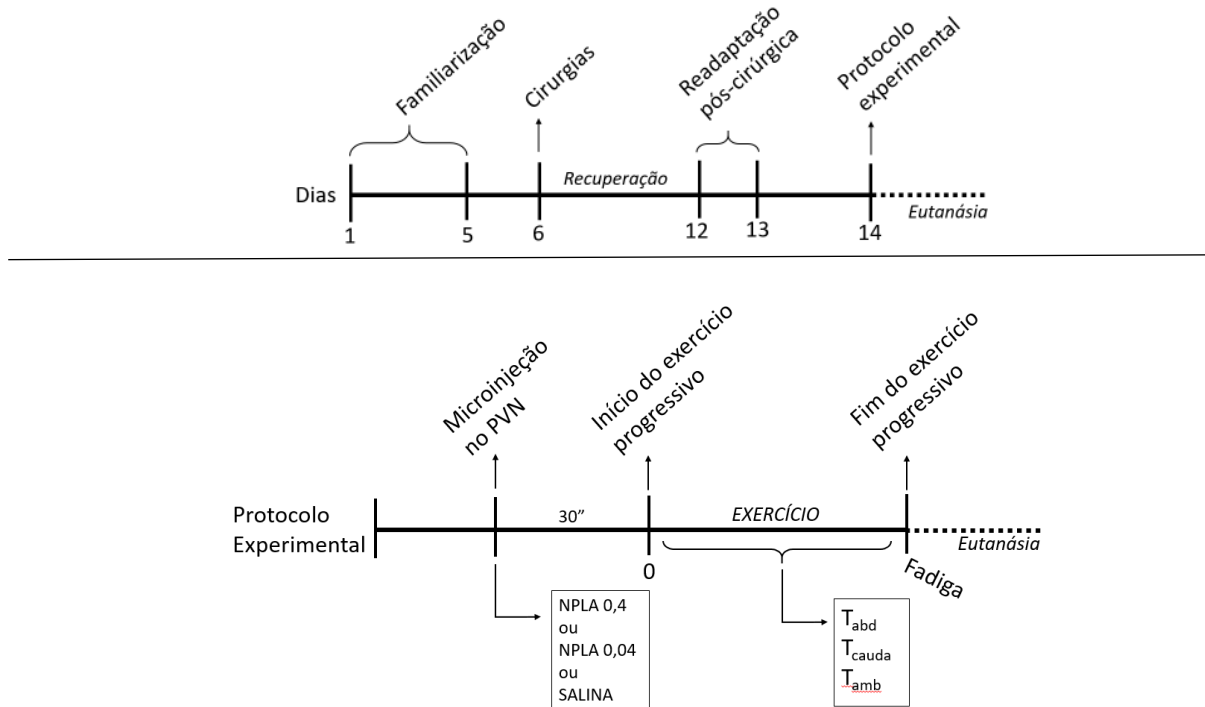


Figura 3.1. (A) Linha do tempo geral referente ao protocolo experimental 1. (B) linha do tempo do experimento 1. T_{abd} , temperatura abdominal; T_{cauda} , temperatura da pele da cauda; T_{amb} , temperatura ambiente.

3.14.2. Protocolo Experimental 2: respostas termorregulatórias e ventilatórias à hipóxia

O protocolo 2 (figura 3.2), os animais com aproximadamente 300g de massa corporal foram submetidos aos procedimentos cirúrgicos para implante do sensor de temperatura abdominal e estereotaxia para implantação da cânula guia bilateral no PVN. Após 6 a 7 dias de recuperação, os animais foram levados para a sala de experimentos. Na sala de experimentos, os animais foram colocados em uma câmara cilíndrica de acrílico cilíndrica de 5 (Bonther®, Ribeirão Preto, SP, Brasil) L. A câmara foi inicialmente ventilada com ar atmosférico (bomba de ar; fluxo 1500 mL/min) por um período de aclimação (ou habituação) do animal ao aparato, de no mínimo 30 minutos. Nesse tempo, a temperatura corporal foi registrada de 5 em 5 minutos.

Com o animal já adaptado e confortável no aparato experimental (30 minutos de habituação) foram registrados os dados basais de ventilação e temperatura corporal do animal. Após a coleta dos dados em condições basais em ar ambiente (normoxia), a droga NPLA (0,4nmol/100nL) ou veículo (0,15 M NaCl) foram microinjetados bilateralmente, e imediatamente após a injeção, foi iniciada a exposição à hipóxia (7% O₂, 93% N₂, com fluxo de 1500 mL/min, 60 minutos). A mistura gasosa foi elaborada por meio de aparelho misturador de gases. A cada 20 minutos o consumo de oxigênio e a ventilação foram medidos. A temperatura foi registrada a cada 5 minutos. Ao término da exposição à hipóxia, o animal retornou à condição de normoxia (ar ambiente) e ao término do experimento os animais foram transferidos para as caixas de acondicionamento, de onde então, foram submetidos a eutanásia por sobredose de anestésico. Após confirmação de morte do animal, o encéfalo foi dissecado e removido para as análises histológicas subsequentes. Para verificar o local da microinjeção foi realizada histologia pelo método de Vermelho-neutro.

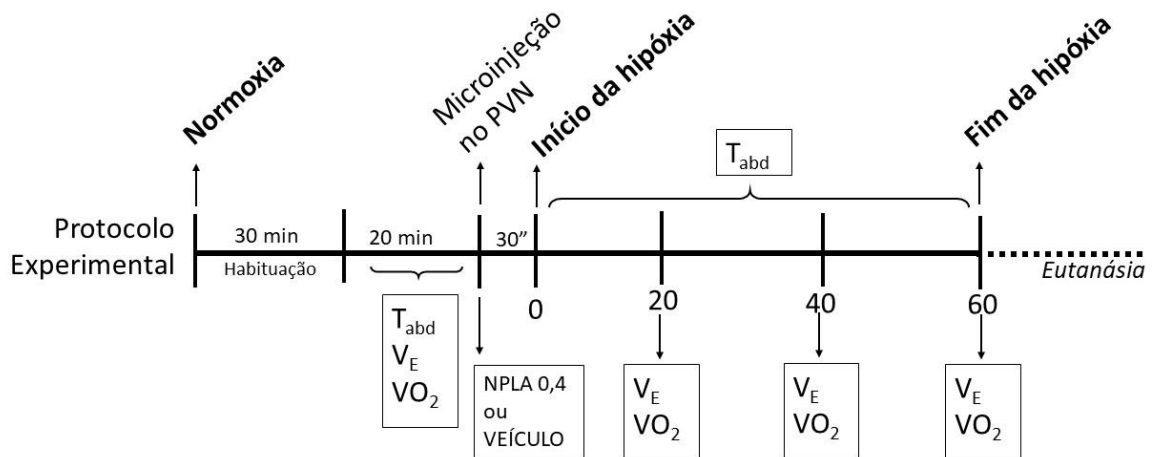


Figura 3.2. Linha do tempo geral referente ao protocolo experimental 2. T_{abd}, temperatura abdominal; \dot{V}_E , ventilação; $\dot{V}O_2$, consumo de oxigênio.

3.15. Análise estatística

Os resultados serão expressos como média \pm EPM. O teste Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar a normalidade dos dados. No protocolo experimental 1, para a comparação dos dados de T_{abd} e T_{cauda} entre os grupos (Veículo, NPLA 0,04 e NPLA 0,4) foram utilizadas análises de variância (ANOVA) two-way de medidas repetidas, seguidas pelo teste de múltiplas comparações post hoc de Tukey. A massa corporal, temperaturas máximas e mínimas, H_{thr} e H_{sen} foram avaliadas por meio de ANOVA one-way seguida pelo teste de múltiplas comparações (post hoc) de Tukey ou Holm-Sidak. No protocolo experimental 2, para analisar as alterações na \dot{V}_E , V_T , FR e T_{abd} nos diferentes grupos foram utilizadas ANOVA two-way de medidas repetidas seguidas pelo teste de múltiplas comparações post hoc de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. As análises foram realizadas pelo software SigmaStat 3.1.

4. RESULTADOS

4.1. Resultados do protocolo experimental 1

4.1.1. Anatomia

A figura 4.1 mostra uma secção coronal do cérebro em um animal que recebeu a microinjeção bilateral de NPLA na dose de 0,4 nmol/100nL no protocolo experimental 1. A figura 4.1 também mostra uma série de esquemas de secções coronais com o PVN em evidência em uma organização rostro-caudal, demonstrando a localização das microinjeções para cada animal incluído neste estudo. As microinjeções ocorreram em toda extensão do núcleo, principalmente na sua região medial, à -1,8 mm posterior ao bregma. Não foi observada alteração nas respostas de acordo com a modificação rostro-caudal da localização da microinjeção.

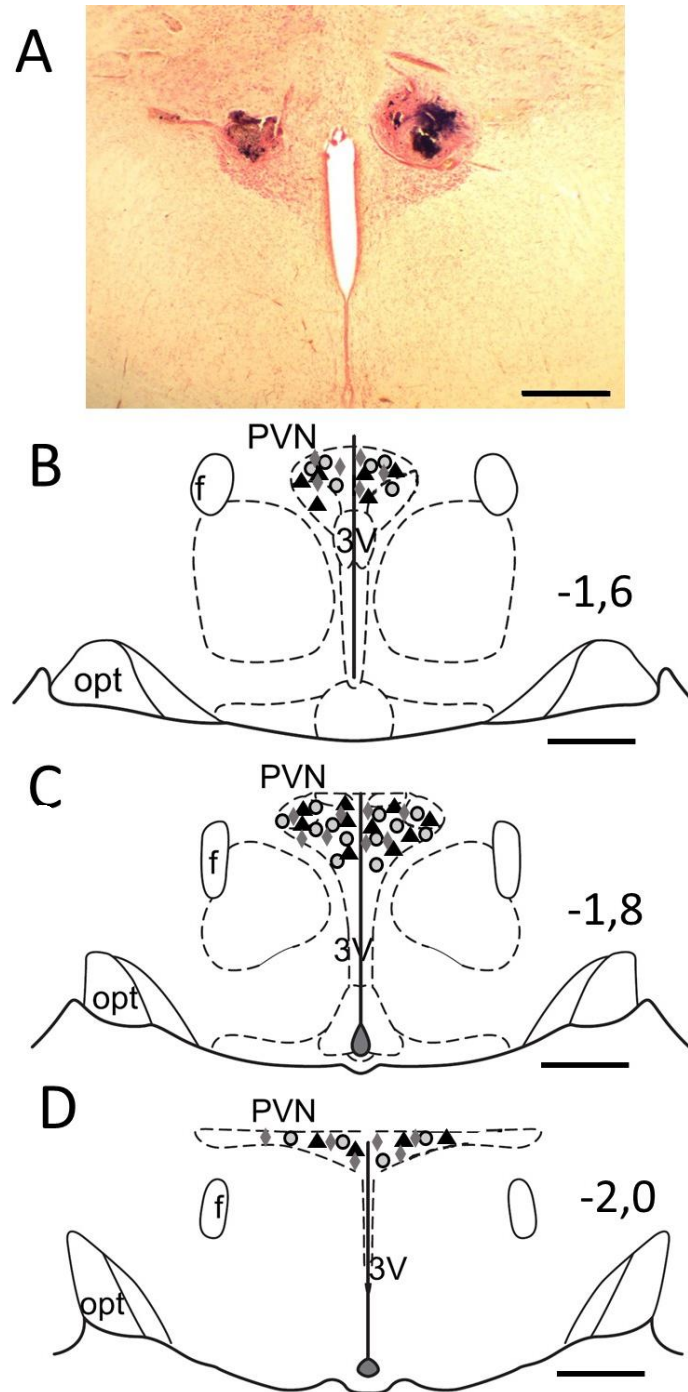


Figura 4.1. Localizações anatômicas das microinjeções. (A) Fotomicrografia de uma secção coronal do encéfalo de um animal do grupo NPLA 0,4, mostrando a localização da microinjeção. (B) Representação esquemática dos locais de microinjeção. No lado esquerdo de cada secção, está demonstrada a localização rostro-caudal de cada secção em relação ao bregma. Os triângulos preenchidos, representam os locais da microinjeção de NPLA na dose de 0,4 nmol/100nL (n = 10). Os losangos cinzas representam os locais da microinjeção de NPLA na dose de 0,04 nmol/100nL (n = 10). Os círculos representam o local da microinjeção de veículo (NaCl 0,15 M) (n = 12). 3V: terceiro ventrículo; f: fórnix; opt: trato óptico. Barra de escala = 500 µm.

4.1.2. Temperatura abdominal

Durante o exercício físico progressivo (incremental), os animais que receberam a maior dose da droga (grupo NPLA 0.4) apresentaram atenuação da T_{abd} na fadiga, ou seja, T_{abd} máxima, quando comparados ao grupo veículo (fadiga: $38,28 \pm 0,22$ °C vs. $39,35 \pm 0,16$ °C, $p = 0,005$; figura 4.2). Não houve diferença significativa da T_{abd} na fadiga entre os grupos NPLA (NPLA 0.04: $38,74 \pm 0,31$ °C; NPLA 0.4: $38,28 \pm 0,22$ °C; figura 4.2). No decorrer do exercício não houve diferença nas T_{abd} entre os grupos.

4.1.3. Temperatura da pele da cauda

Com relação à T_{cauda} , não foi observada diferença entre os grupos (figura 4.3). Os animais veículo, NPLA 0,04 e NPLA 0,4 apresentaram T_{cauda} iniciais de $27,94 \pm 0,23$ °C vs. $27,94 \pm 0,49$ °C vs. $27,86 \pm 0,77$, respectivamente. As T_{cauda} mínimas foram $26,89 \pm 0,25$ °C nos animais veículo, $26,82 \pm 0,46$ °C nos animais NPLA 0,04 e $26,33 \pm 0,83$ °C nos animais NPLA 0,4. Já as T_{cauda} máximas foram de $33,33 \pm 0,34$ °C nos animais veículo, $33,74 \pm 0,50$ °C nos animais NPLA 0,04 e $32,60 \pm 0,55$ °C nos animais NPLA 0,4.

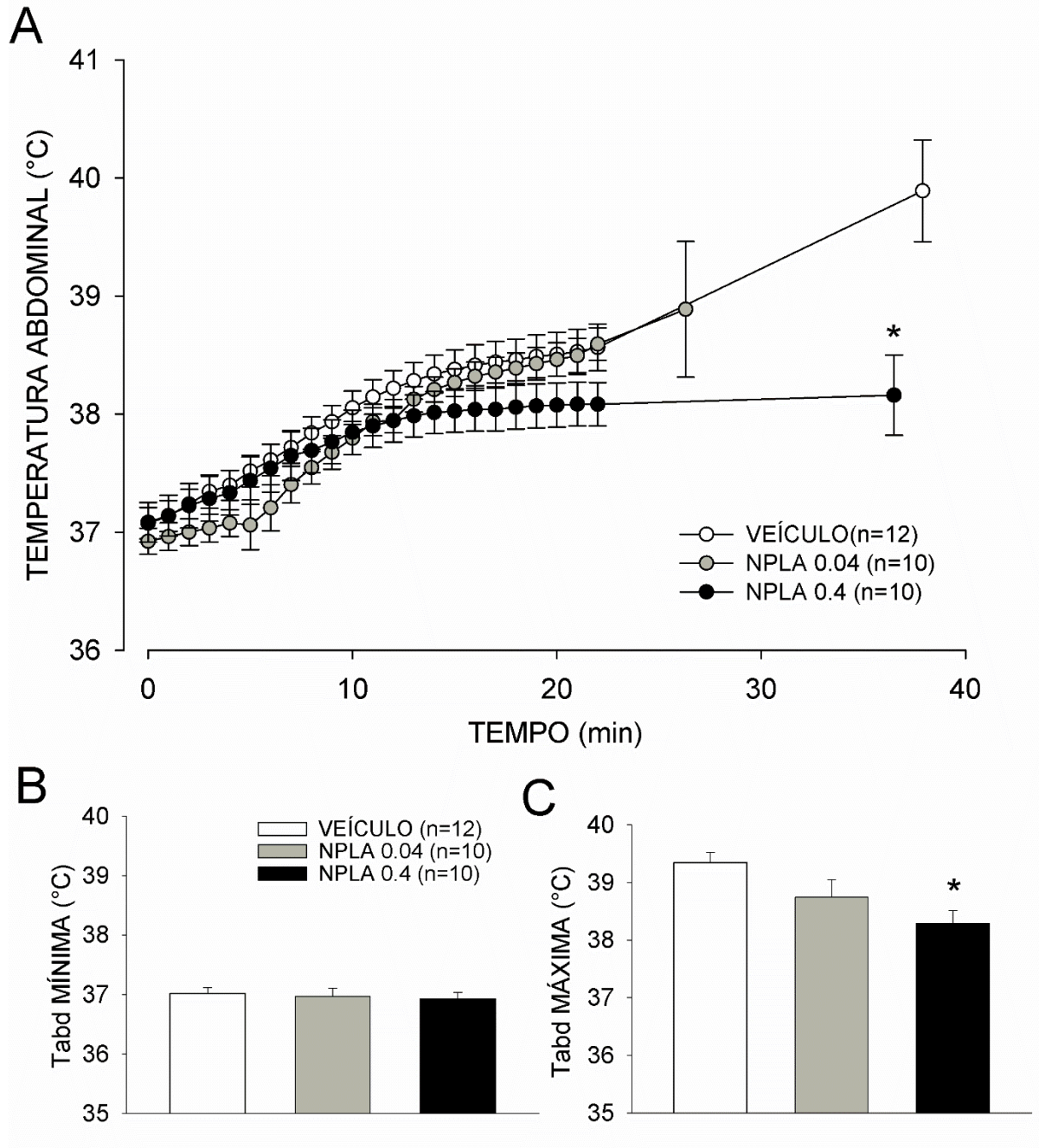


Figura 4.2. Curva da temperatura abdominal (A) e temperatura abdominal mínima (B) e máxima (C) dos animais dos grupos veículo, NPLA 0,04 e NPLA 0,4 submetidos ao teste de exercício progressivo. Dados expressos em média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. veículo. T_{abd} : temperatura abdominal.

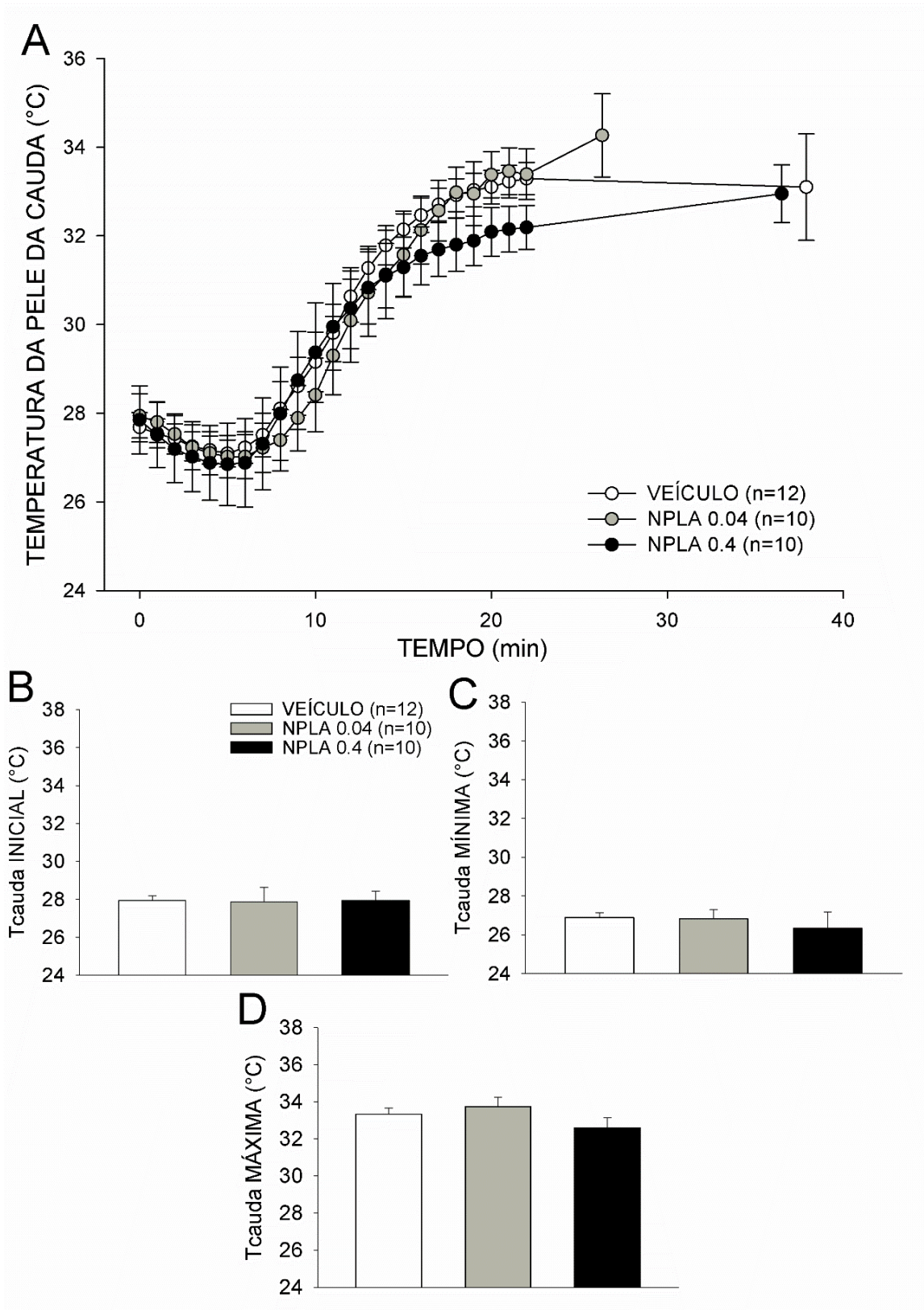


Figura 4.3. Curva da temperatura da pele da cauda (A), temperatura da pele da cauda inicial (B), mínima (C) e máxima (D). Dados expressos em média \pm EPM. T_{cauda}: temperatura da pele da cauda.

4.1.4. Limiar para dissipação de calor e sensibilidade para dissipação de calor

Os dados referentes à relação da T_{abd} com a T_{cauda} (Figura 4.4A) expressam duas análises. A primeira, o limiar para dissipação de calor (H_{thr}) que analisa a T_{abd} atingida na qual o animal começa a dissipar calor pela T_{cauda} . Não houve diferença significativa no H_{thr} entre os grupos veículo, NPLA 0,04 e NPLA 0,4, sendo seus valores $37,74 \pm 0,16$ °C, $37,71 \pm 0,21$ °C e $37,63 \pm 0,17$ °C, respectivamente (Figura 4.4B). Já na segunda análise, da sensibilidade para dissipação de calor (H_{sen}) traduzida pela inclinação da curva, houve um aumento da sensibilidade (deslocamento para a esquerda) do grupo NPLA 0,4 comparado com o grupo veículo, indicando que nesses animais a T_{abd} foi atenuada durante o exercício (NPLA 0,4: $13,74 \pm 1,45$ vs. veículo: $8,84 \pm 0,91$, $p < 0,05$; Figura 4.4C). Não houve diferença entre os grupos NPLA 0,04 e NPLA 0,4 vs. Veículo (NPLA 0,04: $9,64 \pm 1,64$).

4.1.5. Acúmulo de calor e eficiência térmica

O acúmulo de calor (cal) foi menor nos animais NPLA 0,4 comparado ao grupo veículo (NPLA 0,4: $335,14 \pm 39,44$ cal vs. VEÍCULO: $569,61 \pm 51,63$ cal, $p = 0,014$; figura 4.5A). Não houve diferença entre os grupos da droga (NPLA 0,04: $443,87 \pm 71,46$ cal vs. NPLA 0,4: $335,14 \pm 39,44$ cal, $p > 0,05$).

A eficiência térmica, calculada a partir da razão entre o acúmulo de calor e o trabalho realizado também foi diferente entre os grupos. Os animais NPLA 0,04 tiveram uma menor eficiência térmica comparado aos grupos veículo e NPLA 0,4 (NPLA 0,04: $3,807 \pm 0,510$ cal/J vs. VEÍCULO: $2,53 \pm 0,15$ cal/J, $p = 0,007$; NPLA 0,04: $3,80 \pm 0,51$ cal/J vs. NPLA 0,4: $1,66 \pm 0,22$ cal/J, $p < 0,001$; Figura 4.5B).

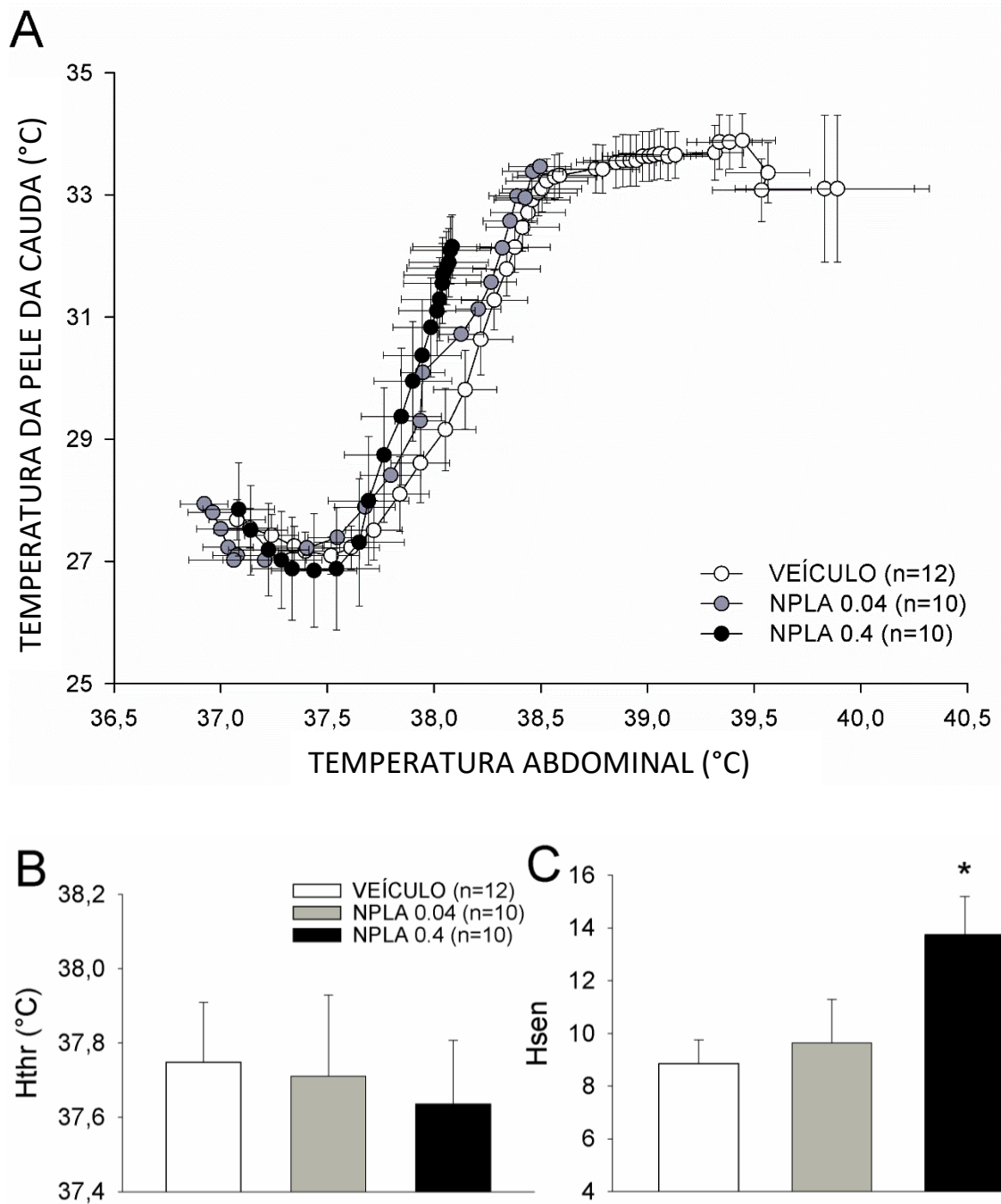


Figura 4.4. Relação da temperatura abdominal com a temperatura da pele da cauda (A), limiar térmico para dissipação de calor (B) e sensibilidade para dissipação de calor (C) durante o exercício progressivo. Dados expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. veículo. H_{thr} : limiar térmico para dissipação de calor. H_{sen} : sensibilidade para dissipação de calor.

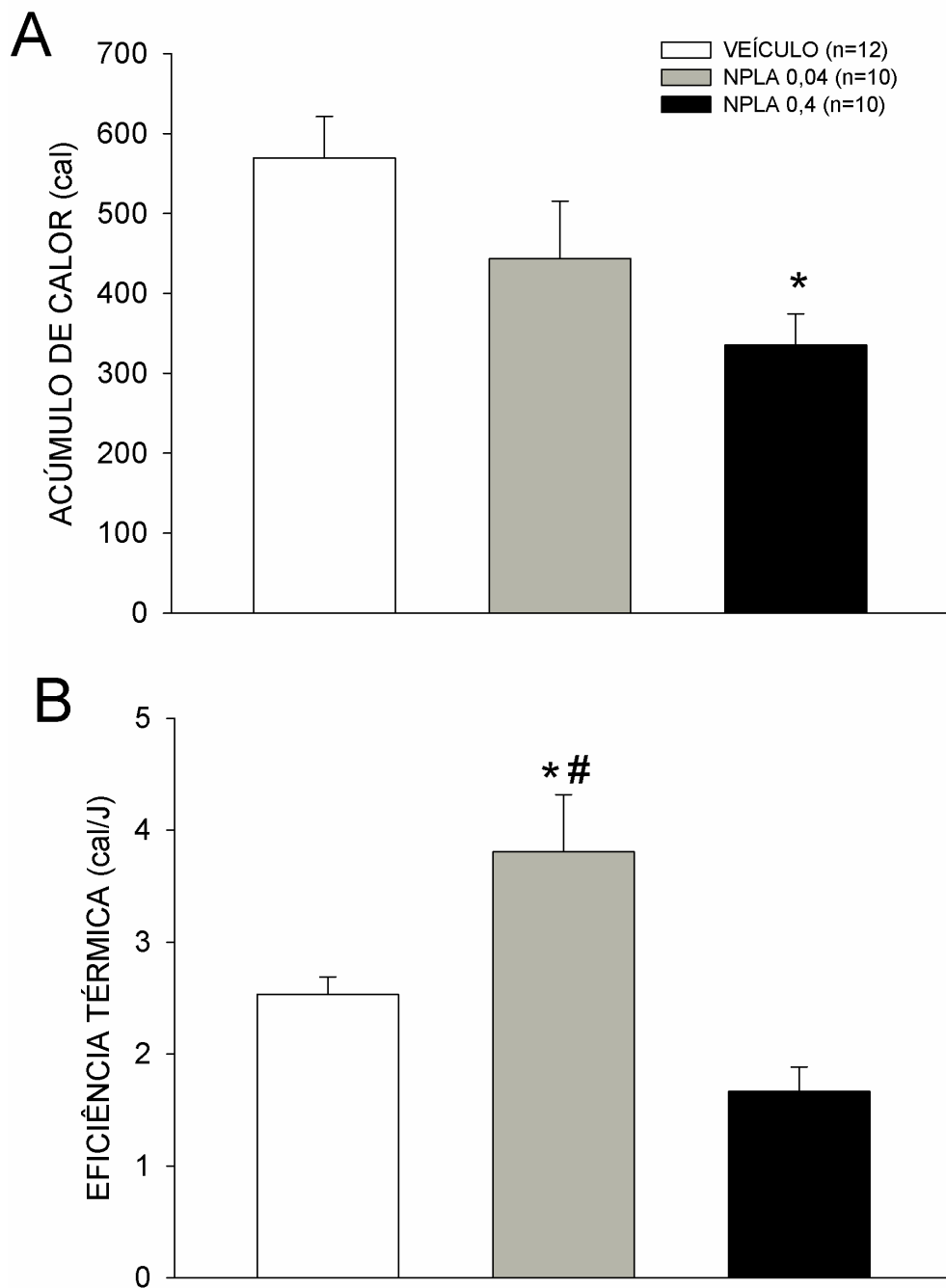


Figura 4.5. Acúmulo de calor (A) e eficiência térmica (B) durante o exercício progressivo em animais do grupo veículo, NPLA 0,04 e NPLA 0,4. Dados expressos como média \pm EPM. Em (A), * $p = 0,018$ vs. veículo. Em (B), * $p = 0,007$ vs. veículo, # $p < 0,001$ vs. NPLA 0,4.

4.1.6. Tempo de corrida e velocidade atingida

A microinjeção intra PVN de NPLA 0,04 diminuiu o tempo de corrida dos ratos, comparado ao grupo veículo e ao grupo NPLA 0,4 (NPLA 0,04: $26,30 \pm 1,61$ min vs. VEÍCULO: $37,91 \pm 1,85$ min, $p < 0,001$; NPLA 0,04: $26,30 \pm 1,61$ min vs. NPLA 0,4: $36,50 \pm 2,18$ min, $p < 0,001$; Figura 4.6A). Com isso, a velocidade máxima atingida também foi menor nos animais que correram menor tempo (NPLA 0,04: $18,40 \pm 0,56$ m/min vs. VEÍCULO: $22,33 \pm 0,60$, $p < 0,001$; NPLA 0,04: $18,40 \pm 0,56$ m/min vs. NPLA 0,4: $21,80 \pm 0,69$ m/min, $p < 0,001$; Figura 4.6B).

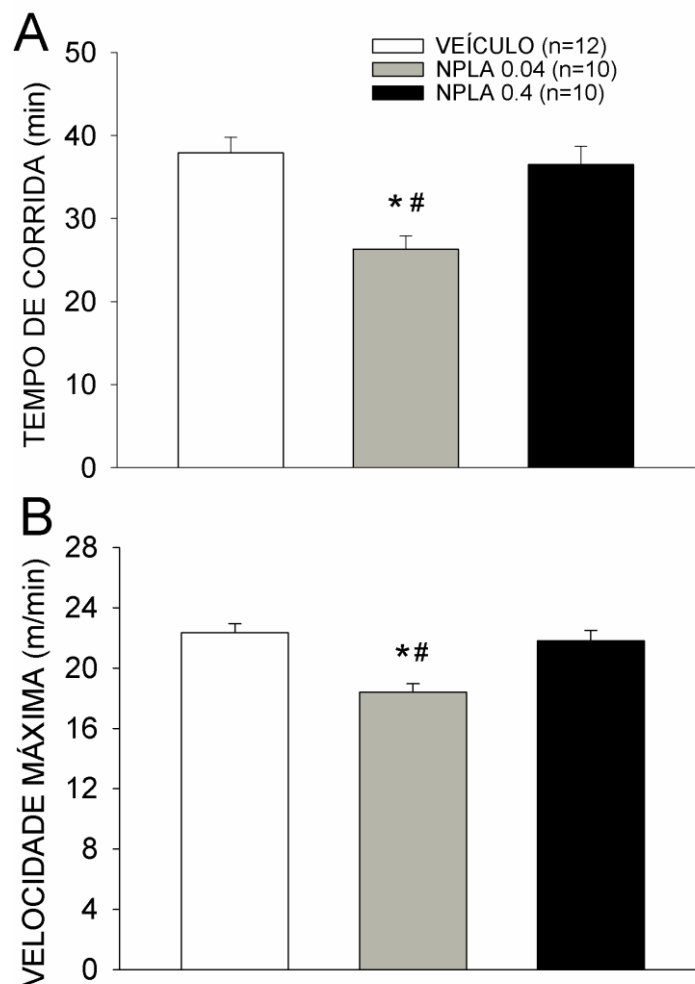


Figura 4.6. Tempo máximo de corrida (A) e velocidade máxima atingida (B) no teste de exercício progressivo em animais veículo, NPLA 0,04 e NPLA 0,4. Dados expressos em média \pm EPM. Em ambas as figuras, * $p < 0,001$ vs. veículo e # $p < 0,001$ vs. NPLA 0,4.

4.1.7. Trabalho

Com relação ao trabalho (J) realizado, os animais do grupo NPLA 0,04 que receberam a menor dose da droga tiveram um trabalho menor que os animais veículo e NPLA 0,4 (NPLA 0,04: $117,95 \pm 9,57$ J vs. VEÍCULO: $231,20 \pm 23,27$ J, $p < 0,001$; NPLA 0,04: $117,95 \pm 9,57$ J vs. NPLA 0,4: $212,57 \pm 18,92$ J, $p = 0,002$; Figura 4.7).

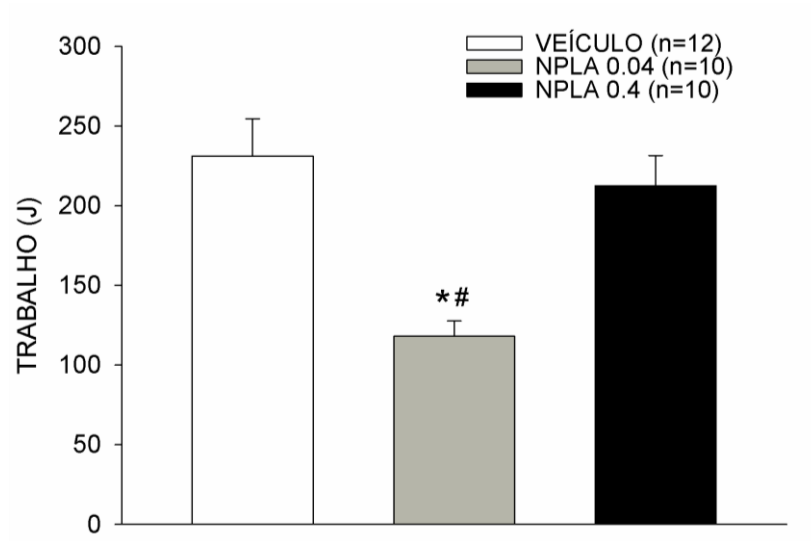


Figura 4.7. Efeito da microinjeção no trabalho (J) no teste de exercício progressivo de animais veículo, NPLA 0,04 e NPLA 0,4. Dados expressos como média \pm EPM. * $p < 0,001$ vs. veículo, # $p < 0,001$ vs. NPLA 0,4.

4.2. Resultados do protocolo experimental 2

4.2.1. Anatomia

A figura 4.8 mostra uma secção coronal do cérebro em um animal que recebeu a microinjeção bilateral de NPLA na dose de 0,4 nmol/100nL no protocolo experimental 2. A figura 4.8 também mostra uma série de esquemas de secções coronais com o PVN em evidência em uma organização rostro-caudal, demonstrando a localização das microinjeções para cada animal incluído neste estudo. As microinjeções ocorreram em toda extensão do núcleo, principalmente na sua região medial, à -1,8 mm posterior ao bregma. Não foi observada alteração nas respostas de acordo com a modificação rostro-caudal da localização da microinjeção.

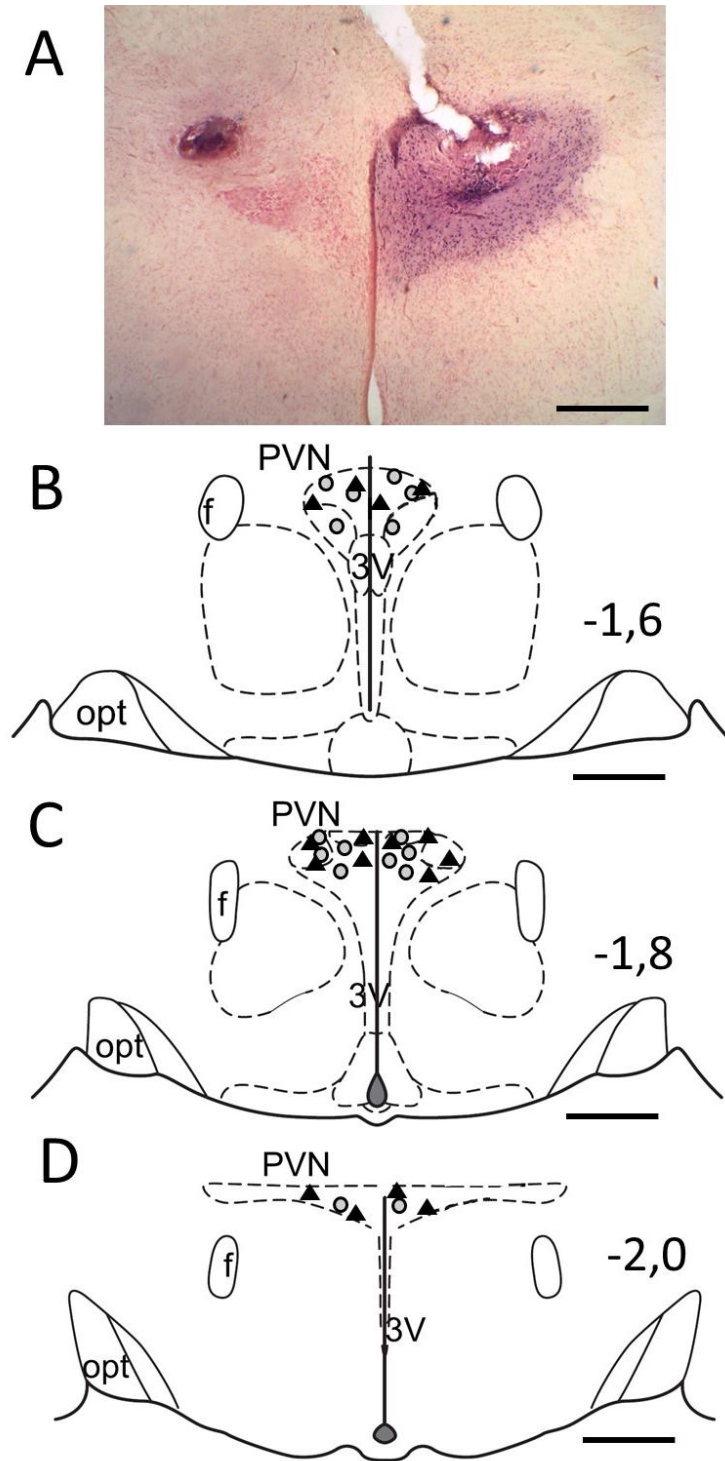


Figura 4.8. Localizações anatômicas das microinjeções. (A) Fotomicrografia de uma secção coronal do encéfalo de um animal do grupo NPLA, mostrando a localização da microinjeção. (B) Representação esquemática dos locais de microinjeção. No lado esquerdo de cada secção, está demonstrada a localização rostro-caudal de cada secção em relação ao bregma. Os triângulos preenchidos, representam os locais da microinjeção de NPLA ($n = 8$). Os círculos representam o local da microinjeção de veículo (NaCl 0,15 M) ($n = 8$). 3V: terceiro ventrículo; f: fórnix; opt: trato óptico. Barra de escala = 500 μm .

4.2.2. Análise da ventilação

A figura 4.9 apresenta os traçados representativos da ventilação pulmonar em normóxia (ar ambiente) e hipóxia de um animal do grupo veículo (A) e um animal do grupo NPLA (B).

A exposição à hipóxia induziu aumento na ventilação pulmonar em todos os grupos. Este foi devido ao aumento combinado da FR e V_T . Entretanto, a microinjeção de NPLA no PVN não afetou a FR e o V_T em condição de hipóxia (7% O_2 , N_2 balanço) (Figura 4.10). A inibição da nNOS no PVN também não afetou a $\dot{V}E$, ou seja, não alterou a resposta ventilatória à hipóxia, nos diferentes tempos de exposição. O equivalente ventilatório ($\dot{V}E/\dot{V}O_2$) durante hipóxia também não foi alterado pela microinjeção da droga. Em um intervalo de tempo, após 40 minutos de exposição à hipóxia, houve aumento pontual do equivalente ventilatório, quando comparada ao grupo veículo no mesmo tempo (Figura 4.11). Os valores médios das variáveis ventilatórias estão apresentados na tabela 1.

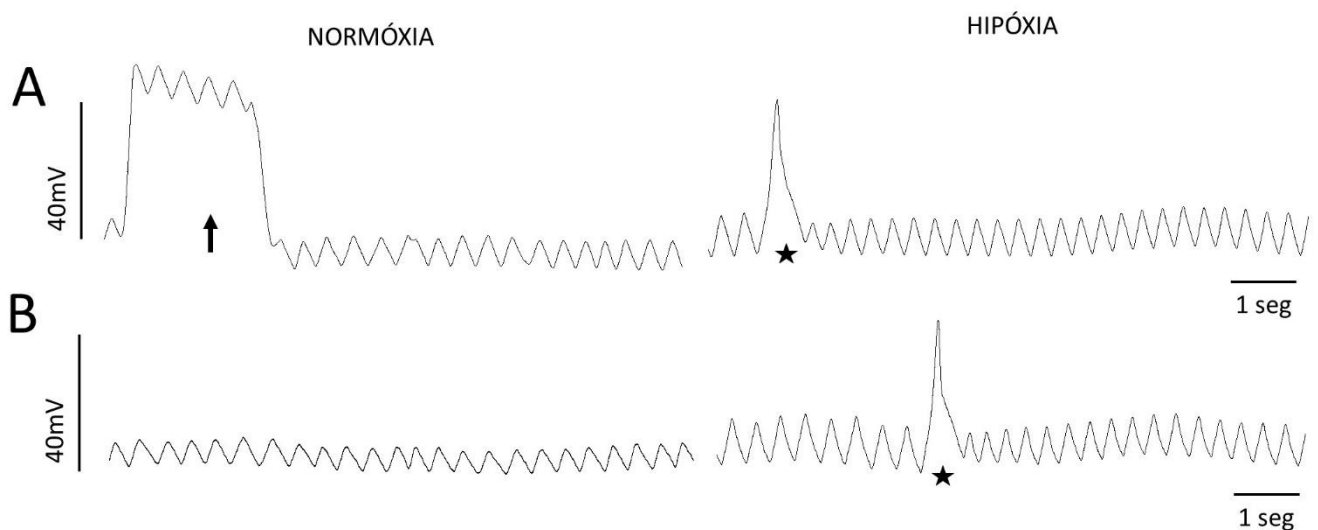


Figura 4.9. Traçado representativo retirado do *LabChart* de um animal do grupo veículo (A) e um animal do grupo NPLA (B) em normóxia e hipóxia. A seta no painel A indica a calibração, onde é feita a injeção de 1mL de ar dentro da câmara. As estrelas correspondem a um evento de suspiro.

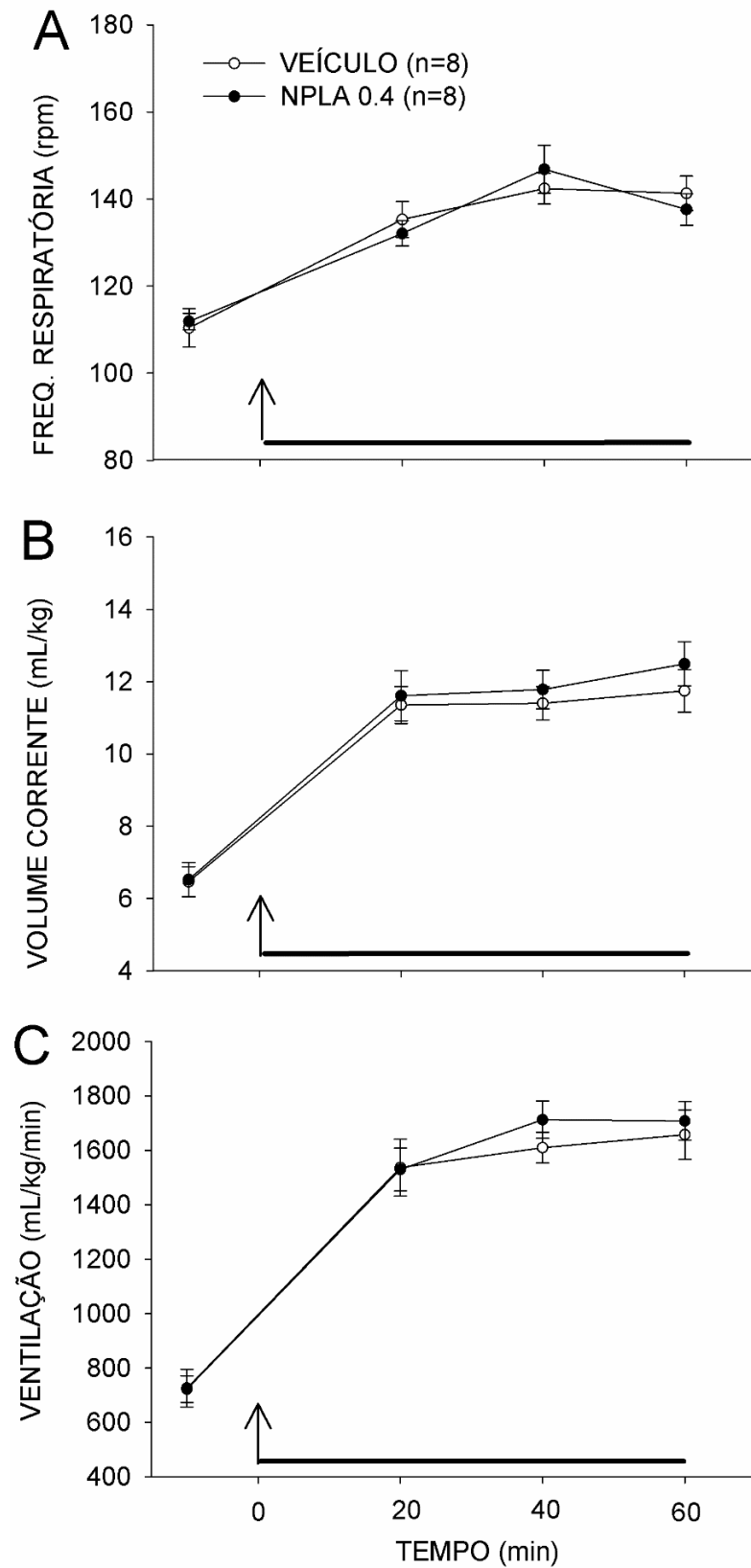


Figura 4.10. Efeito da inibição seletiva da nNOS com NPLA na FR (A), V_T (B) e \dot{V}_E (C) durante a exposição à hipóxia (7% O_2). A seta indica o momento da microinjeção bilateral de NPLA no

PVN. A linha preta acima do eixo X corresponde ao intervalo de tempo onde houve exposição à hipóxia. Valores expressos em média \pm EPM.

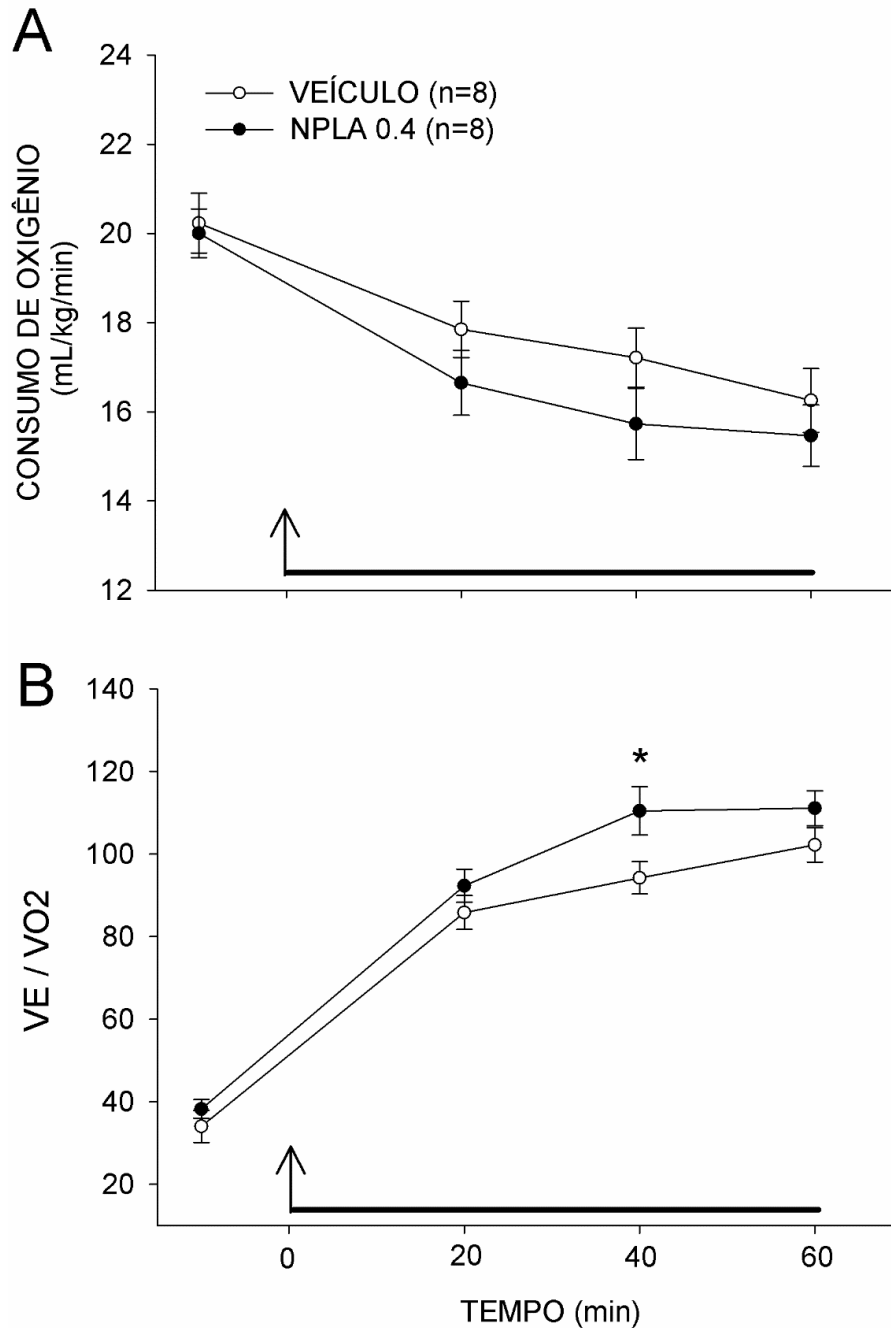


Figura 4.11. Efeito da microinjeção de NPLA no PVN no $\dot{V}O_2$ (A) e equivalente ventilatório $\dot{V}E/\dot{V}O_2$ (B). A seta indica o momento da microinjeção bilateral de NPLA no PVN. A linha preta acima do eixo X corresponde ao intervalo de tempo onde houve exposição à hipóxia. Dados expressos em média \pm EPM. * $p = 0,008$ vs. Veículo no mesmo intervalo de tempo (40 min).

A análise dos suspiros, ou seja, a frequência de ocorrência e a amplitude, não mostrou diferença entre os grupos. Apesar de um aumento discreto na amplitude do suspiro no grupo NPLA, essa diferença não foi significativa (Figura 4.10 e Tabela 1).

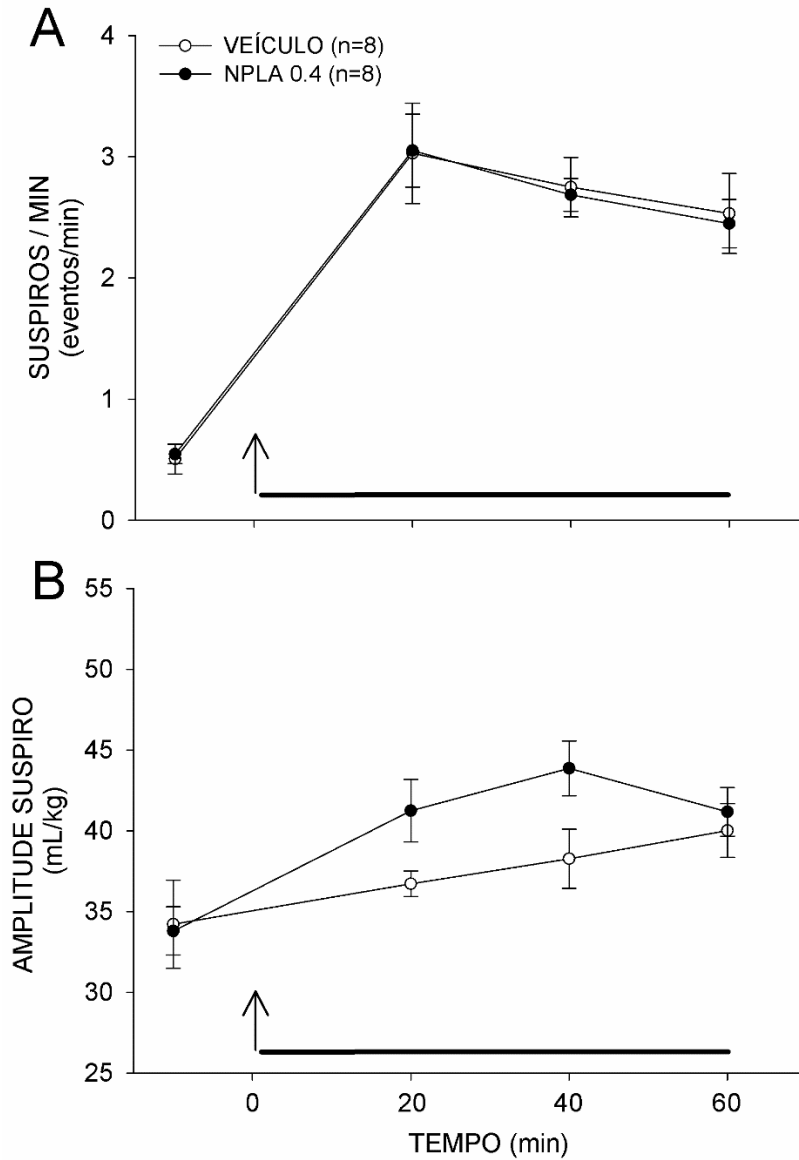


Figura 4.12. Efeito da inibição seletiva da nNOS no PVN na frequência dos suspiros (A) e no volume do suspiro (B). A seta indica o momento da microinjeção bilateral de NPLA no PVN. A linha preta acima do eixo X corresponde ao intervalo de tempo onde houve exposição à hipóxia. Dados expressos em média \pm EPM.

4.2.3. Análise da temperatura

A exposição à hipóxia induziu queda na temperatura abdominal nos grupos veículo e droga. Entretanto, a injeção de NPLA no PVN não alterou a dinâmica da temperatura durante a hipóxia (Normóxia: $37,41 \pm 0,10$ °C NPLA vs. $37,5 \pm 0,21$ °C veículo; 20 minutos de hipóxia: $36,216 \pm 0,178$ °C NPLA vs. $36,535 \pm 0,177$ °C veículo; 40 minutos de hipóxia: $35,845 \pm 0,208$ °C NPLA vs. $36,178 \pm 0,210$ °C veículo; 60 minutos de hipóxia: $35,395 \pm 0,284$ °C NPLA vs. $35,800 \pm 0,239$ °C veículo). Os dados estão expostos na figura 4.13 e tabela 1.

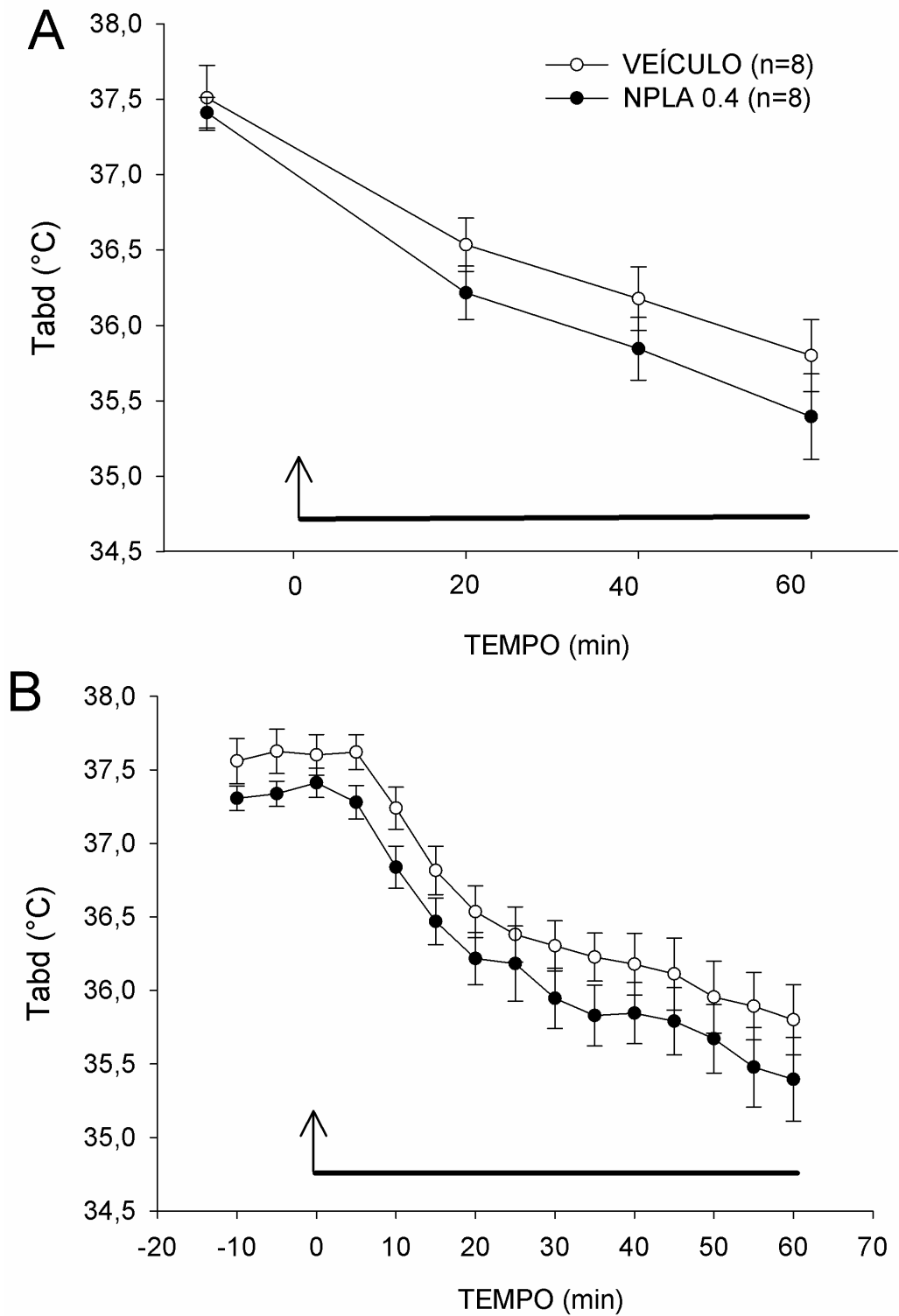


Figura 4.13. Efeito da inibição seletiva de nNOS no PVN na temperatura durante a exposição à hipóxia. Em A, a temperatura no momento da coleta da ventilação. Em B, a dinâmica da temperatura em cada 5 minutos. A seta indica o momento da microinjeção bilateral de NPLA no PVN. A linha preta acima do eixo X corresponde ao intervalo de tempo onde houve exposição à hipóxia. Dados expressos em média \pm EPM.

VEÍCULO (n=8)				
	Normóxia (ar ambiente)	Hipóxia (20 min)	Hipóxia (40 min)	Hipóxia (60 min)
FR (rpm)	110,41 ± 4,4	135,32 ± 4,1	142,39 ± 3,5	141,31 ± 3,9
V_T (mL/kg)	6,46 ± 0,4	11,35 ± 0,5	11,40 ± 0,5	11,74 ± 0,6
Ṡ_E (mL/kg/min)	726,41 ± 69	1536,92 ± 104,5	1610,12 ± 56,6	1657,80 ± 91,1
Ṡ_{O₂} (mL/kg/min)	20,23 ± 0,7	17,85 ± 0,6	17,21 ± 0,7	16,25 ± 0,7
Ṡ_E/Ṡ_{O₂}	34,02 ± 3,9	85,83 ± 4,1	94,23 ± 3,9	102,23 ± 4,1
Suspiro/min	0,5 ± 0,1	3,02 ± 0,4	2,74 ± 0,2	2,53 ± 0,3
Suspiro (mL/kg)	34,22 ± 2,7	36,71 ± 0,8	38,26 ± 1,8	40 ± 1,7
T_{abd} (°C)	37,5 ± 0,2	36,53 ± 0,2	36,17 ± 0,2	35,8 ± 0,2
NPLA (n=8)				
FR (rpm)	111,86 ± 1,9	132,09 ± 2,9	146,81 ± 5,5	137,62 ± 3,6
V_T (mL/kg)	6,52 ± 0,5	11,61 ± 0,7	11,78 ± 0,5	12,49 ± 0,6
Ṡ_E (mL/kg/min)	722,86 ± 48,9	1529,84 ± 78,6	1712,60 ± 68,8	1708,16 ± 70,5
Ṡ_{O₂} (mL/kg/min)	20 ± 0,5	16,64 ± 0,7	15,72 ± 0,8	15,46 ± 0,7
Ṡ_E/Ṡ_{O₂}	38,25 ± 2,3	92,33 ± 4	110,46 ± 5,9 #	111,11 ± 4,2
Suspiro/min	0,54 ± 0,1	3,05 ± 0,3	2,68 ± 0,1	2,44 ± 0,2
Suspiro (mL/kg)	33,79 ± 1,5	41,24 ± 1,9	43,86 ± 1,7	41,17 ± 1,5
T_{abd} (°C)	37,41 ± 0,1	36,21 ± 0,2	35,84 ± 0,2	35,39 ± 0,3

Tabela 1. Valores de FR, V_T, Ṡ_E, Ṡ_{O₂}, Ṡ_E/Ṡ_{O₂}, Suspiro/min, V_T suspiro e T_{abd} de animais veículo e NPLA em normóxia e nos três momentos da coleta de hipóxia, após 20, 40 e 60 minutos de exposição à hipóxia). Dados expressos em média ± EPM. #, p=0,008 vs. veículo.

5. DISCUSSÃO

5.1. Termorregulação no exercício progressivo

No presente estudo, os resultados sugerem uma participação do NO no PVN na termorregulação durante o exercício progressivo. A inibição da enzima nNOS, responsável pela produção endógena de NO, diretamente no PVN com a maior dose de NPLA (0,4 nmol/100nL), observou-se uma atenuação da hipertermia provocada pelo exercício progressivo, entretanto sem alteração na temperatura da pele da cauda. O mesmo efeito foi ausente com a menor dose (0,04 nmol/100nL), ou seja, os animais tiveram um comportamento térmico semelhante aos animais veículo.

A participação do PVN na termorregulação durante exercício tem sido demonstrada na literatura. Um estudo anterior do nosso grupo mostrou que os neurônios do PVN tem uma ativação crescente durante o exercício (Lima *et al.*, 2019), corroborando outros estudos que demonstraram a ativação dos neurônios desse núcleo em animais submetidos ao exercício de corrida (Saito & Soya, 2004; Yanagita *et al.*, 2007; Soya *et al.*, 2007; Barna *et al.*, 2012; Nuñez *et al.*, 2012). Nosso grupo também começou a elucidar a via nitrérgica hipotalâmica que participa das vias termorreguladoras no exercício. Lima e colaboradores (2014), microinjetaram o inibidor inespecífico da NOS, L-NAME, no ventrículo lateral direito de ratos e observaram que a redução da disponibilidade de NO atenuou a expressão de c-FOS induzida pelo exercício no PVN, reduziu a capacidade de dissipação de calor pela pele da cauda e diminuiu o desempenho na corrida. Os animais apresentaram um aumento acentuado na temperatura abdominal, diferentemente do observado no presente estudo. Outros trabalhos do laboratório reiteraram esses resultados. Quando realizada a injeção de L-NAME no ventrículo cerebral lateral direito de ratos, observou-se um aumento acentuado da temperatura corporal no exercício. Conseqüentemente os animais interromperam o exercício antes, comparados aos animais controle (Lacerda *et al.*, 2005). Entretanto, todos os estudos utilizaram injeções de

inibidores inespecíficos da NOS com injeções intracerebroventriculares. Os dados do presente estudo se diferenciam destes mencionados, uma vez que, ao invés de observar aumento da hipertermia durante o exercício (Lacerda et al. 2005), foi encontrada a atenuação do aumento da temperatura corporal. Neste contexto, vale mencionar que as microinjeções ICV podem afetar outras regiões hipotalâmicas. Além disso, o presente estudo foi o primeiro que realizou a inibição específica da nNOS com Nw-Propyl-L-Arginina diretamente no PVN.

A resposta térmica observada na maior dose, é diferente das respostas observadas em trabalhos anteriores. Entendendo que a via de controle termorregulador conta com centros integrativos e o PVN faz parte desta via de controle, a diminuição do NO no PVN teve um efeito atenuador da hipertermia provocada pelo exercício progressivo até a fadiga, entretanto sem alteração na temperatura da pele da cauda. A pele da cauda por ter vasto leito vascular, é a principal via de dissipação de calor durante o exercício em roedores (Romanovsky *et al.*, 2002b), uma vez que as respostas comportamentais são abolidas pelo próprio modelo experimental (Wilson *et al.*, 1978). Entretanto, apesar de não aumentar a dissipação de calor, os animais apresentaram uma menor temperatura corporal, comparado aos animais veículo, no decorrer do exercício progressivo. O exercício com o aumento progressivo da velocidade aumenta o trabalho mecânico, e conseqüentemente aumenta a parcela do trabalho convertida em calor (Brooks *et al.*, 1984; Coyle, 2000), portanto era de se esperar, de acordo com a literatura, que a temperatura dos animais aumentasse mais quando inibida a nNOS no PVN.

Analisando os dados da termorregulação, não foi observada diferença no limiar térmico para dissipação de calor (H_{thr}), a temperatura corporal que ativa os mecanismos de dissipação de calor. Entretanto, a velocidade com que a perda de calor ocorre, ou seja, a variação da temperatura da pele da cauda pela temperatura corporal, denominada de sensibilidade para dissipação de calor (H_{sen}) foi maior nos animais que receberam a maior dose da droga. Esse grupo apresentou um arraste da curva de sensibilidade para a esquerda, mostrando que com

uma menor variação da temperatura corporal, aumentaram rapidamente a temperatura da cauda (Fig 4.3). Associado a esse fato, esse grupo apresentou uma menor taxa de acúmulo de calor comparado aos demais grupos.

A sensibilidade para dissipação de calor aumentada pode interferir no ganho rápido de calor durante o trabalho mecânico do exercício progressivo, podendo interferir na resposta térmica desses animais. Esta via não é completamente elucidada. Considerando que a principal via de dissipação de calor não teve alteração, e o aumento da temperatura abdominal foi atenuado, a resposta pode ser em parte, portanto, pela alteração na sensibilidade à dissipação de calor. Entretanto, outros mecanismos podem estar envolvidos, como uma possível alteração na termogênese pelo tecido adiposo marrom. Apesar da via da termogênese pelo TAM no exercício não ser discutida, o controle autonômico da TAM pelo PVN é descrito na literatura (Amir, 1990; Chitravanshi *et al.*, 2016; Doslikova *et al.*, 2019). Considerando isto, é plausível especular que uma via de inibição da termogênese pelo TAM poderia estar ativa, diminuindo a temperatura corporal dos animais que receberam a maior dose no exercício progressivo. Há pouca evidência sobre ativação do TAM durante exercício agudo, pois tradicionalmente, considera-se que a hipertermia do exercício seja dada principalmente pelo trabalho muscular. Entretanto, inúmeras evidências sugerem que o treinamento físico com natação ou corrida, é capaz de aumentar a atividade termogênica do TAM (Oh-Ishi *et al.*, 1996; De Matteis *et al.*, 2013; Ruiz *et al.*, 2015; Stanford & Goodyear, 2016; Lehnig & Stanford, 2018; Tanaka *et al.*, 2020). É importante frisar que este efeito é observado no repouso, após o treinamento, portanto não elucidada o papel da TAM na regulação térmica durante o exercício agudo.

Um outro possível meio para dissipação de calor é o comportamento ofegante, utilizado por inúmeras espécies de aves e mamíferos. Ofegar ou arfar, altera o padrão respiratório com o aumento da frequência respiratória, e é uma forma de perda de calor evaporativa pelo sistema respiratório (Meyer *et al.*, 1989). Portanto, na hipertermia, a ventilação é ajustada para

responder às demandas homeostáticas imediatamente sinalizadas em núcleos bulbares e pontinos, e influenciada pelas estruturas hipotalâmicas integrativas do sistema termorregulador, ou seja, APO, PVN e outras regiões do hipotálamo (Von Euler *et al.*, 1970; Bradley *et al.*, 1974). Embora ratos não tenham o comportamento de ofegar, estes apresentam um aumento do *drive* respiratório em situações de hipertermia (Boden *et al.*, 2000a), e este controle é mediado pela APO (Boden *et al.*, 2000b). Entendendo a conexão entre a APO e o PVN, este último pode estar relacionado com esse comportamento e pode ser uma possível via para dissipação de calor, uma vez que o PVN contém uma vasta conexão com regiões do tronco encefálico responsáveis pelo controle neural da ventilação (Yeh *et al.*, 1997; Kc *et al.*, 2002; Kc & Dick, 2010; Geerling *et al.*, 2010).

Quanto ao desempenho físico, os animais que receberam a menor dose da droga (0,04 nmol/100nL) não apresentaram alterações nas variáveis térmicas, mas sim uma piora no desempenho físico. Esses animais correram menos, e conseqüentemente atingiram uma menor velocidade máxima de corrida. Uma vez que o trabalho (J) é calculado a partir do tempo e velocidade atingidos, esses animais apresentaram um trabalho diminuído. O grupo que recebeu a maior dose, obteve resultados de desempenho físico semelhantes ao do grupo veículo. Estes resultados são de difícil interpretação, uma vez que as possíveis causas dessas diferenças não foram avaliadas nos experimentos, como por exemplo parâmetros cardiovasculares. Apesar da dose da droga não apresentar alterações na PAM e FC no repouso (Busnardo *et al.*, 2010), pode ser que no exercício progressivo haja diferença nas respostas cardiovasculares entre os grupos com diferentes doses da droga.

Observando as diferenças na termorregulação e desempenho físico entre os grupos, a resultante final das duas análises é a avaliação da eficiência termorreguladora. Esta é calculada pela razão entre o acúmulo de calor e o trabalho, e o resultado é inversamente proporcional, ou seja, quanto maior o valor, menor a eficiência; e quanto menor o valor, maior a eficiência. Dessa

forma, os animais que receberam a menor dose, apresentaram uma menor eficiência termorreguladora. Isso, porque tiveram um comportamento térmico semelhante ao do grupo controle, entretanto, interromperam a corrida antes. O grupo que recebeu a maior dose apresentou uma melhor eficiência termorreguladora, uma vez que apresentou um menor acúmulo de calor, e seu trabalho foi equivalente ao trabalho do grupo veículo (Fig 4.4).

As doses da droga foram escolhidas baseadas em estudos anteriores. Busnardo e colaboradores (2010) observaram que a dose de 4 nmol/100nL foi capaz de alterar parâmetros cardiovasculares basais dos animais, diferentemente de uma menor dose, de 0,04 nmol/100nL, que não alterou os parâmetros basais (Busnardo *et al.*, 2010). Essa menor dose demonstrada, utilizada no presente estudo, obteve diferenças nos parâmetros de desempenho físico e performance. Entretanto, esse efeito da droga ainda não está claro, uma vez que os parâmetros térmicos não modificaram e já que é uma dose que não altera parâmetros fisiológicos basais. No presente estudo foi utilizada também uma dose intermediária, de 0,4 nmol/100nL, na qual foram observadas mudanças dos parâmetros termorreguladores.

Considerando a NPLA uma droga altamente seletiva na inibição da nNOS (Zhang *et al.*, 1997b), estudos com outros modelos animais de ativação do PVN a utilizaram para avaliar a resposta autonômica e cardiovascular de ratos. Raquel e colaboradores (2018) utilizaram o modelo de treinamento por natação ou suplementação com L-Arginina (doador de NO) em ratos sedentários e observaram um aumento da expressão gênica e da proteína nNOS no PVN, além de um aumento no conteúdo endógeno de NO nessa região em ambos os grupos. A inibição da nNOS no PVN com NPLA (4nmol/100nL) provocou um efeito deletério no controle autonômico dos ratos, com aumento da pressão arterial média e da frequência cardíaca, tanto em animais sedentários, quanto em animais treinados. Esses resultados sugerem uma importância da via nitrérgica do PVN na modulação autonômica, inclusive discutida como

sendo uma potencializadora da atividade GABAérgica, diminuindo os disparos autonômicos simpáticos (Zhang & Patel, 1998; Li *et al.*, 2004).

Em contrapartida, Busnardo e colaboradores (2019) utilizaram um modelo de estresse agudo por contenção com a inibição seletiva da nNOS com o Nw-Propyl-L-Arginina (0,04 nmol/100nL) no PVN e observaram um menor aumento da pressão arterial média e da frequência cardíaca, sugerindo uma ação simpatoexcitatória do NO. Além disso, a temperatura da pele da cauda foi avaliada como uma resposta simpática ao estresse por contenção, e foi observada uma menor queda da temperatura da cauda dos animais que receberam a droga, reforçando a ação simpatoexcitatória do NO. Os autores observaram uma importante modulação nitrérgica na via neuroendócrina do PVN, principalmente em neurônios corticotrofinérgicos, sugerindo que a produção do NO esteja envolvida tanto no eixo hipotálamo-hipofisário, quanto nas respostas simpatoadrenais ao estresse (Busnardo *et al.*, 2019). Esses resultados corroboram com resultados anteriores que mostraram uma interação local entre receptores NMDA e a nNOS no controle cardiovascular do PVN (Busnardo *et al.*, 2010).

Entendendo que o NO é uma molécula de sinalização intracelular no SNC (Gadek-Michalska *et al.*, 2013) é amplamente discutido, devido à natureza gasosa do NO, que este pode se espalhar e influenciar outras sinalizações pré e pós sinápticas, bem como a ativação interneuronal nas proximidades de sua liberação (Gadek-Michalska *et al.*, 2013). Portanto o NO no SNC, inclusive no PVN, pode agir tanto na inibição, quanto na excitação do efluxo simpático (Harkin *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2006; Busnardo *et al.*, 2010; Joung *et al.*, 2012; Gadek-Michalska *et al.*, 2013). Esses efeitos contraditórios do NO podem ter relação com o tipo de estímulo estressor e sua duração.

Outro fator a se considerar, é que o PVN possui uma população neuronal heterogênea. Os neurônios parvocelulares pré-autonômicos, moduladores do sistema nervoso simpático

(Ranson *et al.*, 1998), se concentram na porção medial do núcleo, enquanto os neurônios parvocelulares e magnocelulares neuroendócrinos são responsáveis pela produção de ocitocina, vasopressina e corticotrofina (Kuypers & Maisky, 1975; Swanson & Kuypers, 1980). Embora o local da injeção variasse em extensão rostrocaudal, este é um núcleo relativamente pequeno, com um comprimento variável de aproximadamente 1320 μm , e a quantidade da droga injetada bilateralmente tem a capacidade de difundir por uma vasta extensão do núcleo, atingindo regiões pré-autonômicas e neuroendócrinas. Dessa forma, as respostas da inibição da nNOS no PVN, podem ir além da resposta autonômica, e estar envolvida na modulação dos neurônios neuroendócrinos. Sabe-se que o treinamento físico aumenta a expressão de mRNA de neurônios ocitocinérgicos do PVN (Martins *et al.*, 2005), e o exercício agudo aumenta a expressão de c-FOS em neurônios corticotrofinérgicos neste núcleo (Otsuka *et al.*, 2016). Portanto, considerando o NO como um neuromodulador que pode agir em neurônios pré e pós sinápticos, a inibição na nNOS no PVN pode modular a secreção desses hormônios durante o exercício, alterando o comportamento neuroendócrino dos animais.

5.2. Hipóxia

Não foi observada diferença nos parâmetros ventilatórios quando inibida a nNOS no PVN com a dose de 0,4 nmol/100nL de NPLA, comparada ao grupo veículo na exposição aguda à hipóxia à 7% de O_2 . Dentre todas as análises, a única que apresentou diferença foi a relação $\dot{V}E/\dot{V}\text{O}_2$. Observou-se uma diferença pontual, sendo o equivalente ventilatório foi maior no grupo NPLA após 40 minutos de exposição à hipóxia.

No grupo de experimentos de exposição à hipóxia foi utilizada somente uma dose da droga. A dose escolhida foi a que apresentou resultados na termorregulação no protocolo experimental 1, de 0,4 nmol/100nL. Portanto, no presente estudo a dose utilizada não alterou a

resposta ventilatória à hipóxia. É possível especular que a dose não tenha sido suficiente para obter uma resposta.

Diversos estudos demonstraram anteriormente a importância do PVN na via do quimiorreflexo periférico e no controle da ventilação. Como mencionado na seção anterior, uma grande população de neurônios desse núcleo tem projeção direta para regiões do tronco encefálico responsáveis pelo controle respiratório (Geerling *et al.*, 2010), como para o núcleo parabraquial, núcleo ambíguo, neurônios A1 catecolaminérgicos, núcleo do trato solitário, bulbo rostral ventrolateral e núcleo motor do nervo vago (Yeh *et al.*, 1997; Schlenker *et al.*, 2001; Kc *et al.*, 2002; Geerling *et al.*, 2010). Especificamente, neurônios vasopressinérgicos e ocitocinérgicos tem projeção direta para o complexo pré-Bötzinger e para o núcleo do nervo frênico (Kc *et al.*, 2002). Além dessas regiões, o PVN recebe fibras aferentes de outras regiões do cérebro, como o DMH, núcleo arqueado e hipocampo, que tem se mostrado importantes para o controle neural da respiração (Swanson & Sawchenko, 1983; Corfield *et al.*, 1995; RH *et al.*, 1996; Schlenker *et al.*, 1997)

O PVN tem se mostrado importante para o controle refinado da respiração em condições basais. Em ratos anestesiados, a injeção de glutamato neste núcleo aumentou a atividade eletromiográfica do diafragma (Yeh *et al.*, 1997). Já a desinibição do PVN com bicuculina provocou um aumento acentuado da frequência respiratória e volume corrente em ratos acordados, sugerindo que a atividade dos neurônios desse núcleo envolvidos no controle respiratório é suprimido por sinapses GABAérgicas (Schlenker *et al.*, 2001). Além disso, a estimulação do PVN induz uma modulação respiratória via inervações ocitocinérgicas de neurônios PreBötC em ratos anestesiados (Mack *et al.*, 2007), sugerindo que neurônios ocitocinérgicos do PVN contribuem para o drive respiratório em ar ambiente. Um ponto importante é que grande parte dos estudos que demonstram um papel do PVN no controle neural

da ventilação utilizaram modelos roedores anestesiados. O presente estudo apresenta dados com animais acordados, livres de efeitos de anestésico.

Embora a participação do PVN na respiração basal em ar ambiente seja reportada na literatura, o seu papel proeminente no controle respiratório envolve a modulação da ventilação em resposta à hipóxia. King e colaboradores (2012) mostraram que neurônios do NTS se projetam para neurônios ativos no PVN de ratos expostos à hipóxia aguda, e estas projeções ocorrem em maior número comparada à projeção de via clássica do quimiorreflexo NTS-RVLM (King *et al.*, 2012). Posteriormente, esses autores mostraram que na exposição crescente à hipóxia aguda, grande parte dessas projeções são catecolaminérgicas, inclusive advindas de outras regiões, como CVLM e VLM (neurônios A1 e C1 catecolaminérgicos), e que esta ocorre mesmo em exposições menos acentuadas à hipóxia (King *et al.*, 2013, 2015). Recentemente, um estudo mostrou que a via NTS-PVN é recíproca, onde a sinapse que chega ao PVN retorna para o NTS com uma resposta ao quimiorreflexo periférico produzido pela hipóxia, e que esses neurônios são neuropeptidérgicos, coliberadores de catecolaminas e glutamato. Em adição, o estudo mostra que a ativação da via descendente PVN-NTS possivelmente facilita a excitação dos neurônios quimiossensíveis no NTS e melhora a resposta ventilatória à hipóxia (Ruyle *et al.*, 2019b).

Cruz e colaboradores (2008) utilizaram o modelo de ativação do quimiorreflexo com KCN, e observaram um aumento da expressão de FOS em diversas subáreas do PVN, tanto em neurônios neuroendócrinos quanto em neurônios pré-autonômicos, e que grande parte dos neurônios pré-autonômicos recebiam projeções do RVLM (Cruz *et al.*, 2008). Estudos recentes com exposição à hipóxia intermitente aguda sugeriram uma importante participação do PVN no controle cardiovascular (Blackburn *et al.*, 2018). Posteriormente, foi evidenciado que a exposição intermitente aguda à hipóxia com intensidades gradativas, ativa uma população neuronal do PVN corticotrofinérgica. Esses neurônios provavelmente contribuem para a

ativação de componentes neuroendócrinos e autonômicos em resposta à hipóxia intermitente aguda (Oliveira Maruyama *et al.*, 2019).

Recentemente, estudos com modelos de hipóxia aguda e hipóxia intermitente começaram a explorar o papel do óxido nítrico no PVN nas respostas cardiorrespiratórias à hipóxia. Foi observado uma diminuição da proteína nNOS e da expressão do mRNA nNOS no PVN após a exposição crônica à hipóxia intermitente em ratos acordados. Essa resposta foi associada à um aumento crônico da pressão arterial média dos animais (Huang *et al.*, 2007). Os autores discutiram o papel do NO no SNC como um importante agente simpatoinibitório nessas condições. Após 35 dias de exposição à hipóxia intermitente em camundongos, foi observada uma diminuição na produção de NO em neurônios do PVN, e que processos hipertensivos estão relacionados à diminuição da disponibilidade de NO nesse núcleo (Coleman *et al.*, 2010). Coldren e colaboradores (2017) investigaram o papel diferencial do NO no PVN na hipóxia aguda. Os resultados mostraram que tanto neurônios pré-autonômicos quanto neurônios neuroendócrinos que produzem vasopressina e hormônio liberador de corticotrofina expressam a nNOS, entretanto a hipóxia aguda (10% O₂) ativou somente neurônios vasopressinérgicos que não expressaram a nNOS. Neurônios corticotrofinérgicos que expressaram nNOS estavam ativos na hipóxia aguda, diferentemente de neurônios pré-autonômicos, que não foram ativados (Coldren *et al.*, 2017). Esses achados foram diferentes de estudos anteriores discutidos acima que demonstraram um aumento do disparo simpático e a ativação desse subtipo de neurônios no PVN. Nesse estudo também foi discutido que a exposição à 10% de O₂ pode ser de intensidade moderada, podendo não ter sido capaz de alterar os disparos autonômicos simpáticos. Ainda não foi descrito na literatura como a inibição específica da isoforma neuronal da NOS no PVN poderia modular as respostas ventilatórias à hipóxia. Dessa forma, este foi o primeiro estudo que se propôs a avaliar essas respostas. Entretanto, com a dose utilizada neste modelo de exposição à hipóxia não foi observado nenhum efeito.

Outra variável avaliada durante a hipóxia, a temperatura corporal, revelou ausência de diferenças entre os grupos (veículo e droga) na anapirexia, ou queda regulada da temperatura corporal. Ambos, NPLA e veículo, tiveram uma queda da temperatura em limites semelhantes, portanto a inibição da nNOS com NPLA na dose de 0,4 nmol/100nL não foi capaz de alterar a resposta anapiréxica à hipóxia aguda.

A anapirexia é produzida como uma resposta à baixa disponibilidade de O₂, e a queda da temperatura corporal diminui o consumo de oxigênio, uma vez que reduz a demanda tecidual de O₂ (Wood, 1991). Portanto essa resposta atenua o dispêndio energético provocado pelo aumento da ventilação, balanceando as demanda metabólicas de O₂. As vias controladoras da anapirexia ainda não estão elucidadas, mas considerando que esta depende do centro integrador termorregulador, sendo esse a APO e núcleos hipotalâmicos como o PVN, a modulação nitrérgica neste último poderia alterar as respostas térmicas à hipóxia, uma vez que esses centros modulam a ação dos termofetores (Nagashima *et al.*, 2000; Romanovsky, 2007; Bicego *et al.*, 2007b).

Era esperado que a inibição da enzima nNOS no PVN agisse contra a anapirexia, atenuando a diminuição da temperatura corporal na hipóxia. Já foi mostrado que o NO no SNC desempenha um importante papel na resposta anapiréxica à hipóxia (Fabris *et al.*, 1999; Steiner *et al.*, 2000; De Paula & Branco, 2003). Especificamente na APO, foi mostrado que o NO age a favor da anapirexia, induzindo o aumento das concentrações intracelulares de GMPc, aumentando a atividade celular e diminuindo assim, a temperatura corporal (Pereira *et al.*, 2006).

Considerando a discussão anterior sobre a termorregulação no exercício progressivo, sabe-se que o PVN está altamente ativado nessas condições de hipertermia. Apesar de nesta condição o corpo estar com a temperatura corporal aumentada e o organismo agir a favor da perda de calor, é importante elucidar que ambas respostas térmicas agem nos termofetores para

diminuir a temperatura corporal. Isto, porque na anapirexia, o organismo age a favor da perda de calor, mesmo a temperatura interna estando baixa. Portanto, provavelmente a via efetora termorreguladora está ativa para ambas as circunstâncias agindo na mesma direção e com mesmo efluxo eferente sináptico para os órgãos alvo.

A partir dos resultados do protocolo experimental 1, cuja inibição da nNOS no PVN atenuou a hipertermia provocada pelo exercício físico, sabe-se que o NO é importante para modular as respostas térmicas no exercício, e poderia assim modular também as respostas anapiréticas à hipóxia.

Dessa forma, é importante elucidar que este foi o primeiro estudo que realizou a inibição específica da nNOS no PVN para avaliar as respostas ventilatórias e térmicas na exposição à hipóxia aguda. Uma vez que foi utilizada somente uma dose, sendo esta escolhida com base nos resultados do protocolo experimental 1, não foi observada diferença nos parâmetros ventilatórios nem térmicos na exposição à hipóxia.

6. CONCLUSÃO

6.1. Termorregulação no exercício progressivo

A inibição específica da nNOS com NPLA no PVN provocou uma atenuação na hipertermia provocada pelo exercício progressivo quando utilizada a maior dose da droga (0,4 nmol/100nL), entretanto, não houve alteração na temperatura da cauda. Neste grupo, não houve diferença no limiar para dissipação de calor, entretanto foi observado um aumento na sensibilidade à dissipação de calor. Em contrapartida, o grupo que recebeu a menor dose (0,04 nmol/100nL) apresentou o comportamento térmico no decorrer do exercício semelhante ao grupo veículo. O desempenho do grupo que recebeu a maior dose foi semelhante ao grupo veículo, e o grupo que recebeu a menor dose apresentou um declínio no desempenho ao exercício progressivo. Assim, a partir desses resultados, sugere-se que o NO no PVN teria um comportamento simpatoexcitatório para os mecanismos geradores da hipertermia no exercício progressivo agudo, uma vez que a redução de sua produção endógena atenuou a hipertermia durante o exercício.

6.2. Hipóxia

A inibição da nNOS no PVN em ratos expostos à hipóxia aguda a 7% de O₂ não alterou a resposta ventilatória à hipóxia. Os parâmetros ventilatórios não foram afetados pela inibição da nNOS na dose utilizada. Não houve diferença na resposta térmica entre os grupos. Em suma, esta dose da droga não foi capaz de alterar a resposta ventilatória e a resposta térmica à hipóxia.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abrahams VC, Hilton SM & Zbrożyna A (1960). Active muscle vasodilatation produced by stimulation of the brain stem: its significance in the defence reaction. *J Physiol* **154**, 491–513.
- Alheid GF, Jiao W & McCrimmon DR (2011). Caudal nuclei of the rat nucleus of the solitary tract differentially innervate respiratory compartments within the ventrolateral medulla. *Neuroscience* **190**, 207–227.
- Almeida MC, Vizin RCL & Carrettiero DC (2015). Current understanding on the neurophysiology of behavioral thermoregulation. *Temperature* **2**, 483–490.
- Amir S (1990). Stimulation of the paraventricular nucleus with glutamate activates interscapular brown adipose tissue thermogenesis in rats. *Brain Res* **508**, 152–155.
- Amir S & De Blasio E (1991). Activation of brown adipose tissue thermogenesis by chemical stimulation of the hypothalamic supraoptic nucleus. *Brain Res* **563**, 349–352.
- Balthazar CH, Leite LHR, Rodrigues AG & Coimbra CC (2009). Pharmacology , Biochemistry and Behavior Performance-enhancing and thermoregulatory effects of intracerebroventricular dopamine in running rats. *Pharmacol Biochem Behav* **93**, 465–469.
- Barna BF, Takakura AC & Moreira TS (2012). Pontomedullary and hypothalamic distribution of Fos-like immunoreactive neurons after acute exercise in rats. *Neuroscience* **212**, 120–130.
- Barros RCH & Branco LGS (2002). Central dopamine modulates anapyrexia but not hyperventilation induced by hypoxia. *J Appl Physiol* **92**, 975–981.

- Barros RCH, Branco LGS & Cárnio EC (2004). Evidence for thermoregulation by dopamine D1 and D2 receptors in the anteroventral preoptic region during normoxia and hypoxia. *Brain Res* **1030**, 165–171.
- Barros RCH, Branco LGS & Cárnio EC (2006). Respiratory and body temperature modulation by adenosine A1 receptors in the anteroventral preoptic region during normoxia and hypoxia. *Respir Physiol Neurobiol* **153**, 115–125.
- Bartlett D & Tenney SM (1970). Control of breathing in experimental anemia. *Respir Physiol* **10**, 384–395.
- Berquin P, Bodineau L, Gros F & Larnicol N (2000). Brainstem and hypothalamic areas involved in respiratory chemoreflexes: A Fos study in adult rats. *Brain Res* **857**, 30–40.
- Bianchi AL, Denavit-Saubie M & Champagnat J (1995). Central control of breathing in mammals: Neuronal circuitry, membrane properties, and neurotransmitters. *Physiol Rev* **75**, 1–45.
- Bicego KC, Barros RCH & Branco LGS (2007a). Physiology of temperature regulation : Comparative aspects ☆. *Comp Biochem Physiol* **147**, 616–639.
- Bicego KC, Barros RCH & Branco LGS (2007b). Physiology of temperature regulation: Comparative aspects. *Comp Biochem Physiol - A Mol Integr Physiol* **147**, 616–639.
- Blackburn MB, Andrade MA & Toney GM (2018). Hypothalamic PVN contributes to acute intermittent hypoxia-induced sympathetic but not phrenic long-term facilitation. *J Appl Physiol* **124**, 1233–1243.
- Boden AG, Harris MC & Parkes MJ (2000a). A respiratory drive in addition to the increase in CO₂ production at raised body temperature in rats. *Exp Physiol* **85**, 309–319.

- Boden AG, Harris MC & Parkes MJ (2000b). The preoptic area in the hypothalamus is the source of the additional respiratory drive at raised body temperature in an anaesthetised rats. *Exp Physiol* **85**, 527–537.
- Bondarenko E, Beig MI, Hodgson DM, Braga VA & Nalivaiko E (2015). Blockade of the dorsomedial hypothalamus and the perifornical area inhibits respiratory responses to arousing and stressful stimuli. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol* **308**, R816–R822.
- Bondarenko E, Hodgson DM & Nalivaiko E (2014). Amygdala mediates respiratory responses to sudden arousing stimuli and to restraint stress in rats. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol*; DOI: 10.1152/ajpregu.00528.2013.
- Boulant JA (2000). Role of the Preoptic-Anterior Hypothalamus in Thermoregulation and Fever. *Clin Infect Dis* **31**, 157–161.
- Boulant JA (2006). Neuronal basis of Hammel's model for set-point thermoregulation. *J Appl Physiol* **100**, 1347–1354.
- Bradley GW, Euler C von, Marttila I & Roos B (1974). Steady State Effects of CO₂ and Temperature on the Relationship between Lung Volume and Inspiratory Duration (Hering-Breuer Threshold Curve). *Acta Physiol Scand* **92**, 351–363.
- Branco LGS, Glass ML, Wang T & Hoffmann A (1993). Temperature and central chemoreceptor drive to ventilation in toad (*Bufo paracnemis*). *Respir Physiol* **93**, 337–346.
- Branco LGS, Soriano RN & Steiner AA (2014). Gaseous mediators in temperature regulation. *Compr Physiol* **4**, 1301–1338.

- Bredt DS (1999). Endogenous nitric oxide synthesis: Biological functions and pathophysiology. In *Free Radical Research*, pp. 577–596. Harwood Academic Publishers GmbH.
- Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR & Snyder SH (1991). Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* **351**, 714–718.
- Briese E (1998). Normal Body Temperature of Rats : The Setpoint Controversy. *Neurosci Biobehav Rev* **22**, 427–436.
- Brooks A, Donovan CM & White P (1984). Estimation of anaerobic energy production and efficiency in rats during exercise. *J Appl Physiol* **56**, 520–525.
- Busnardo C, Crestani CC, Scopinho AA, Packard BA, Resstel LBM, Correa FMA & Herman JP (2019). Nitrenergic neurotransmission in the paraventricular nucleus of the hypothalamus modulates autonomic, neuroendocrine and behavioral responses to acute restraint stress in rats. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry* **90**, 16–27.
- Busnardo C, Crestani CC, Tavares RF, Resstel LBM & Correa FMA (2010). Cardiovascular responses to l-glutamate microinjection into the hypothalamic paraventricular nucleus are mediated by a local nitric oxide-guanylate cyclase mechanism. *Brain Res* **1344**, 87–95.
- Busnardo C, Ferreira-Junior NC, Cruz JC, Machado BH, Correa FMA & Resstel LBM (2013). Cardiovascular responses to ATP microinjected into the paraventricular nucleus are mediated by nitric oxide and NMDA glutamate receptors in awake rats. *Exp Physiol* **98**, 1411–1421.

- Busnardo C, Tavares RF, Antunes-Rodrigues J & Correa FMA (2007). Cardiovascular effects of L -glutamate microinjection in the supraoptic nucleus of unanaesthetized rats. *Neuropharmacology* **52**, 1378–1384.
- Calabrese V, Mancuso C, Calvani M, Rizzarelli E, Butterfield DA & Stella AMG (2007). Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nat Rev Neurosci* **8**, 766–775.
- Cao WH, Fan W & Morrison SF (2004). Medullary pathways mediating specific sympathetic responses to activation of dorsomedial hypothalamus. *Neuroscience* **126**, 229–240.
- Carrive P & Gorissen M (2008). Premotor sympathetic neurons of conditioned fear in the rat. *Eur J Neurosci* **28**, 428–446.
- Cham JL & Badoer E (2008). Hypothalamic paraventricular nucleus is critical for renal vasoconstriction elicited by elevations in body temperature. *Am J Physiol - Ren Physiol* **294**, F309–F315.
- Cham JL, Klein R, Owens NC, Mathai M, Mckinley M, Badoer E, Lee J, Klein R, Owens NC, Mathai M, Mckinley M & Badoer E (2006). Activation of spinally projecting and nitrenergic neurons in the PVN following heat exposure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **291**, 91–101.
- Cheng A, Wang S, Cai J, Rao MS & Mattson MP (2003). Nitric oxide acts in a positive feedback loop with BDNF to regulate neural progenitor cell proliferation and differentiation in the mammalian brain. *Dev Biol* **258**, 319–333.
- Chitravanshi VC, Kawabe K & Sapru HN (2016). Stimulation of the hypothalamic arcuate nucleus increases brown adipose tissue nerve activity via hypothalamic paraventricular and dorsomedial nuclei. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol* **311**, H433–H444.

- Coldren KM, Li D-P, Kline DD, Hasser EM & Heesch CM (2017). Acute hypoxia activates neuroendocrine, but not presympathetic, neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus: differential role of nitric oxide. *Am J Physiol Integr Comp Physiol* **312**, R982–R995.
- Coleman CG, Wang G, Park L, Anrather J, Delagrammatikas GJ, Chan J, Zhou J, Iadecola C & Pickel VM (2010). Chronic intermittent hypoxia induces NMDA receptor-dependent plasticity and suppresses nitric oxide signaling in the mouse hypothalamic paraventricular nucleus. *J Neurosci* **30**, 12103–12112.
- Cordeiro LMS, Rabelo PCR, Moraes MM, Teixeira-Coelho F, Coimbra CC, Wanner SP & Soares DD (2017). Physical exercise-induced fatigue: the role of serotonergic and dopaminergic systems. *Brazilian J Med Biol Res* **50**, 1–13.
- Corfield DR, Fink GR, Ramsay SC, Murphy K, Harty HR, Watson JD, Adams L, Frackowiak RS & Guz A (1995). Evidence for limbic system activation during CO₂-stimulated breathing in man. *J Physiol* **488**, 77–84.
- Coyle EF (2000). Physical activity as a metabolic stressor. In *American Journal of Clinical Nutrition*, pp. 512–520.
- Cross KW, Tizard JP & Trythall DA (1958). The gaseous metabolism of the newborn infant breathing 15% oxygen. *Acta Paediatr* **47**, 217–237.
- Cruz JC, Bonagamba LGH, Machado BH, Biancardi VC & Stern JE (2008). Intermittent activation of peripheral chemoreceptors in awake rats induces Fos expression in rostral ventrolateral medulla-projecting neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Neuroscience* **157**, 463–472.

- Cui Y, Kam K, Sherman D, Janczewski WA, Zheng Y & Feldman JL (2016). Defining preBötzinger Complex Rhythm- and Pattern-Generating Neural Microcircuits In Vivo. *Neuron* **91**, 602–614.
- Cui Z, Fisher JA & Duffin J (2012). Central-peripheral respiratory chemoreflex interaction in humans. *Respir Physiol Neurobiol* **180**, 126–131.
- Dampney RAL (2016). Central neural control of the cardiovascular system: Current perspectives. *Adv Physiol Educ* **40**, 283–296.
- Dawson TM & Snyder SH (1994). Gases as biological messengers: Nitric oxide and carbon monoxide in the brain. *J Neurosci* **14**, 5147–5159.
- Dinerman JL, Dawson TM, Schell MJ, Snowman A & Snyder SH (1994). Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: Implications for synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 4214–4218.
- Doslikova B, Tchir D, McKinty A, Zhu X, Marks DL, Baracos VE & Colmers WF (2019). Convergent neuronal projections from paraventricular nucleus, parabrachial nucleus, and brainstem onto gastrocnemius muscle, white and brown adipose tissue in male rats. *J Comp Neurol* **527**, 2826–2842.
- Drummond LR, Kunstetter AC, Vaz FF, Campos HO, De Andrade AGP, Coimbra CC, Natali AJ, Wanner SP & Prímola-Gomes TN (2016). Brain Temperature in Spontaneously Hypertensive Rats during Physical Exercise in Temperate and Warm Environments. *PLoS One*; DOI: 10.1371/journal.pone.0155919.
- Duan YF, Winters R, McCabe PM, Green EJ, Huang Y & Schneiderman N (1997). Cardiorespiratory components of defense reaction elicited from paraventricular nucleus. *Physiol Behav* **61**, 325–330.

- Von Euler C, Herrero F & Ira W (1970). Control mechanisms determining rate and depth of respiratory movements. *Respir Physiol* **10**, 93–108.
- Fabris G, Anselmo-Franci JA & Branco LGS (1999). Role of nitric oxide in hypoxia-induced hyperventilation and hypothermia: Participation of the locus coeruleus. *Brazilian J Med Biol Res* **32**, 1389–1398.
- Feldman JL & Del Negro CA (2006). Looking for inspiration: New perspectives on respiratory rhythm. *Nat Rev Neurosci* **7**, 232–242.
- Fenelon K, Seifert EL & Mortola JP (2000). Hypoxic depression of circadian oscillations in sino-aortic denervated rats. *Respir Physiol* **122**, 61–69.
- Fink BR, Katz R, Reinhold H & Schoolman A (1962). Suprapontine mechanisms in regulation of respiration. *Am J Physiol* **202**, 217–220.
- Frappell P, Lanthier C, Baudinette R V. & Mortola JP (1992). Metabolism and ventilation in acute hypoxia: A comparative analysis in small mammalian species. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol*; DOI: 10.1152/ajpregu.1992.262.6.r1040.
- Fregosi RF & Mitchell GS (1994). Long-term facilitation of inspiratory intercostal nerve activity following carotid sinus nerve stimulation in cats. *J Physiol* **477**, 469–479.
- Fukushi I, Yokota S & Okada Y (2019). The role of the hypothalamus in modulation of respiration. *Respir Physiol Neurobiol* **265**, 172–179.
- Gadek-Michalska A, Tadeusz J, Rachwalska P & Bugajski J (2013). Cytokines, prostaglandins and nitric oxide in the regulation of stress-response systems. *Pharmacol Reports* **65**, 1655–1662.
- Galler S, Hilber K & Göbesberger A (1997). Effects of nitric oxide on force-generating proteins of skeletal muscle. *Pflugers Arch Eur J Physiol* **434**, 242–245.

- Galloway SDR & Maughan RJ (1997). Effects of ambient temperature on the capacity to perform prolonged cycle exercise in man. *Med Sci Sports Exerc* **29**, 1240–1249.
- Gargaglioni LH, Bicego KC, Nucci TB & Branco LGS (2006). Serotonergic receptors in the anteroventral preoptic region modulate the hypoxic ventilatory response. *Respir Physiol Neurobiol* **153**, 1–13.
- Gargaglioni LH, Steiner AA & Branco LGS (2005). Involvement of serotonergic receptors in the anteroventral preoptic region on hypoxia-induced hypothermia. *Brain Res* **1044**, 16–24.
- Gautier H, Bonora M, Schultz SA & Remmers JE (1987). Hypoxia-induced changes in shivering and body temperature. *J Appl Physiol* **62**, 2477–2484.
- Geerling JC, Shin JW, Chimenti PC & Loewy AD (2010). Paraventricular hypothalamic nucleus: Axonal projections to the brainstem. *J Comp Neurol* **518**, 1460–1499.
- Gellhorn E & Janus A (1936). THE INFLUENCE OF PARTIAL PRESSURE OF O₂ ON BODY TEMPERATURE. *Am J Physiol Content* **116**, 327–329.
- de Git KCG, van Tuijl DC, Lujendijk MCM, Wolterink-Donselaar IG, Ghanem A, Conzelmann KK & Adan RAH (2018). Anatomical projections of the dorsomedial hypothalamus to the periaqueductal grey and their role in thermoregulation: a cautionary note. *Physiol Rep*; DOI: 10.14814/phy2.13807.
- Gordon CJ (1990). Thermal biology of the laboratory rat. *Physiol Behav* **47**, 963–991.
- Gordon CJ (2001). The therapeutic potential of regulated hypothermia. *Emerg Med J* **18**, 81–89.
- Guix FX, Uribesalgo I, Coma M & Muños FJ (2005). The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. *Prog Neurobiol* **76**, 126–152.

- Guyenet PG (2006). The sympathetic control of blood pressure. *Nat Rev Neurosci* **7**, 335–346.
- H. Barros RC & S. Branco LG (2000). Role of central adenosine in the respiratory and thermoregulatory responses to hypoxia. *Neuroreport* **11**, 193–197.
- Harkin AJ, Bruce KH, Craft B & Paul IA (1999). Nitric oxide synthase inhibitors have antidepressant-like properties in mice. 1. Acute treatments are active in the forced swim test. *Eur J Pharmacol* **372**, 207–213.
- Hartley LH, Mason JW, Hogan RP, Jones LG, Kotchen TA, Mougey EH, Wherry FE, Pennington LL & Ricketts PT (1972). Multiple hormonal responses to graded exercise in relation to physical training. *J Appl Physiol* **33**, 602–606.
- Hill JR (1959). The oxygen consumption of new-born and adult mammals. Its dependence on the oxygen tension in the inspired air and on the environmental temperature. *J Physiol* **149**, 346–373.
- Holt SJ, Wheal H V. & York DA (1987). Hypothalamic control of brown adipose tissue in Zucker lean and obese rats. Effect of electrical stimulation of the ventromedial nucleus and other hypothalamic centres. *Brain Res* **405**, 227–233.
- Housley GD & Sinclair JD (1988). Localization by kainic acid lesions of neurones transmitting the carotid chemoreceptor stimulus for respiration in rat. *J Physiol* **406**, 99–114.
- Huang J, Tamisier R, Ji E, Tong J & Weiss WJ (2007). Chronic intermittent hypoxia modulates nNOS mRNA and protein expression in the rat hypothalamus. *Respir Physiol Neurobiol* **158**, 30–38.

Huang PL (1999). Neuronal and endothelial nitric oxide synthase gene knockout mice.

Brazilian J Med Biol Res **32**, 1353–1359.

Iigaya K, Horiuchi J, McDowall LM, Lam ACB, Sediqi Y, Polson JW, Carrive P & Dampney

RAL (2012). Blockade of orexin receptors with Almorexant reduces cardiorespiratory

responses evoked from the hypothalamus but not baro- or chemoreceptor reflex

responses. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol*; DOI:

10.1152/ajpregu.00263.2012.

Ikeda K, Kawakami K, Onimaru H, Okada Y, Yokota S, Koshiya N, Oku Y, Makito Iizuka &

Koizumi H (2017). The respiratory control mechanisms in the brainstem and spinal cord:

integrative views of the neuroanatomy and neurophysiology. *J Physiol Sci* **67**, 45–62.

Inenaga K, Osaka T & Yamashita H (1987). Thermosensitivity of neurons in the

paraventricular nucleus of the rat slice preparation. *Brain Res* **424**, 126–132.

IUPS Thermal Commission (2001). Glossary of terms for thermal physiology. *Jpn J Physiol* **51**,

245–280.

Joung HY, Jung EY, Kim K, Lee MS, Her S & Shim I (2012). The differential role of NOS

inhibitors on stress-induced anxiety and neuroendocrine alterations in the rat. *Behav*

Brain Res **235**, 176–181.

Kabir MM, Beig MI, Baumert M, Trombini M, Mastorci F, Sgoifo A, Walker FR, Day TA &

Nalivaiko E (2010). Respiratory pattern in awake rats: Effects of motor activity and of

alerting stimuli. *Physiol Behav* **101**, 22–31.

Kc P, Balan K V., Tjoe SS, Martin RJ, LaManna JC, Haxhiu MA & Dick TE (2010).

Increased vasopressin transmission from the paraventricular nucleus to the rostral

medulla augments cardiorespiratory outflow in chronic intermittent hypoxia-conditioned

- rats. *J Physiol* **588**, 725–740.
- Kc P & Dick TE (2010). Modulation of cardiorespiratory function mediated by the paraventricular nucleus. *Respir Physiol Neurobiol* **174**, 55–64.
- Kc P, Haxhiu MA, Trouth CO, Balan K V., Anderson WA & Mack SO (2002). CO₂-induced c-Fos expression in hypothalamic vasopressin containing neurons. *Respir Physiol* **129**, 289–296.
- Kellogg DL (2006). In vivo mechanisms of cutaneous vasodilation and vasoconstriction in humans during thermoregulatory challenges. *J Appl Physiol* **100**, 1709–1718.
- King TL, Heesch CM, Clark CG, Kline DD, Hasser EM & Hasser EM (2012). Hypoxia activates nucleus tractus solitarii neurons projecting to the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **302**, 1219–1232.
- King TL, Kline DD, Ruyle BC, Heesch CM, Hasser EM & Hasser EM (2013). Acute systemic hypoxia activates hypothalamic paraventricular nucleus-projecting catecholaminergic neurons in the caudal ventrolateral medulla. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **305**, 1112–1123.
- King TL, Ruyle BC, Kline DD, Heesch CM & Hasser EM (2015). Catecholaminergic neurons projecting to the paraventricular nucleus of the hypothalamus are essential for cardiorespiratory adjustments to hypoxia. *Am J Physiol Integr Comp Physiol* **309**, R721–R731.
- Kiyatkin EA (2007). Brain temperature fluctuations during physiological and pathological conditions. *Eur J Appl Physiol* **101**, 3–17.
- Kobayashi S (1989). Temperature-sensitive neurons in the hypothalamus: A new hypothesis that they act as thermostats, not as transducers. *Prog Neurobiol* **32**, 103–135.

- Koshiya N & Guyenet PG (1996). NTS neurons with carotid chemoreceptor inputs arborize in the rostral ventrolateral medulla. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol*; DOI: 10.1152/ajpregu.1996.270.6.r1273.
- Kuriyama K & Ohkuma S (1995). Role of Nitric Oxide in Central Synaptic Transmission: Effects on Neurotransmitter Release. *Jpn J Pharmacol* **69**, 1–8.
- Kuwaki T (2010a). Hypothalamic modulation of breathing. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*, pp. 243–247. Adv Exp Med Biol.
- Kuwaki T (2010b). Hypothalamic modulation of breathing. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*, pp. 243–247.
- Kuypers HGJM & Maisky VA (1975). Retrograde axonal transport of horseradish peroxidase from spinal cord to brain stem cell groups in the cat. *Neurosci Lett* **1**, 9–14.
- Kwiatkoski M, Soriano RN, Francescato HDC, Batalhao ME, Coimbra TM, Carnio EC & Branco LGS (2012). Hydrogen sulfide as a cryogenic mediator of hypoxia-induced anapnoea. *Neuroscience* **201**, 146–156.
- Lacerda ACR, Marubayashi U, Balthazar H & Coimbra C (2006). Evidence that brain nitric oxide inhibition increases metabolic cost of exercise, reducing running performance in rats. *Neurosci Lett* **393**, 260–263.
- Lacerda ACR, Marubayashi U & Coimbra CC (2005). Nitric oxide pathway is an important modulator of heat loss in rats during exercise. *Brain Res Bull* **67**, 110–116.
- Lee KZ & Fuller DD (2010). Hypoxia-induced short-term potentiation of respiratory-modulated facial motor output in the rat. *Respir Physiol Neurobiol* **173**, 107–111.
- Lehnig AC & Stanford KI (2018). Exercise-induced adaptations to white and brown adipose tissue. *J Exp Biol*; DOI: 10.1242/jeb.161570.

- Leite LHR, Zheng H & Patel KP (2012). Contribution of the paraventricular nucleus in autonomic adjustments to heat stress. *Exp Biol Med* **237**, 570–577.
- Li DP, Chen SR, Finnegan TF & Pan HL (2004). Signalling pathway of nitric oxide in synaptic GABA release in the rat paraventricular nucleus. *J Physiol* **554**, 100–110.
- Li N, Li A & Nattie E (2013). Focal microdialysis of CO₂ in the perifornical-hypothalamic area increases ventilation during wakefulness but not NREM sleep. *Respir Physiol Neurobiol* **185**, 349–355.
- Li Y, Jackson KL, Stern JE, Rabeler B & Patel KP (2006). Interaction between glutamate and GABA systems in the integration of sympathetic outflow by the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Am J Physiol Hear Circ* **5850**, 2847–2857.
- Lima PMA, Campos HO, Fóscolo DRC, Szawka RE, Wanner SP & Coimbra CC (2019). The time-course of thermoregulatory responses during treadmill running is associated with running duration-dependent hypothalamic neuronal activation in rats. *Brain Struct Funct* **224**, 2775–2786.
- Lima PMA, Santiago HP, Szawka RE & Coimbra CC (2014). Central blockade of nitric oxide transmission impairs exercise-induced neuronal activation in the PVN and reduces physical performance. *Brain Res Bull* **108**, 80–87.
- López-Barneo J, Pardal R & Ortega-Sáenz P (2001). Cellular Mechanism of Oxygen Sensing. *Annu Rev Physiol* **63**, 259–287.
- De Luca B, Monda M & Sullo A (1995). Changes in eating behavior and thermogenic activity following inhibition of nitric oxide formation. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol*; DOI: 10.1152/ajpregu.1995.268.6.r1533.

- Mack SO, Kc P, Wu M, Coleman BR, Tolentino-Silva FP & Haxhiu MA (2002). Paraventricular oxytocin neurons are involved in neural modulation of breathing. *J Appl Physiol* **92**, 826–834.
- Mack SO, Wu M, Kc P & Haxhiu MA (2007). Stimulation of the hypothalamic paraventricular nucleus modulates cardiorespiratory responses via oxytocinergic innervation of neurons in pre-Bötzinger complex. *J Appl Physiol* **102**, 189–199.
- Madden CJ & Morrison SF (2005). Hypoxic activation of arterial chemoreceptors inhibits sympathetic outflow to brown adipose tissue in rats. *J Physiol* **566**, 559–573.
- Madden CJ & Morrison SF (2009). Neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus inhibit sympathetic outflow to brown adipose tissue. *Am J Physiol - Regul Integr Comp* **296**, 831–843.
- Malan A (1973). Ventilation measured by body plethysmography in hibernating mammals and in poikilotherms. *Respir Physiol* **17**, 32–44.
- Martins AS, Crescenzi A, Stern JE, Bordin S & Michelini LC (2005). Hypertension and exercise training differentially affect oxytocin and oxytocin receptor expression in the brain. *Hypertension* **46**, 1004–1009.
- Maruyama M, Nishi M, Konishi M, Takashige Y, Nagashima K, Kiyohara T & Kanosue K (2003). Brain regions expressing Fos during thermoregulatory behavior in rats. *Am J Physiol Integr Comp Physiol* **285**, R1116–R1123.
- De Matteis R, Lucertini F, Guescini M, Polidori E, Zeppa S, Stocchi V, Cinti S & Cuppini R (2013). Exercise as a new physiological stimulus for brown adipose tissue activity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* **23**, 582–590.

- McAllister RM, Hirai T & Musch TI (1995). Contribution of endothelium-derived nitric oxide (EDNO) to the skeletal muscle blood flow response to exercise. *Med Sci Sports Exerc* **27**, 1145–1151.
- McDowall LM, Horiuchi J & Dampney RAL (2007). Effects of disinhibition of neurons in the dorsomedial hypothalamus on central respiratory drive. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol*; DOI: 10.1152/ajpregu.00503.2007.
- Meyer M, Hahn G, Buess C, Mesch U & Piiper J (1989). Pulmonary gas exchange in panting dogs. *J Appl Physiol* **66**, 1258–1263.
- Miller MJ & Tenney SM (1975). Hypoxia-induced tachypnea in carotid-deafferented cats. *Respir Physiol* **23**, 31–39.
- Moncada S, Palmer RM & Higgs EA (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* **43**, 109–142.
- Monda M, Amaro S, Sullo A & De Luca B (1995). Nitric Oxide Reduces Body Temperature and Sympathetic Input to Brown Adipose Tissue During PGE1-Hyperthermia. *Brain Res Bull* **38**, 489–493.
- Monti JM & Jantos H (2004). Effects of L-arginine and SIN-1 on sleep and waking in the rat during both phases of the light-dark cycle. *Life Sci* **75**, 2027–2034.
- Morrison SF & Nakamura K (2011). Central neural pathways for thermoregulation. *Front Biosci* **16**, 74–104.
- Morrison SF, Nakamura K & Madden CJ (2008). Central control of thermogenesis in mammals. *Exp Physiol* **93**, 773–797.

- Mota CMD, Branco LGS, Morrison SF & Madden CJ (2020). Systemic serotonin inhibits brown adipose tissue sympathetic nerve activity via a GABA input to the dorsomedial hypothalamus, not via 5HT1A receptor activation in raphe pallidus. *Acta Physiol*; DOI: 10.1111/apha.13401.
- Murasato Y, Hirakawa H, Harada Y, Nakamura T & Hayashida Y (1998). Effects of systemic hypoxia on R-R interval and blood pressure variabilities in conscious rats. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*; DOI: 10.1152/ajpheart.1998.275.3.h797.
- Nagashima K (2006). Central Mechanisms for Thermoregulation in a Hot Environment. *Ind Health* **44**, 359–367.
- Nagashima K, Nakai S, Tanaka M & Kanosue K (2000). Neuronal circuitries involved in thermoregulation. *Auton Neurosci Basic Clin* **85**, 18–25.
- Nambu T, Sakurai T, Mizukami K, Hosoya Y, Yanagisawa M & Goto K (1999). Distribution of orexin neurons in the adult rat brain. *Brain Res* **827**, 243–260.
- Del Negro CA, Funk GD & Feldman JL (2018). Breathing matters. *Nat Rev Neurosci* **19**, 351–367.
- Núñez P, Perillan C, Vijande M & Arguelles J (2012). Progressive training effects on neuronal hypothalamic activation in the rat. *Neurosci Lett* **517**, 113–117.
- Oh-Ishi S, Kizaki T, Toshinai K, Haga S, Fukuda K, Nagata N & Ohno H (1996). Swimming training improves brown-adipose-tissue activity in young and old mice. *Mech Ageing Dev* **89**, 67–78.
- Ohkuma S, Katsura M, Gou JL, Narihara H, Hasegawa T & Kuriyama K (1996). Role of peroxynitrite in [3H] γ -aminobutyric acid release evoked by nitric oxide and its mechanism. *Eur J Pharmacol* **301**, 179–188.

- Ohkuma S, Narihara H, Katsura M, Hasegawa T & Kuriyama K (1995). Nitric Oxide-Induced [3H]GABA Release from Cerebral Cortical Neurons Is Mediated by Peroxynitrite. *J Neurochem* **65**, 1109–1114.
- Okazawa M, Takao K, Hori A, Shiraki T, Matsumura K & Kobayashi S (2002). Ionic Basis of Cold Receptors Acting as Thermostats. *J Neurosci* **22**, 3994–4001.
- Olivan M V., Bonagamba LGH & Machado BH (2001). Involvement of the paraventricular nucleus of the hypothalamus in the pressor response to chemoreflex activation in awake rats. *Brain Res* **895**, 167–172.
- Oliveira Maruyama N, Mitchell NC, Truong TT & Toney GM (2019). Activation of the hypothalamic paraventricular nucleus by acute intermittent hypoxia: Implications for sympathetic long-term facilitation neuroplasticity. ; DOI: 10.1016/j.expneurol.2018.12.011.
- Otsuka T, Nishii A, Amemiya S, Kubota N, Nishijima T & Kita I (2016). Effects of acute treadmill running at different intensities on activities of serotonin and corticotropin-releasing factor neurons, and anxiety- and depressive-like behaviors in rats. *Behav Brain Res* **298**, 44–51.
- Palkovits M & Bratincsa A (2004). Activation of Brain Areas in Rat Following Warm and Cold Ambient Exposure. *Neuroscience* **127**, 385–397.
- Paro FM, Steiner AA, De Paula PM & Branco LGS (2002). Central heme oxygenase-carbon monoxide pathway in the control of breathing under normoxia and hypoxia. *Respir Physiol Neurobiol* **130**, 151–160.
- Patel KP & Zheng H (2012). Central neural control of sympathetic nerve activity in heart failure following exercise training. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol* **302**, 527–537.

- De Paula PM & Branco LGS (2003). Nitric oxide in the rostral ventrolateral medulla modulates hyperpnea but not anapnoea induced by hypoxia. *Brain Res* **977**, 231–238.
- Paxinos G & Watson C (2007). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*.
- Pereira DHS, Branco LGS, Cárnio EC & Barros RCH (2006). nNOS is involved in behavioral thermoregulation of newborn rats during hypoxia. *Physiol Behav* **89**, 681–686.
- Peyron C, Tighe DK, Van Den Pol AN, De Lecea L, Heller HC, Sutcliffe JG & Kilduff TS (1998). Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci* **18**, 9996–10015.
- Pfaff DW & Volkow ND (2016). *Neuroscience in the 21st century: From basic to clinical, second edition*.
- Piñol RA, Zahler SH, Li C, Saha A, Tan BK, Škop V, Gavrilova O, Xiao C, Krashes MJ & Reitman ML (2018). B rs3 neurons in the mouse dorsomedial hypothalamus regulate body temperature, energy expenditure, and heart rate, but not food intake. *Nat Neurosci* **21**, 1530–1540.
- Powell FL, Milsom WK & Mitchell GS (1998). Time domains of the hypoxic ventilatory response. *Respir Physiol* **112**, 123–134.
- Ranson RN, Motawei K, Pyner S & Coote JH (1998). The paraventricular nucleus of the hypothalamus sends efferents to the spinal cord of the rat that closely appose sympathetic preganglionic neurones projecting to the stellate ganglion. *Exp Brain Res* **120**, 164–172.
- Raquel H de A, Ferreira NZ, Lucchetti BFC, Falquetto B, Pinge-Filho P, Michelini LC & Martins-Pinge MC (2018). The essential role of hypothalamic paraventricular nucleus nNOS in the modulation of autonomic control in exercised rats. *Nitric Oxide - Biol Chem* **79**, 14–24.

- Reddy MK, Patel KP & Schultz HD (2005). Differential role of the paraventricular nucleus of the hypothalamus in modulating the sympathoexcitatory component of peripheral and central chemoreflexes. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol*; DOI: 10.1152/ajpregu.00222.2005.
- RH T, NS C & LW S (1996). Organization of Projections From the Dorsomedial Nucleus of the Hypothalamus: A PHA-L Study in the Rat. *J Comp Neurol*; DOI: 10.1002/(SICI)1096-9861(19961202)376:1<143::AID-CNE9>3.0.CO;2-3.
- Richter DW & Smith JC (2014). Respiratory rhythm generation in vivo. *Physiology* **29**, 58–71.
- Romanovsky A, I. IA & Shimansky YP (2002a). Molecular Biology of Thermoregulation Selected Contribution: Ambient temperature for experiments in rats: a new method for determining the zone of thermal neutrality. *J Appl Physiol* **93**, 2667–2679.
- Romanovsky AA (2007). Physiology and Pharmacology of Temperature Regulation Thermoregulation : some concepts have changed . Functional architecture of the thermoregulatory system. *Am J Physiol - Regul Integr Comp* **292**, 37–46.
- Romanovsky AA (2014). Skin temperature: Its role in thermoregulation. *Acta Physiol* **210**, 498–507.
- Romanovsky AA, Almeida MC, Garami A, Steiner AA, Norman MH, Morrison SF, Nakamura K, Burmeister JJ & Nucci TB (2009). The Transient Receptor Potential Vanilloid-1 Channel in Thermoregulation : A Thermosensor It Is Not. *Pharmacol Rev* **61**, 228–261.

- Romanovsky AA, Ivanov AI & Shimansky YP (2002*b*). Selected contribution: Ambient temperature for experiments in rats: A new method for determining the zone of thermal neutrality. *J Appl Physiol* **92**, 2667–2679.
- Ruiz JR, Martinez-Tellez B, Sanchez-Delgado G, Aguilera CM & Gil A (2015). Regulation of energy balance by brown adipose tissue: At least three potential roles for physical activity. *Br J Sports Med* **49**, 972–973.
- Ruyle BC, Martinez D, Heesch CM, Kline DD & Hasser EM (2019*a*). The PVN enhances cardiorespiratory responses to acute hypoxia via input to the nTS. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol* **317**, R818–R833.
- Ruyle BC, Martinez D, Heesch CM, Kline DD & Hasser EM (2019*b*). The PVN enhances cardiorespiratory responses to acute hypoxia via input to the nTS. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **317**, 818–833.
- Saito T & Soya H (2004). Delineation of responsive AVP-containing neurons to running stress in the hypothalamus. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol*; DOI: 10.1152/ajpregu.00453.2003.
- Sakurai T et al. (1998). Orexins and orexin receptors: A family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* **92**, 573–585.
- Saper CB, Scammell TE & Lu J (2005). Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms. *Nature* **437**, 1257–1263.
- Sarkar S, Zaretskaia M V., Zaretsky D V., Moreno M & DiMicco JA (2007). Stress- and lipopolysaccharide-induced c-fos expression and nNOS in hypothalamic neurons projecting to medullary raphe in rats: A triple immunofluorescent labeling study. *Eur J*

Neurosci **26**, 2228–2238.

Sawchenko PE & Swanson LW (1982). The organization of noradrenergic pathways from the brainstem to the paraventricular and supraoptic nuclei in the rat. *Brain Res Rev* **4**, 275–325.

Schlenker E, Barnes L, Hansen S & Martin D (2001). Cardiorespiratory and metabolic responses to injection of bicuculline into the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) of conscious rats. *Brain Res* **895**, 33–40.

Schlenker EH, Martin DS, Lin XM & Eglund MC (1997). Naloxone microinjected into the arcuate nucleus has differential effects on ventilation in male and female rats. *Physiol Behav* **62**, 531–536.

Silva TM, Takakura AC & Moreira TS (2016). Acute hypoxia activates hypothalamic paraventricular nucleus-projecting catecholaminergic neurons in the C1 region. *Exp Neurol* **285**, 1–11.

da Silveira Scarpellini C, Gargaglioni LH, Branco LGS & Bicego KC (2009). Role of preoptic opioid receptors in the body temperature reduction during hypoxia. *Brain Res* **1286**, 66–74.

Smith CA, Engwall MJ, Dempsey JA & Bisgard GE (1993). Effects of specific carotid body and brain hypoxia on respiratory muscle control in the awake goat. *J Physiol* **460**, 623–640.

Smith JC, Abdala APL, Borgmann A, Rybak IA & Paton JFR (2013). Brainstem respiratory networks: Building blocks and microcircuits. *Trends Neurosci* **36**, 152–162.

- Smith JC, Ellenberger HH, Ballanyi K, Richter DW & Feldman JL (1991). Pre-Bötzinger complex: A brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. *Science* (80-) **254**, 726–729.
- Smith JE, Jansen ASP, Gilbey MP & Loewy AD (1998). CNS cell groups projecting to sympathetic outflow of tail artery: Neural circuits involved in heat loss in the rat. *Brain Res* **786**, 153–164.
- Soares DD, Lima NR V, Coimbra CC & Marubayashi U (2003). Evidence that tryptophan reduces mechanical efficiency and running performance in rats. *Pharmacol Biochem Behav* **74**, 357–362.
- Soya H, Mukai A, Deocaris CC, Ohiwa N, Chang H, Nishijima T, Fujikawa T, Togashi K & Saito T (2007). Threshold-like pattern of neuronal activation in the hypothalamus during treadmill running: Establishment of a minimum running stress (MRS) rat model. *Neurosci Res* **58**, 341–348.
- Stanford KI & Goodyear LJ (2016). Exercise regulation of adipose tissue. *Adipocyte* **5**, 153–162.
- Steiner AA & Branco LGS (2002). Hypoxia-Induced Anapyrexia: Implications and Putative Mediators. *Annu Rev Physiol* **64**, 263–288.
- Steiner AA, Carnio EC & Branco LGS (2000). Role of neuronal nitric oxide synthase in hypoxia-induced anapyrexia in rats. *J Appl Physiol* **89**, 1131–1136.
- Steiner AA, Rocha MJA & Branco LGS (2002). A neurochemical mechanism for hypoxia-induced anapyrexia. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol*; DOI: 10.1152/ajpregu.00328.2002.

- Suess WM, Alexander AB, Smith DD, Sweeney HW & Marion RJ (1980). The Effects of Psychological Stress on Respiration: A Preliminary Study of Anxiety and Hyperventilation. *Psychophysiology* **17**, 535–540.
- Swanson LW & Kuypers HGJM (1980). The Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus : Cytoarchitectonic Subdivisions and Organization of Projections to the Pituitary , Dorsal Vagal Complex , and Spinal Cord as Demonstrated by Retrograde Fluorescence Double-Labeling Methods. *J Comp Neurol* **194**, 555–570.
- Swanson LW & Sawchenko PE (1983). Hypothalamic Integration: Organization of the Paraventricular and Supraoptic Nuclei. *Annu Rev Neurosci* **6**, 269–324.
- Takahashi A, Ishimaru H, Ikarashi Y, Kishi E & Maruyama Y (2001a). Opposite regulation of body temperature by cholinergic input to the paraventricular nucleus and supraoptic nucleus in rats. *Brain Res* **909**, 102–111.
- Takahashi A, Ishimaru H, Ikarashi Y, Kishi E & Maruyama Y (2001b). Cholinergic input to the supraoptic nucleus increases Fos expression and body temperature in rats. *Pflugers Arch* **442**, 451–458.
- Tamaki Y & Nakayama T (1987). Effects of air constituents on thermosensitivities of preoptic neurons: hypoxia versus hypercapnia. *Pflügers Arch Eur J Physiol* **409**, 1–6.
- Tan CL & Knight ZA (2018a). Review Regulation of Body Temperature by the Nervous System. *Neuron* **98**, 31–48.
- Tan CL & Knight ZA (2018b). Regulation of Body Temperature by the Nervous System. *Neuron* **98**, 31–48.

- Tanaka H, Yanase M & Nakayama T (1988). Body Temperature Regulation in Rats during Exercise of Various Intensities at Different Ambient Temperatures. *Jpn J Physiol* **38**, 167–177.
- Tanaka R, Fuse S, Kuroiwa M, Amagasa S, Endo T, Ando A, Kime R, Kurosawa Y & Hamaoka T (2020). Vigorous-Intensity Physical Activities Are Associated with High Brown Adipose Tissue Density in Humans. *Int J Environ Res Public Health* **17**, 2796.
- Tattersall GJ & Milsom WK (2003). Transient peripheral warming accompanies the hypoxic metabolic response in the golden-mantled ground squirrel. *J Exp Biol* **206**, 33–42.
- Teppema LJ & Dahan A (2010). The ventilatory response to hypoxia in mammals: Mechanisms, measurement, and analysis. *Physiol Rev* **90**, 675–754.
- Thompson RH, Canteras NS & Swanson LW (1996). Organization of projections from the dorsomedial nucleus of the hypothalamus: A PHA-L study in the rat. *J Comp Neurol* **376**, 143–173.
- Thompson RH & Swanson LW (1998). Organization of inputs to the dorsomedial nucleus of the hypothalamus: A reexamination with Fluorogold and PHAL in the rat. *Brain Res Rev* **27**, 89–118.
- Traystman RJ, Moore LE, Helfaer MA, Davis S, Banasiak K, Williams M & Hurn PD (1995). Nitro-l-arginine analogues: Dose- and time-related nitric oxide synthase inhibition in brain. *Stroke* **26**, 864–869.
- Wanner SP, Almeida MC, Shimansky YP, Oliveira DL, Eales JR, Eales JR, Coimbra CC & Romanovsky AA (2017). Cold-induced thermogenesis and inflammation-associated cold-seeking behavior are represented by different dorsomedial hypothalamic sites: a three-dimensional functional topography study in conscious rats. *J Neurosci* **37**, 6956–

6971.

- Wanner SP, Guimarães JB, Rodrigues LOC, Marubayashi U, Coimbra CC & Lima NRV (2007). Muscarinic cholinergic receptors in the ventromedial hypothalamic nucleus facilitate tail heat loss during physical exercise. *Brain Res Bull* **73**, 28–33.
- Wanner SP, Leite LHR, Guimarães JB & Coimbra CC (2015a). Increased brain L-arginine availability facilitates cutaneous heat loss induced by running exercise. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **42**, 609–616.
- Wanner SP, Prímola-Gomes TN, Pires W, Guimarães JB, Hudson ASR, Kunstetter AC, Fonseca CG, Drummond LR, Damasceno WC & Teixeira-Coelho F (2015b). Thermoregulatory responses in exercising rats: methodological aspects and relevance to human physiology. *Temperature* **2**, 457–475.
- Werner J (1980). The concept of regulation for human body temperature. *J Therm Biol* **5**, 75–82.
- Williams RH, Jensen LT, Verkhatsky A, Fugger L & Burdakov D (2007). Control of hypothalamic orexin neurons by acid and CO₂. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 10685–10690.
- Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM & Yanagisawa M (2001). To Eat or to Sleep? Orexin in the Regulation of Feeding and Wakefulness. *Annu Rev Neurosci* **24**, 429–458.
- Wilson NC, Gisolfi C V., Farber J & Hinrichs DK (1978). Colonic and tail-skin temperature responses of the rat at selected running speeds. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* **44**, 571–575.
- Wood SC (1991). Interactions Between Hypoxia and Hypothermia. *Annu Rev Physiol* **53**, 71–85.

- Wood SC (1995). Oxygen as a Modulator of Body Temperature - PubMed. *Brazilian J Med Biol Res* **11–12**, 1249–1256.
- Wood SC & Gonzales R (1996). Hypothermia in hypoxic animals: mechanisms, mediators, and functional significance. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **113**, 37–43.
- Wood SC & Malvin GM (1991). Physiological Significance of Behavioral Hypothermia in Hypoxic Toads (*Bufo Marinus*) - PubMed. *J Exp Biol* **159**, 203–215.
- Yamamoto T, Shimoyama N & Mizuguchi T (1993). Nitric oxide synthase inhibitor blocks spinal sensitization induced by formalin injection into the rat paw. *Anesth Analg* **77**, 886–890.
- Yanagita S, Amemiya S, Suzuki S & Kita I (2007). Effects of spontaneous and forced running on activation of hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurons in rats. *Life Sci* **80**, 356–363.
- Yeh ER, Erokwu B, LaManna JC & Haxhiu MA (1997). The paraventricular nucleus of the hypothalamus influences respiratory timing and activity in the rat. *Neurosci Lett* **232**, 63–66.
- Young AA & Dawson NJ (1982). Evidence for on-off control of heat dissipation from the tail of the rat. *Can J Physiol Pharmacol* **60**, 392–398.
- Zaretskaia M V., Zaretsky D V., Shekhar A & DiMicco JA (2002). Chemical stimulation of the dorsomedial hypothalamus evokes non-shivering thermogenesis in anesthetized rats. *Brain Res* **928**, 113–125.
- Zhang HQ, Fast W, Marletta MA, Martasek P & Silverman RB (1997a). Potent and selective inhibition of neuronal nitric oxide synthase by N(ω)-propyl-L-arginine. *J Med Chem* **40**, 3869–3870.

- Zhang HQ, Fast W, Marletta MA, Martasek P & Silverman RB (1997b). Potent and selective inhibition of neuronal nitric oxide synthase by N(ω)-propyl-L-arginine. *J Med Chem* **40**, 3869–3870.
- Zhang K, Mayhan WG & Patel KP (1997c). Nitric oxide within the paraventricular nucleus mediates changes in renal sympathetic nerve activity. *Am J Physiol* **273**, R864-72.
- Zhang K & Patel KP (1998). Effect of nitric oxide within the paraventricular nucleus on renal sympathetic nerve discharge: role of GABA. *Am J Physiol* **275**, R728-34.
- Zhang W, Fukuda Y & Kuwaki T (2005). Respiratory and cardiovascular actions of orexin-A in mice. *Neurosci Lett* **385**, 131–136.