

LEONARDO MATEUS TEIXEIRA DE REZENDE

**ESTUDO COMPARATIVO DA TERMORREGULAÇÃO DURANTE O REPOUSO E
EXERCÍCIO FÍSICO EM DOIS MODELOS EXPERIMENTAIS: WISTAR *VERSUS*
WISTAR KYOTO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Educação Física, para obtenção do título *Magister Scientiae*.

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

R467e
2016
Rezende, Leonardo Mateus Teixeira, 1992-
Estudo comparativo da termorregulação durante o repouso e
exercício físico em dois modelos experimentais : Wistar versus
Wistar Kyoto / Leonardo Mateus Teixeira Rezende. – Viçosa,
MG, 2016.
xii, 69f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Thales Nicolau Primola Gomes.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Temperatura corporal - Regulação. 2. Exercícios físicos.
3. Repouso. 4. Rato como animal de laboratório. I. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Educação Física. Programa
de Pós-graduação em Educação Física. II. Título.

CDD 22. ed. 612.01426

LEONARDO MATEUS TEIXEIRA DE REZENDE

**ESTUDO COMPARATIVO DA TERMORREGULAÇÃO DURANTE O REPOUSO E
EXERCÍCIO FÍSICO EM DOIS MODELOS EXPERIMENTAIS: WISTAR *VERSUS*
WISTAR KYOTO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Educação Física, para obtenção do título *Magister Scientiae*.

APROVADA: 13 de julho de 2016.

Dr. Paulo Roberto dos Santos Amorim

Dr. Sergio Luís Pinto da Matta

Dr. Thales Nicolau Prímola Gomes
(Orientador)

A Deus, pela oportunidade de seguir estudando
Aos meus pais Oscar e Lauriceia, pelo apoio incondicional
A minha noiva Monique, por todo amor, carinho e companheirismo
A minha irmã Carolina, pelo incentivo constante

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela força e coragem durante esta caminhada.

Agradeço a meus pais por serem exemplos de caráter, honestidade, generosidade e simplicidade. Por me proporcionarem acesso à educação e por não pouparem esforços para que meus sonhos se concretizassem.

A Monique, por estar ao meu lado desde o início da minha caminhada acadêmica, por ter aproveitado junto a mim todos os momentos de alegrias e conquistas e principalmente, por estar ao meu lado nos momentos de tristezas e dificuldades.

A minha irmã Carolina, pela amizade e torcida.

Ao meu orientador, professor Thales Nicolau Prímola Gomes pelo exemplo de dedicação a ciência. Por ser presença constante e ativa na realização deste trabalho, pelos ensinamentos, conselhos, confiança e paciência durante todo o período de mestrado.

Ao professor Antônio José Natali, pelo exemplo de profissionalismo e dedicação e por ter me aberto as portas do Laboratório de Biologia do Exercício.

Ao professor Candido Celso Coimbra pela coorientação e conselhos em momentos de dúvida.

A professora Raquel Alves pelo essencial auxílio na análise dos dados.

A todos do departamento de veterinária, a começar pela professora Lukiya Silva Campos Favorato, Vanessa Guedes Pereira, Fernanda Barros Santos, Tatiana Schmitz Duarte e Evandro Silva Favorato por permitirem que esta pesquisa fosse possível através da realização das cirurgias de implante de sensor nos animais.

Ao responsável técnico pelo laboratório de análise de alimentos, Ricardo de Britto Antonucci, pelo auxílio durante todo o processo de extração lipídica.

A professora Maria do Carmo Gouveia Pelúzio, pela orientação no processo de extração lipídica.

Ao professor João Carlos Bouzas Marins, pelo empréstimo do termômetro para análise da temperatura da pele dos animais.

Aos amigos Samuel Araújo e Thiago Leal pela importantíssima contribuição durante a coleta de dados.

Aos amigos Lucas Rios Drummond e Helton Oliveira Campos pelos conselhos e ensinamentos transmitidos.

Aos amigos do laboratório de Biologia do Exercício: Miguel, Joel, Leôncio, Danilo, Filipe Rios, Victor, Aurora, Luís Henrique, Ana Luiza, Franciane, Felipe Dambroz, Meilene, Alexandre, Anselmo, Judson e Danilo pela troca de conhecimento e momentos de diversão.

As agências financiadoras CAPES, Fapemig e CNPq, que possibilitaram a realização deste trabalho.

Aos animais experimentais, que merecem todo o respeito.

A UFV, pela oportunidade de realizar este trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1- Introdução:.....	1
2- Objetivos:	4
2.1- Geral:.....	4
2.2- Específicos:.....	5
Referências:.....	6
Capítulo 1: Comportamento do ritmo circadiano da temperatura central de duas linhagens experimentais: Wistar <i>versus</i> Wistar Kyoto.	8
1. Introdução:.....	10
2- Materiais e métodos:	12
2.1- Animais experimentais:	12
2.2- Implante do sensor de temperatura:.....	13
2.3- Medidas antropométricas:	14
2.4- Ritmo circadiano:	15
2.5- Variação da pressão arterial e do peso:.....	15
2.6- Extração lipídica:	16
2.8- Estatística:	17
3 – Resultados:.....	18
4- Discussão:.....	28
5- Conclusões:	32
Referências:.....	33
Capítulo 2: Estudo comparativo da termorregulação durante o exercício físico em dois modelos experimentais: Wistar <i>versus</i> Wistar Kyoto.	37
1- Introdução:.....	39
2- Materiais e métodos:	41
2.1- Amostra:.....	41
2.2- Pressão arterial, peso corporal e medidas antropométricas:.....	41
2.3- Procedimento cirúrgico:	42
2.4- Protocolo de exercício:	42
2.5- Variáveis calculadas:	43

2.6- Análise estatística:	45
3- Resultados:.....	46
4- Discussão:.....	62
5- Conclusões:	65
Referências:.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AC- Acúmulo de calor.
- ACTH- Hormônio adrenocorticotrófico.
- CEUA- Comissão de ética no uso animal.
- ECA- Exercício constante com intensidade absoluta.
- ECR- Exercício constante com intensidade relativa.
- EPF- Exercício progressivo até a fadiga.
- IMC- Índice de massa corporal.
- LTC- Limiar térmico para aumento da temperatura da pele da cauda.
- PAS- Pressão arterial sistólica.
- POA- Área pré-ótica do hipotálamo.
- SHR- Rato Espontaneamente Hipertenso.
- SQN- Núcleo supraquiasmático.
- TAC- Taxa de acúmulo de calor.
- TaqC- Taxa de aquecimento corporal.
- T_{central} - Temperatura central.
- T_{pele} - Temperatura da pele da cauda.
- TRP *channels*- Canais receptores de potencial transiente.
- TTE- Tempo total de exercício.
- VMC- Velocidade máxima de corrida.
- W- Trabalho.
- WIS- Wistar.
- WKY- Wistar Kyoto.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1:

- Figura 1 Progressão da massa corporal (A) e pressão arterial sistólica (B) dos animais ao longo de 48 semanas..... 19
- Figura 2 Circunferência abdominal (A) e circunferência torácica (B), comprimento naso-anal (C) e índice de massa corporal (D) dos animais com 16 e 48 semanas.. 20
- Figura 3 Porcentagem de gordura corporal dos animais..... 21
- Figura 4. Registros individuais do comportamento da temperatura central e da atividade locomotora de todos os animais do estudo..... 24
- Figura 5. Comportamento da temperatura central (A) e da atividade locomotora (B) dos animais durante 24h.. 25
- Figura 6. Temperatura central dos animais durante as fases do dia e da noite. 26
- Figura 7. Acúmulo de calor dos animais durante 24h..... 27

Capítulo 2:

- Figura 1. Massa corporal (A) e pressão arterial sistólica (B) dos animais com 16 e 48 semanas..... 47
- Figura 2. Desempenho dos animais no exercício progressivo até a fadiga (EPF). Porcentagem de animais correndo ao longo do tempo de teste (A), trabalho dos animais (B) e tempo total de exercício (C)..... 49
- Figura 3 Temperatura central (A), área abaixo da curva da Temperatura central (B), temperatura da pele (T_{pele}) da cauda (C) e área abaixo da curva da temperatura da pele (D) durante o EPF..... 50

Figura 4. Temperatura central (A), área abaixo da curva da Temperatura central (B), temperatura da pele (T _{pele}) da cauda (C) e área abaixo da curva da temperatura da pele (D) durante o exercício constante relativo (ECR).	52
Figura 5. Temperatura central (A), área abaixo da curva da Temperatura central (B), temperatura da pele (T _{pele}) da cauda (C) e área abaixo da curva da temperatura da pele (D) durante o exercício de exercício absoluto (ECA).....	53
Figura 6. Trabalho (Kgm) dos animais nos protocolos de exercício relativo (A) e absoluto (B)	54
Figura 7. Relação entre a temperatura da pele e a temperatura central no EPF (A), ECR (B) e ECA (C).....	56
Figura 8. Limiar térmico para vasodilatação da cauda durante os protocolos de exercício máximo (A), relativo (B) e absoluto (C) e sensibilidade termoeferente nos exercícios máximo (D), relativo (E) e absoluto (F).....	57
Figura 9. Acúmulo de calor (AC) dos animais nos protocolos de exercício máximo (A), relativo (B) e absoluto (C).Taxa de acúmulo de calor (TAC) durante os protocolos de exercício máximo (D), relativo (E) e progressivo (F).....	59
Figura 10. Taxa de aquecimento corporal durante os protocolos de exercícios máximo (A), relativo (B) e absoluto (C)..	60
Figura 11. Animais com massas corporais semelhantes (A) e seus respectivos acúmulo de calor (B).	61

RESUMO

REZENDE, Leonardo Mateus Teixeira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2016. **Estudo comparativo da termorregulação durante o repouso e exercício físico em dois modelos experimentais: Wistar versus Wistar Kyoto.** Orientador: Thales Nicolau Prímola Gomes. Coorientadores: Cândido Celso Coimbra e Antônio José Natali.

O objetivo geral desta dissertação foi analisar as diferenças no comportamento termorregulatório durante o repouso e exercício físico entre duas linhagens experimentais habitualmente utilizadas na pesquisa científica como controle para o rato espontaneamente hipertenso (SHR): os Wistar (WIS) e os Wistar Kyoto (WKY). No primeiro capítulo, foram analisadas as variáveis de repouso por meio do estudo do ritmo circadiano da temperatura central (T_{central}) e da atividade locomotora dos animais. Foram realizadas também análises da composição corporal dos animais por meio da avaliação do índice de massa corporal (IMC) e da análise direta do percentual de gordura. Como resultado, foi constatado que os animais apresentam semelhanças no comportamento basal da T_{central} , no entanto o envelhecimento provoca alterações nessas variáveis, no sentido de diminuir a T_{central} e a amplitude desta, o que é mais evidente na linhagem Wistar Kyoto. Com relação à composição corporal, entre os animais jovens (WIS16 vs. WKY16), foi verificado que os WIS apresentaram maior IMC, o que não foi observado entre os animais mais velhos, e, na comparação do percentual de gordura, independentemente da idade, os WIS apresentam maior percentual de gordura em relação aos WKY. Em conclusão, as linhagens estudadas apresentam um comportamento da T_{central} basal semelhante. Entretanto, com o processo de envelhecimento, ocorre uma perda da sincronização entre os ritmos circadianos estudados. No segundo capítulo, foram analisadas as variáveis obtidas a partir do exercício físico, que foi dividido em: exercício progressivo até a fadiga (EPF); exercício constante relativo (ECR); e exercício constante absoluto (ECA). Os dados de T_{central} durante o exercício foram coletados por meio de transmissão do sinal de telemetria e posterior análise pelo software VitalView. Como resultado, foi constatado que os animais da linhagem WKY apresentam desempenho superior durante o exercício aeróbico, no entanto o comportamento da T_{central} e da T_{pele} é semelhante entre as linhagens durante os protocolos de exercício propostos. Com relação ao acúmulo de calor, foi

comprovado que os animais da linhagem WIS acumulam mais calor do que os WKY, independentemente da massa corporal. Concluindo, as linhagens estudadas apresentam um comportamento termorregulatório semelhante durante o exercício físico aeróbico.

ABSTRACT

REZENDE, Leonardo Mateus Teixeira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2016. **Comparative study of thermoregulation during rest and exercise in two experimental models: Wistar versus Wistar Kyoto.** Adviser: Thales Nicolau Prímola Gomes. Co-advisers: Cândido Celso Coimbra e Antônio José Natali.

The overall objective of this dissertation was to analyze the differences in thermoregulatory behavior during rest and exercise between two strains commonly used in scientific research as a control for the spontaneously hypertensive rat (SHR), the Wistar (WIS) and Wistar Kyoto (WKY). In the first chapter we analyzed the resting variables through the study of circadian rhythm of core temperature (T_{central}) and the locomotor activity of animals. Were also carried out analysis of body composition of animals by body mass index (BMI) and direct analysis of the percentage of fat. As a result, it was found that the animals exhibit similarities in baseline behavior T_{central} , however, the aging causes changes in these variables in order to decrease the T_{central} , which is more evident in Wistar Kyoto strain. Regarding the body composition among young animals (WIS16 vs. WKY16), it was found that the WIS had higher BMI, which was not observed among older animals. Was compared the percentage of fat, WIS present a higher percentage of fat compared to WKY, regardless of age. In conclusion, the studied strains show a similar T_{central} baseline behavior and the process of aging, there is a loss of synchronization between the circadian rhythms studied. In the second chapter, the variables were analyzed obtained from the exercise, which was divided into progressive exercise until fatigue (EPF), constant exercise of relative (ECR) and absolute constant exercise (ECA). Data of T_{central} during exercise were collected through transmission of telemetry signal and subsequent analysis by VitalView software. As a result, it was found that animals of WKY show better perform during aerobic exercise. However, the behavior of T_{central} and T_{skin} is similar between the strain during the proposed exercise protocols. Regarding the heat storage, it was found that animals of WIS strain storage more heat than WKY strain independent of body mass. In conclusion, the studied strains have similar thermoregulatory behavior during aerobic exercise.

1- Introdução:

Termorregulação:

O controle da temperatura corporal em diferentes condições ambientais é conhecido como termorregulação, que acontece por meio do balanço térmico associado aos processos de produção e dissipação de calor (1, 2). Esse mecanismo de controle da homeostase térmica acontece de forma ininterrupta, uma vez que pequenos movimentos corporais são suficientes para elevar a taxa metabólica e, conseqüentemente, a produção de calor (3).

Os mamíferos são classificados como homeotérmicos, o que significa que seu corpo representa sua fonte primária de calor (4). O organismo desses animais mantém sua temperatura corporal constante, aproximadamente, em 37°C, e desvios dessa variável desencadearão respostas termorregulatórias comportamentais e/ou autonômicas, a fim de manter a temperatura corporal interna dentro de uma taxa de variação considerada normal (2-5).

Os mecanismos comportamentais são ativados principalmente em função do desconforto térmico, levando o indivíduo a buscar meios de se aquecer ou de se refrescar, através de atitudes planejadas, como a escolha do tipo de roupa a ser utilizada e do tipo de ambiente ao qual irá se expor (3, 6). Se os mecanismos de origem comportamental não forem suficientes para manter a temperatura dentro dos níveis adequados, os mecanismos autonômicos serão ativados, visando atingir esse objetivo (6). Tais mecanismos ocorrem por meio de processos fisiológicos como o alcance do limiar de temperatura para o início da sudorese e da vasodilatação periférica, os quais, em conjunto, promoverão a diminuição da temperatura central

(T_{central}). Quando houver a necessidade de aumentar a T_{central} , o corpo utilizará mecanismos como a vasoconstrição periférica, a piloereção e os tremores (6).

O comportamento da taxa metabólica dos animais homeotérmicos, dentre os quais se incluem os roedores, é associado à termorregulação. A taxa metabólica basal é mantida em níveis baixos quando o organismo é exposto à temperatura de neutralidade, ou seja, quando a temperatura corporal é regulada principalmente por meio do tônus vascular periférico e da perda seca de calor (6, 7). Quando a temperatura ambiente exceder a zona de termoneutralidade, a taxa metabólica aumentará, em função de processos fisiológicos como o aumento da perda evaporativa de calor. A faixa de temperatura que corresponde a essa resposta é conhecida como temperatura crítica superior. Existe, ainda, a temperatura crítica inferior, na qual o metabolismo será elevado, devido ao aumento da termogênese com e sem tremor (7, 8).

Todas as respostas fisiológicas são controladas por mecanismos cerebrais que trabalham de forma a manter a T_{central} em níveis apropriados para o funcionamento adequado do organismo (5, 9). Os mecanismos autonômicos são controlados, principalmente, pela área pré-ótica do hipotálamo (POA) (4, 6, 7). Dessa forma, o circuito de controle termorregulatório é organizado, basicamente, em três componentes principais: os neurônios aferentes sensíveis (*Thermo TRP channels*) a variações de temperatura; o centro integrador; e os componentes de comando eferente (4, 9-12).

Assim sendo, os canais TRP são divididos em receptores sensíveis ao calor, localizados de forma predominante em regiões internas do corpo, e os termosensores sensíveis ao frio, que se situam predominantemente logo abaixo da epiderme, ou seja, numa região mais periférica do corpo (4, 7). A fisiologia térmica

dos mamíferos é considerada assimétrica, o que significa que a T_{central} normal é fixada a poucos graus do limite superior. Assim, o aquecimento corporal representará um agente estressor mais potente do que o resfriamento, fazendo com que os termosensores sensíveis ao calor existam em maior quantidade e tenham uma função mais importante e efetiva (4). Estudos prévios demonstraram que, na defesa contra o calor, ocorre o aumento da atividade dos neurônios sensíveis ao calor, enquanto o primeiro passo para a defesa contra o frio é a diminuição da atividade dos mesmos neurônios sensitivos ao calor, o que confirma a importância desse grupo de neurônios (12).

A partir da integração do sinal emitido pelos canais TRP, a resposta efetora mais adequada será selecionada e um comando para sua execução será disparado (9). Uma resposta termoefetora representa um processo altamente coordenado, no qual os efetores que atuam de forma oposta não são ativados simultaneamente. Evidências apontam que a magnitude da resposta termoefetora será gerada pelo número e pelo tipo de canais termossensíveis ativados (4).

Portanto, o sistema termorregulatório é composto por diversos componentes que trabalham em conjunto, de maneira coordenada, a fim de manter a T_{central} em níveis estáveis (3, 7, 13). A manutenção da temperatura interna possui importância, por exemplo, para o funcionamento adequado dos órgãos vitais, que precisam permanecer em temperatura constante para manter o metabolismo. Essa regulação é facilitada pelo tônus vascular, onde a vasoconstrição permitirá manter o fluxo sanguíneo na região central, visando manter a T_{central} estável, uma vez que a vasodilatação permitirá redirecionar o fluxo sanguíneo para a periferia quando houver necessidade de dissipar calor (7).

Pesquisas no campo da termorregulação habitualmente utilizam animais experimentais como modelos biológicos, a fim de promover o avanço científico da área (14-16). Assim, o estudo da termorregulação associada ao exercício físico e acometimentos patológicos, como a hipertensão arterial, vem recebendo atenção do nosso grupo, nos últimos anos (17, 18). Para isso, o Rato Espontaneamente Hipertenso (SHR) tem sido utilizado como modelo de hipertensão essencial (19) e, como protocolo de pesquisa, é necessária a presença de um animal-controle para a comparação de resultados.

Foi estabelecido que o Wistar Kyoto (WKY) seria o controle ideal para o SHR, uma vez que estes são derivados dos WKY (19). No entanto, evidências apontam que os WKY apresentam grande variabilidade biológica entre os laboratórios que os utilizam, apresentando variantes como hipertrofia ventricular esquerda e atividade simpática aumentada (20, 21). Assim, a linhagem Wistar (WIS) tem sido utilizada como uma alternativa aos WKY nos estudos na área da termorregulação (17, 18). Dessa forma, é fundamental saber se as linhagens WIS e WKY apresentam comportamento termorregulatório semelhante durante o repouso e exercício físico. A importância deste estudo está na busca de entendimento no momento da escolha da linhagem a ser utilizada nas pesquisas, uma vez que este representa um passo importante para a obtenção de resultados mais confiáveis e fidedignos.

2- Objetivos:

2.1- Geral:

Avaliar as respostas termorregulatórias durante o repouso e exercício físico em dois modelos experimentais: Wistar e Wistar Kyoto.

2.2- Específicos:

Avaliar o comportamento do ritmo circadiano da temperatura central das duas linhagens estudadas.

Avaliar o comportamento do ritmo circadiano da atividade locomotora das duas linhagens estudadas.

Estudar o sistema termorregulatório das duas linhagens durante o exercício físico.

Avaliar o efeito do envelhecimento dos animais sobre as variáveis estudadas.

Referências:

1. GORDON CJ. Temperature regulation in laboratory rodents. Press CU, editor. United Kingdom 1993.
2. Blatteis CM. Physiology and pathophysiology of temperature regulation. World Scientific Publishing. 1998.
3. Ivanov KP. The development of the concepts of homeothermy and thermoregulation. *J Therm Biol.* 2006 Jan-Feb;31(1-2):24-9.
4. Romanovsky AA. Thermoregulation: some concepts have changed. Functional architecture of the thermoregulatory system. *Am J Physiol-Reg I.* 2007 Jan;292(1):R37-R46.
5. Weinert D. Circadian temperature variation and ageing. *Ageing Res Rev.* 2010 Jan;9(1):51-60.
6. Gordon CJ. Relationship between Autonomic and Behavioral Thermoregulation in the Mouse. *Physiology & Behavior.* 1985;34(5):687-90.
7. Kurz A. Physiology of thermoregulation. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol.* 2008 Dec;22(4):627-44.
8. Gordon CJ. Thermal Biology of the Laboratory Rat. *Physiology & Behavior.* 1990 May;47(5):963-91.
9. Nakamura K. Central circuitries for body temperature regulation and fever. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2011 Nov;301(5):R1207-28.
10. Nakamura K, Morrison SF. Central efferent pathways mediating skin cooling-evoked sympathetic thermogenesis in brown adipose tissue. *Am J Physiol-Reg I.* 2007 Jan;292(1):R127-R36.
11. Romanovsky AA, Ivanov AI, Shimansky YP. Molecular biology of thermoregulation - Selected contribution: Ambient temperature for experiments in rats: a new method for determining the zone of thermal neutrality. *Journal of Applied Physiology.* 2002 Jun;92(6):2667-79.
12. Chen XM, Hosono T, Yoda T, Fukuda U, Kanosue K. Efferent projection from the preoptic area for the control of non-shivering thermogenesis in rats. *J Physiol-London.* 1998 Nov 1;512(3):883-92.
13. Wanner SP, Prímola-Gomes TN, Pires W, Guimarães JB, Hudson ASR, Kunstetter AC, et al. Thermoregulatory responses in exercising rats: methodological aspects and relevance to human physiology. *Temperature- multidisciplinary biomedical journal.* 2016;2(4):457-75.
14. Kunstetter AC, Wanner SP, Madeira LG, Wilke CF, Rodrigues LOC, Lima NRV. Association between the increase in brain temperature and physical performance at different exercise intensities and protocols in a temperate environment. *Braz J Med Biol Res.* 2014 Aug;47(8):679-88.
15. Refinetti R. Metabolic heat production, heat loss and the circadian rhythm of body temperature in the rat. *Exp Physiol.* 2003 May;88(3):423-9.
16. Wanner SP, Guimaraes JB, Rodrigues LOC, Marubayashi U, Coimbra CC, Lima NRV. Muscarinic cholinergic receptors in the ventromedial hypothalamic nucleus facilitate tail heat loss during physical exercise. *Brain Res Bull.* 2007 Jun 15;73(1-3):28-33.

17. Campos HO, Leite LH, Drummond LR, Cunha DN, Coimbra CC, Natali AJ, et al. Temperature Control of Hypertensive Rats during Moderate Exercise in Warm Environment. *J Sports Sci Med*. 2014 Sep;13(3):695-701.
18. Drummond LR, Kunstetter AC, Vaz FF, Campos HO, Andrade AG, Coimbra CC, et al. Brain Temperature in Spontaneously Hypertensive Rats during Physical Exercise in Temperate and Warm Environments. *Plos One*. 2016;11(5):e0155919.
19. Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J*. 1963 Mar;27:282-93.
20. Chiueh CC, McCarty R. Sympatho-adrenal hyperreactivity to footshock stress but not to cold exposure in spontaneously hypertensive rats. *Physiol Behav*. 1981 Jan;26(1):85-9.
21. Collins HL, Loka AM, DiCarlo SE. Daily exercise-induced cardioprotection is associated with changes in calcium regulatory proteins in hypertensive rats. *American Journal of Heart Circulation Physiology*. 2004;288:532-40.

Capítulo 1: Comportamento do ritmo circadiano da temperatura central de duas linhagens experimentais: Wistar versus Wistar Kyoto.

Rezende, L. M. T¹; Araújo, S. R¹; Soares, L. L¹; Leal, T. F¹; Favorato, L. S. C²; Santos, F. B²; Félix, L. B³; Alves, R. D. M⁴; Pelúzio, M. C. G⁵; Natali, A. J¹; Coimbra, C. C⁶; Prímola-Gomes, T. N¹.

- 1- Departamento de Educação Física – Universidade Federal de Viçosa.
- 2- Departamento de Medicina Veterinária – Universidade Federal de Viçosa.
- 3- Departamento de Engenharia Elétrica – Universidade Federal de Viçosa.
- 4- Departamento de Nutrição – Faculdade de Ciência e Tecnologia de Viçosa.
- 5- Departamento de Ciências da nutrição – Universidade Federal de Viçosa.
- 6- Departamento de Fisiologia e Biofísica/ICB – Universidade Federal de Minas Gerais.

Resumo:

Objetivo: analisar o comportamento da temperatura basal de duas linhagens amplamente utilizadas na pesquisa científica, além de comparar dados de composição corporal dos animais.

Método: foram utilizados 32 animais, divididos em quatro grupos experimentais (WIS16; WKY16; WIS48; WKY48). Foram realizadas análises do ritmo circadiano da temperatura central (T_{central}) e da atividade locomotora por meio da transferência do sinal de telemetria para análise no software VitalView. As análises da composição corporal foram realizadas por meio do índice de massa corporal (IMC), e o percentual de gordura foi medido por meio da extração de Soxhlet.

Resultados: foi comprovado que os animais apresentam semelhanças no comportamento basal da T_{central} , no entanto o envelhecimento provoca alterações nessas variáveis, no sentido de diminuir a T_{central} e a amplitude desta, o que é mais evidente na linhagem Wistar Kyoto. Com relação à composição corporal, entre os animais jovens (WIS16 vs. WKY16), foi constatado que os WIS apresentaram maior IMC, o que não foi observado entre os animais mais velhos; além disso, na comparação do percentual de gordura, independentemente da idade, os WIS apresentam maior percentual de gordura que os WKY.

Conclusão: os grupos estudados apresentam comportamento da temperatura basal semelhante. Entretanto, com o processo de envelhecimento, ocorre uma perda da sincronização entre os ritmos circadianos estudados.

Palavras- chave: termorregulação, ritmo circadiano, animais experimentais.

Abstract:

Objective: To analyze the behavior of basal temperature of two strains widely used in scientific research, and also compare data of body composition of animals.

Methods: 32 animals were used and divided into four experimental groups (WIS16; WKY16; WIS48; WKY48). Analyzes were performed circadian rhythm of core temperature (Tcentral) and the locomotor activity by telemetry signal transfer to the VitalView analysis software. The analysis of body composition were made by the body mass index (BMI) and body fat percentage was measured by Soxhlet extraction.

Results: It was found that the animals exhibit similarities in baseline behavior Tcentral, however, the aging causes changes in these variables in order to decrease the Tcentral and scope thereof, which is more evident in male Wistar Kyoto strain. Regarding the body composition among young animals (WIS16 vs. WKY16), it was found that the WIS had higher BMI, which was not observed among older animals and compared the percentage of fat, regardless of age, WIS present a higher percentage of fat compared to WKY.

Conclusion: the groups have similar basal temperature behavior and, with the aging process, there is a loss of synchronization between the studied circadian rhythms.

Key words: thermoregulation, circadian rhythm, experimental animals.

1. Introdução:

Os ratos da linhagem Wistar Kyoto (WKY) têm sido frequentemente utilizados como controle para os Ratos Espontaneamente Hipertensos (SHRs), em diversos experimentos, principalmente no estudo da fisiologia cardiovascular (1-7). No entanto, pode ser que essa linhagem não represente a mais adequada para o controle dos SHR (8-13).

Sabe-se que a atividade simpática é responsável por promover vasoconstrição, podendo levar ao aumento da pressão arterial (14, 15). Pesquisas apontam que os animais da linhagem WKY apresentam atividade simpática elevada, de forma semelhante aos SHR (9, 11). Além disso, existem evidências de que os WKY apresentam um padrão de hipertrofia ventricular esquerda e fibrose também semelhante aos SHRs (1, 8, 13). Tais características representam agentes estressores ao organismo do WKY, que é apontado como um animal hipersensível a esses agentes agressores, reagindo com aumento da secreção de ACTH (12, 16). Assim, esses achados colocam em dúvida a utilização dos WKY como controle dos SHRs.

Uma alternativa a esse quadro pode ser a utilização de outras linhagens como controle do SHR, por exemplo, os ratos da linhagem Wistar (WIS) (8, 17-19). A linhagem WIS (*Rattus norvegicus*) tem sido utilizada como controle para o SHR em experimentos na área da fisiologia cardiovascular (8, 20), no estudo da qualidade do sono (18) e também em estudos na área da termorregulação (17, 21). Assim, parece que os WIS têm sido aceitos como animais-controle dos SHRs em substituição aos WKY.

Nos últimos anos, o nosso grupo de pesquisa vem se dedicando ao estudo do controle termorregulatório associado à hipertensão arterial e, para isso, os SHRs

têm sido utilizados como modelo experimental. Em trabalho realizado por Campos e colaboradores, foi observado que os SHR apresentaram maior produção e acúmulo de calor do que os WIS, o que resultou numa maior temperatura corporal ao final do exercício físico, em ambiente quente (32°C) (17). Um segundo estudo analisou as respostas das temperaturas cerebral e abdominal dos SHR em ambiente temperado (25°C) e quente (32°C) (21). Foi percebido que os SHR apresentaram maior temperatura abdominal e cerebral durante os exercícios progressivo máximo e constante, nos dois ambientes estudados (25°C e 32°C) (21). Apesar desses trabalhos prévios, uma pergunta permanece e deve ser respondida: a temperatura central (T_{central}) basal é semelhante entre os ratos WIS e WKY?

Para o estudo do comportamento normal de uma variável biológica que apresenta ritmicidade, utiliza-se a avaliação do ritmo circadiano dessa variável (22). A T_{central} e a atividade locomotora apresentam características rítmicas e um padrão de oscilação associado aos hábitos do animal em questão (23, 24). Como os roedores são animais de hábito noturno, conseqüentemente estes apresentam maior atividade termogênica associada à maior atividade locomotora durante esse período do dia (23). É importante ressaltar, ainda, que essas variações internas do organismo passam por um processo de sincronização com variações externas geofísicas ambientais, como o ciclo dia/noite e as estações do ano (25, 26).

O centro controlador dos ritmos circadianos é conhecido como núcleo supraquiasmático (SQN), localizado no hipotálamo, e sua atuação ocorre por meio de um complexo sistema de feedback (22, 24). Tal controle acontece por meio de mecanismos altamente coordenados, responsáveis pelo equilíbrio entre o ganho e a perda de calor, associados à percepção das condições ambientais (24). Evidências apontam que os diversos ritmos biológicos trabalham de forma sincronizada; por

exemplo, o ciclo de liberação de melatonina atua de forma direta na regulação da temperatura corporal (27). O aumento na taxa de secreção da melatonina no período de repouso facilita a queda da T_{central} via vasodilatação periférica e, no período de atividade do animal, esse quadro se inverte, facilitando o aumento da T_{central} (24, 28).

O comportamento dos ritmos circadianos passa por modificações em função do envelhecimento, ocorrendo um processo de deterioração dos ritmos, caracterizado pela perda da sincronização entre os ritmos e a perda da habilidade de se adaptar à periodicidade do ambiente (29). Tais modificações acontecem na maioria das funções, sendo mais pronunciadas na amplitude dos ritmos, que passa por um processo de fragmentação e aumento da variabilidade ao longo do dia (24, 30).

Assim, o presente trabalho teve como objetivo comparar a T_{central} basal entre as linhagens WIS e WKY. Para isso, foi testada a hipótese principal de que essas linhagens apresentariam o comportamento do ritmo circadiano da T_{central} semelhante. Associado a isso, também foi testada a hipótese de que os animais mais velhos apresentariam perda da ritmicidade das variáveis.

2- Materiais e métodos:

2.1- Animais experimentais:

Foram utilizados 32 animais, divididos em quatro grupos, de forma aleatória: WIS com 16 semanas (n=8), WKY com 16 semanas (n=8), WIS com 48 semanas (n=8) e WKY com 48 semanas (n=8). Os animais foram obtidos a partir do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa (UFV), permaneceram alojados em gaiolas coletivas, em ambiente

controlado com temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, ciclo de 12 horas claro/12 horas escuro, e tiveram livre acesso à água e ração *ad libitum*. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Viçosa (50/2015). Todos os procedimentos foram acompanhados por um médico veterinário (CRMV-MG: 8981).

O número de animais utilizados foi definido a partir da seguinte fórmula (31):

$$n = 2 [(Z2\alpha + Z2\beta)\sigma/\delta]$$

$$n = 2[(0,025+0,9)]0,215/0,05 = 7,955$$

onde,

2α : nível de significância;

2β : 1 – poder do teste;

$Z2\alpha$: quartil $\alpha/2$ da distribuição normal;

$Z2\beta$: quartil $\beta/2$ da distribuição normal;

σ : desvio padrão;

δ : diferença a ser detectada

A principal variável do trabalho, selecionada para utilização na fórmula, foi a T_{central} , retirada de um trabalho prévio (32). O nível de significância adotado foi de 5%, e o poder do teste de 90%.

2.2- Implante do sensor de temperatura:

Para a obtenção da temperatura central, foi implantado um sensor de temperatura (G2 E-Mitter, modelo ER4000, Mini-Mitter, USA) em cada animal, os quais se encontravam sob efeito de um anestésico inalatório (Isoflurano 1,5% e oxigênio 100% em fluxo constante de 1 L/min; Isoflurano, BioChimico, RJ, Brasil). Após a indução da anestesia, cada animal foi fixado em decúbito dorsal sobre uma

plataforma devidamente aquecida, para evitar hipotermia induzida pelo anestésico. Feita a tricotomia e a assepsia (Iodopovidona, 10%), uma incisão ventral de aproximadamente 2 cm foi realizada na pele e, seguidamente, na linha alba do músculo reto abdominal, permitindo acesso à cavidade peritoneal. O sensor foi implantado na cavidade intraperitoneal e fixado à fáscia do músculo reto abdominal. Por fim, o músculo e a pele foram suturados, e foi realizada uma nova assepsia da região.

Imediatamente após o procedimento cirúrgico e 12 horas após, os animais receberam uma dose de 0,07 mL de antibiótico (Chemitril injetável 2,5%, Chemitec) e 0,01 mL de anti-inflamatório (Flunixin injetável-Chemitec).

2.3- Medidas antropométricas:

Como parâmetros morfométricos, foram utilizados o índice de massa corporal (IMC), as medidas das circunferências torácica e abdominal, além do comprimento naso-anal (33). Para tal, foi aproveitado o momento da aplicação do anestésico inalatório durante os procedimentos cirúrgicos. Após indução da anestesia, os animais foram pesados e, em seguida, mantidos na posição vertical, para que fossem medidas as circunferências torácica (logo abaixo da pata dianteira) e abdominal (logo acima da pata traseira). Posteriormente, os animais foram posicionados em decúbito dorsal, para medição do comprimento naso-anal (33). A partir dessas medidas, foi calculado o IMC, por meio da seguinte fórmula:

$$IMC = \frac{Massa\ corporal}{Comprimento\ naso - anal^2}$$

2.4- Ritmo circadiano:

Após o implante do sensor, os animais foram separados em caixas individuais e passaram por um período de recuperação de cinco dias, até atingirem a massa corporal pré-cirúrgica. Em seguida, eles passaram por um processo de medida da T_{central} durante 72 horas. O animal foi mantido em sua própria caixa, a qual permaneceu sobre uma placa responsável por receber o sinal de telemetria (ER-4000 Energizer/Receiver, Mini-Mitter Company, Sun River, OR, USA) emitido pelo sensor instalado na cavidade intraperitoneal. Esses dados foram transmitidos para um computador através do software VitalView (VitalView® Data Acquisition System Software v. 4.0, Mini-Mitter Company, Sun River, OR, USA).

A Temperatura central (°C) e a atividade locomotora (unidades arbitrárias) foram registradas a cada minuto, durante um período de 72 horas, para posterior análise da variação entre as duas linhagens. Essas 72 horas de medida sucederam-se em um ambiente controlado, com o mínimo de ruído possível, onde as condições de temperatura, ciclo de luz e disponibilidade de ração e água foram exatamente as mesmas da sala onde os animais estavam alojados anteriormente.

2.5- Variação da pressão arterial e do peso:

Quando os animais completaram oito semanas, foi realizada a primeira medida de pressão arterial (PA), momento no qual eles foram adaptados a um aparato de contenção em uma sala escura e sem ruídos, durante 5 dias, 10 minutos por dia. Esse aparato consiste em um tubo cilíndrico com tamanho adequado para o animal, visando mantê-lo confortável durante a realização das medidas. Essas medidas foram realizadas até a quadragésima oitava semana de vida dos animais.

A PA foi mensurada por meio do método não invasivo de pletismografia de cauda (LE5001; Panlab®, Barcelona, Espanha). As aferições ocorreram a cada duas semanas, visando acompanhar o comportamento dessas variáveis ao longo do envelhecimento dos animais. No dia da medida, os animais foram colocados no aparato de contensão e aquecidos de forma passiva, por meio da exposição à temperatura de 29-32°C, durante 10 minutos. Logo após, um manguito de pressão e um transdutor de pulso foram colocados a três centímetros da ponta da cauda. Após a captação do pulso, o manguito foi insuflado, para obtenção das medidas.

A variação do peso corporal também foi acompanhada a partir da oitava semana de vida dos animais, até que eles completassem 48 semanas. Para isso, foi utilizada uma balança eletrônica (Rochelle, modelo 3252).

2.6- Extração lipídica:

A análise da quantidade total de lipídios presentes no organismo dos animais foi realizada por meio do método de Extração de Soxhlet (34). Os animais foram eutanasiados por meio de sobredose anestésica, com administração intraperitoneal de tiopental (50 mg/Kg). Após a eutanásia, as carcaças dos animais passaram por processo de secagem em estufa com circulação de ar contínua, por um período de 24 horas e temperatura constante (105°C). Logo após, as carcaças secas foram trituradas utilizando pistilo e graal, sendo, posteriormente, armazenadas em um cartucho feito com papel-filtro específico. Em seguida, os cartuchos foram inseridos em um extrator de Soxhlet, onde a gordura foi extraída de forma contínua por meio de um solvente orgânico (Éter etílico), que foi aquecido e volatizado e, em seguida, condensado acima da amostra. Durante o processo de condensação, o éter foi gotejado sobre a amostra, promovendo a extração lipídica. Todo o processo

aconteceu em ciclos de 15 a 20 minutos, repetidos durante oito horas seguidas. Após a extração de todo conteúdo lipídico, foi realizado o cálculo da diferença entre o peso do cartucho pré-extração e pós-extração, para descoberta da porcentagem de gordura corporal da amostra (34).

2.7 - Acúmulo de calor (AC):

O AC foi calculado utilizando a fórmula seguinte (5), sendo normalizado para cada 100 g de peso corporal.

$$AC = \Delta T_{int} \cdot m \cdot c$$

Onde:

AC: Acúmulo de calor (cal);

ΔT_{int} : Diferença entre a temperatura interna final e inicial do exercício (°C);

m: massa corporal (g);

c: calor específico dos tecidos do animal (0,8264 cal.g⁻¹.°C⁻¹).

2.8- Estatística:

Para verificar a normalidade dos dados, foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk. As variações da $T_{central}$ e da atividade locomotora foram verificadas por meio da ANOVA, com parcelas subdivididas, seguido dos post hoc LSD e Scott-Knott, quando adequado.

Para comparação do IMC, das medidas antropométricas, do percentual de gordura e do acúmulo de calor, foi utilizada a ANOVA two-way, seguido do post hoc de Tukey. Foi adotado um nível de significância de $\alpha=5\%$.

3 – Resultados:

A figura 1 apresenta a progressão da massa corporal e da pressão arterial sistólica dos animais ao longo de quarenta e oito semanas. Foi observado um efeito da linhagem na massa corporal, pois os animais da linhagem WIS apresentaram massa corporal superior em comparação aos WKY (semanas 10-14; 36-48). O painel B da figura 1 apresenta a progressão da PAS durante quarenta e oito semanas, demonstrando efeito da linhagem, uma vez que os WKY apresentaram maior PAS: semanas 24, 38 e 40.

A figura 2 apresenta os resultados das medidas antropométricas dos animais com dezesseis e com quarenta e oito semanas. Foram encontrados efeitos da linhagem para todas as variáveis estudadas, na medida em que os WIS16 apresentaram maior circunferência abdominal (painel A), circunferência torácica (painel B), comprimento naso-anal e IMC em comparação aos WKY16. Foi constatado, ainda, que os WIS48 exibiram maior comprimento naso-anal do que os WKY48. Já para a variável idade, foi encontrado efeito de linhagem dentro do grupo WKY, pois os animais mais velhos exibiram valores superiores para circunferência abdominal, circunferência torácica e IMC, em relação aos WKY16. Já para os animais da linhagem WIS, foi encontrada diferença apenas no comprimento naso-anal, uma vez que os WIS48 apresentaram valores mais elevados para essa variável.

A figura 3 apresenta os resultados da porcentagem de gordura dos quatro grupos estudados, sendo encontrado um efeito da linhagem. Os animais da linhagem WIS apresentaram maior porcentagem de gordura, tanto entre os mais jovens (WIS16: 21,94% vs. WKY16: 12,59%; $p < 0,05$), quanto entre os mais velhos (WIS48: 18,16% vs. WKY48: 13,08%; $p < 0,05$).

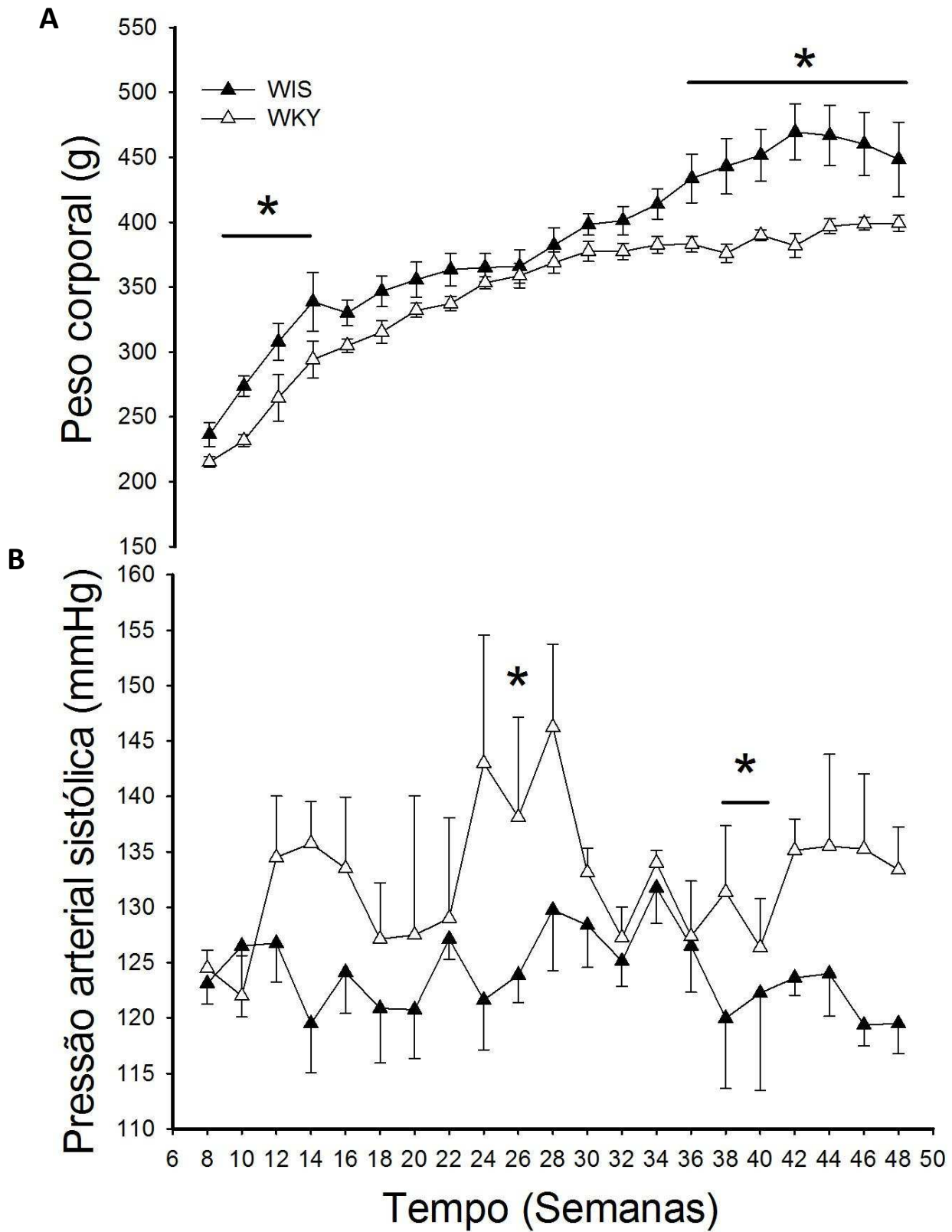


Figura 1 Progressão da massa corporal (A) e pressão arterial sistólica (B) dos animais ao longo de 48 semanas. Dados expressos como média \pm EPM ($p < 0,05$). * WIS vs. WKY.

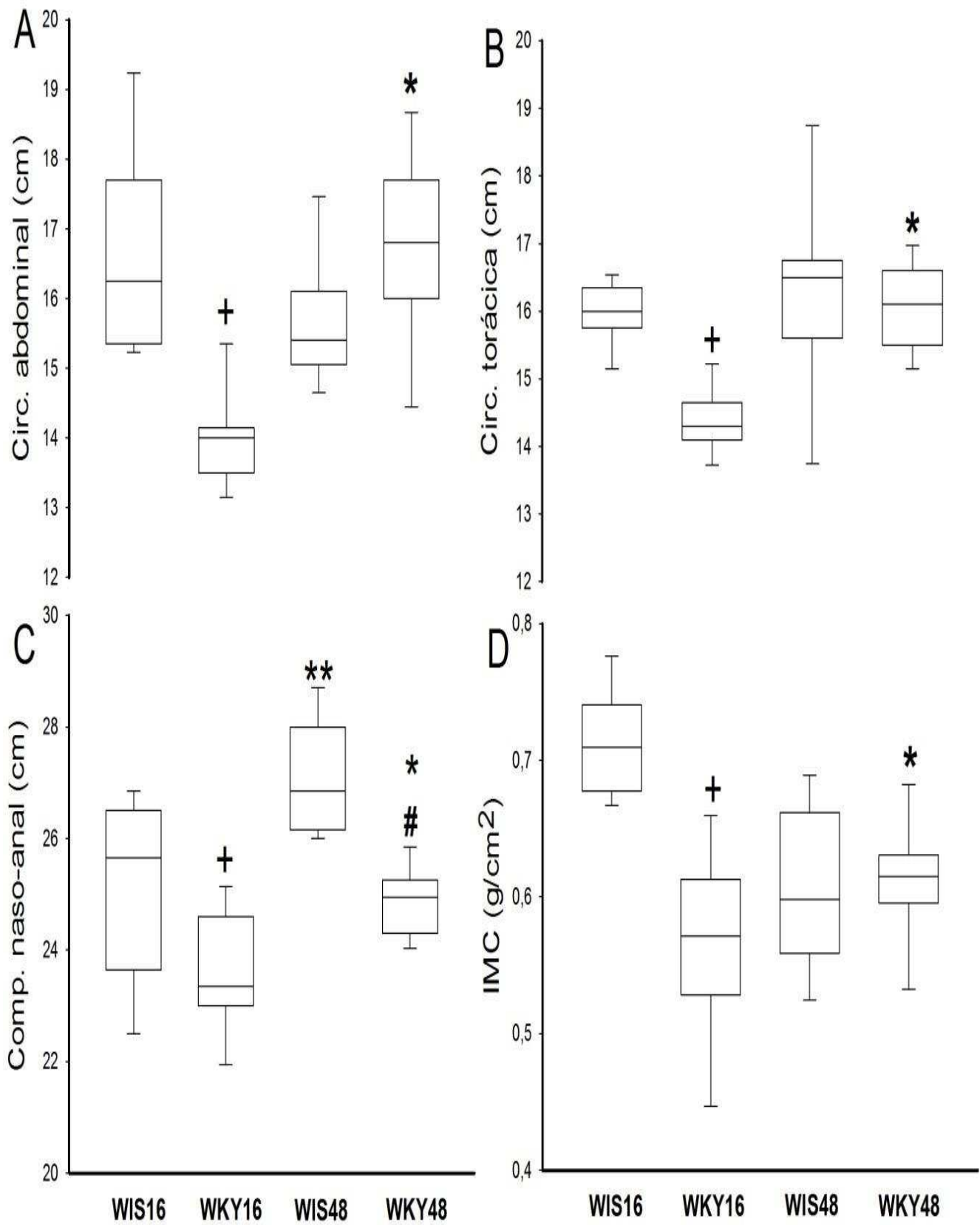


Figura 2 Circunferência abdominal (A), circunferência torácica (B), comprimento naso-anal (C) e índice de massa corporal (IMC) (D) dos animais com dezesseis e quarenta e oito semanas. Dados apresentados como mediana e percentis (p<0,05). + WIS16 vs. WKY16; * WKY48 vs. WKY16; **WIS48 vs. WIS16; # WIS.

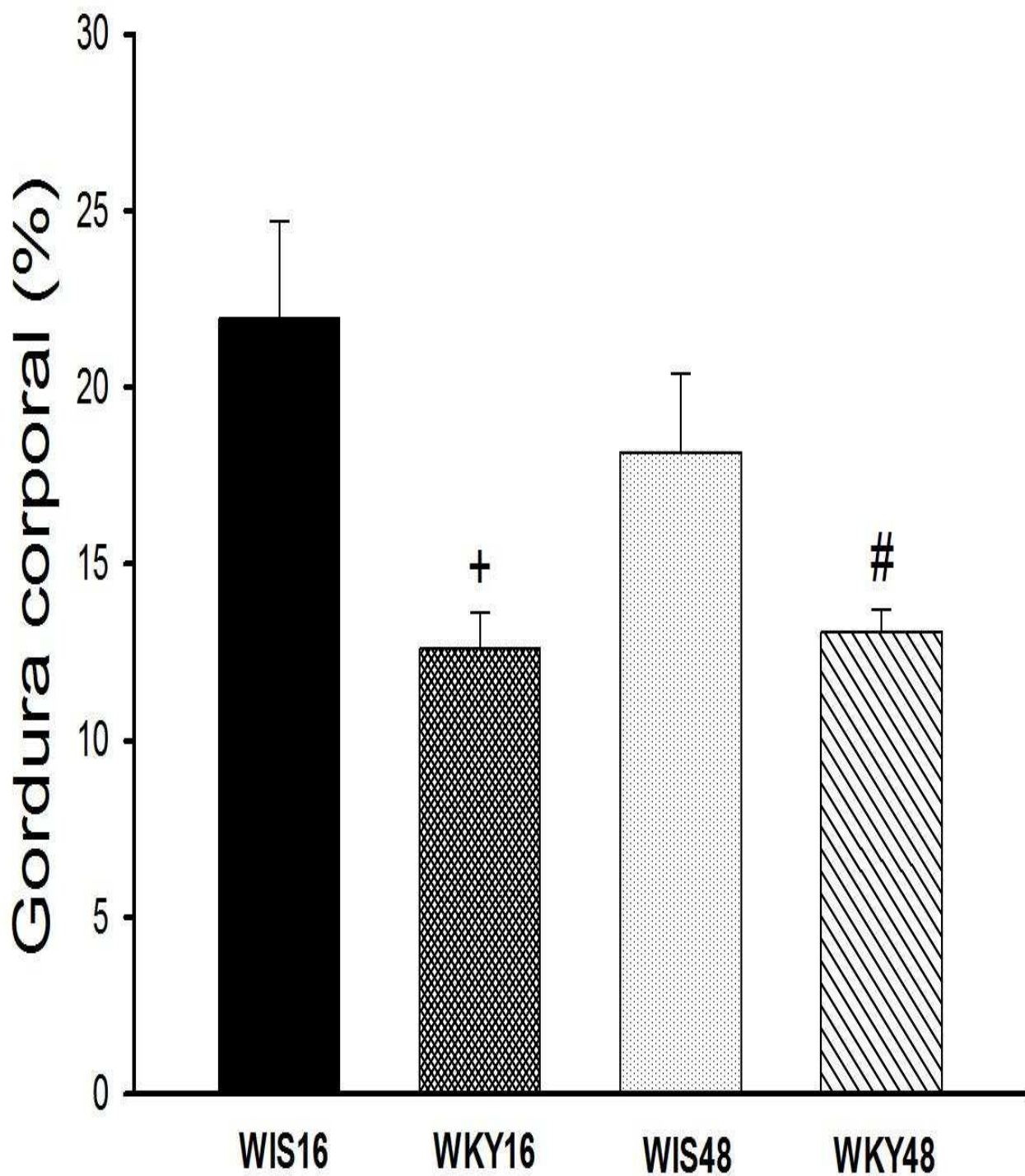


Figura 3 Porcentagem de gordura corporal dos animais. Dados apresentados como média \pm EPM ($p < 0,05$). + WKY16 vs. WIS16; # WKY48 vs. WIS48.

A figura 4 apresenta os traçados típicos do comportamento da temperatura central e da atividade locomotora de todos os animais do estudo. Já a figura 5 exhibe a média dos três dias completos da T_{central} basal e da atividade locomotora desses animais. Com relação à T_{central} , não houve efeito da linhagem. Assim, os animais das linhagens WIS e WKY exibiram valores de T_{central} basal semelhantes. Foi encontrado efeito da idade sobre a T_{central} , posto que a diferença foi percebida, durante todos os momentos do dia, entre os WKY16 e os WKY48, que exibiram menor T_{central} . Esse achado foi determinado pela perda do padrão da curva dessa variável, refletido por uma queda da T_{central} e diminuição da amplitude da curva. A atividade locomotora foi semelhante durante o período do dia, entre os quatro grupos, que apresentaram um aumento dessa variável no final da tarde (das 17 às 18 horas). Foi encontrado um efeito da linhagem, na medida em que os WIS16 se apresentaram mais ativos do que os WKY16 entre as 21 e as 23 horas e às 02 horas. Entre os animais mais velhos, foi possível observar uma diferença às 22 horas, quando os WIS48 exibiram atividade locomotora superior em relação aos WKY48. Por fim, foi encontrado também um efeito da idade, pois, no período entre as 20 e as 23 horas, os WIS16 exibiram, em comparação aos WIS48, maior nível de atividade locomotora, o que se repetiu no início da manhã (das 04 às 07 horas). Ainda, às 04h, os WKY16 apresentaram maior atividade locomotora que os WKY48.

A figura 6 exhibe os valores da T_{central} dos animais durante as fases clara e escura do dia. É possível observar um efeito do horário do dia no grupo de animais com 16 semanas, que é demonstrado pelo aumento da T_{central} no período da noite (WIS16D: 36,2°C vs. WIS16N: 36,68°C; WKY16D: 36,12°C vs. WKY16N: 36,78°C; $p < 0,05$), fato que não ocorreu nos animais com quarenta e oito semanas. Além disso, ocorreu, também, efeito da idade, uma vez que os animais da linhagem

WIS48 não apresentaram aumento de temperatura durante a noite, de forma que os animais mais velhos exibiram valores inferiores de T_{central} nesse período (WIS16N: 36,68°C vs. WIS48N: 35,57°C; $p < 0,05$). Já os animais da linhagem WKY apresentaram reduções da T_{central} tanto na fase do dia quanto na fase da noite, em função da idade (WKY16D: 36,12°C vs. WKY48D: 34,29°C; WKY16N: 36,78°C vs. WKY48N: 34,63°C; $p < 0,05$). Foi possível, ainda, observar um efeito da linhagem, pois os animais WKY48 exibiram menor T_{central} média nas fases do dia e da noite, em relação aos WIS48 (WKY48D: 34,29 °C vs. WIS48D: 35,56 °C; WKY48N: 34,63°C vs. WIS48N: 35,57°C).

A figura 7 apresenta os resultados do acúmulo de calor dos animais durante o período de 24 horas, sendo observado um efeito da idade. Os animais com 48 semanas apresentaram menor acúmulo de calor do que os animais com 16 semanas (WIS16: 309,27 cal vs. WIS48: 132,80 cal; WKY16: 281,27 cal vs. WKY48: 154,98 cal; $p < 0,05$).

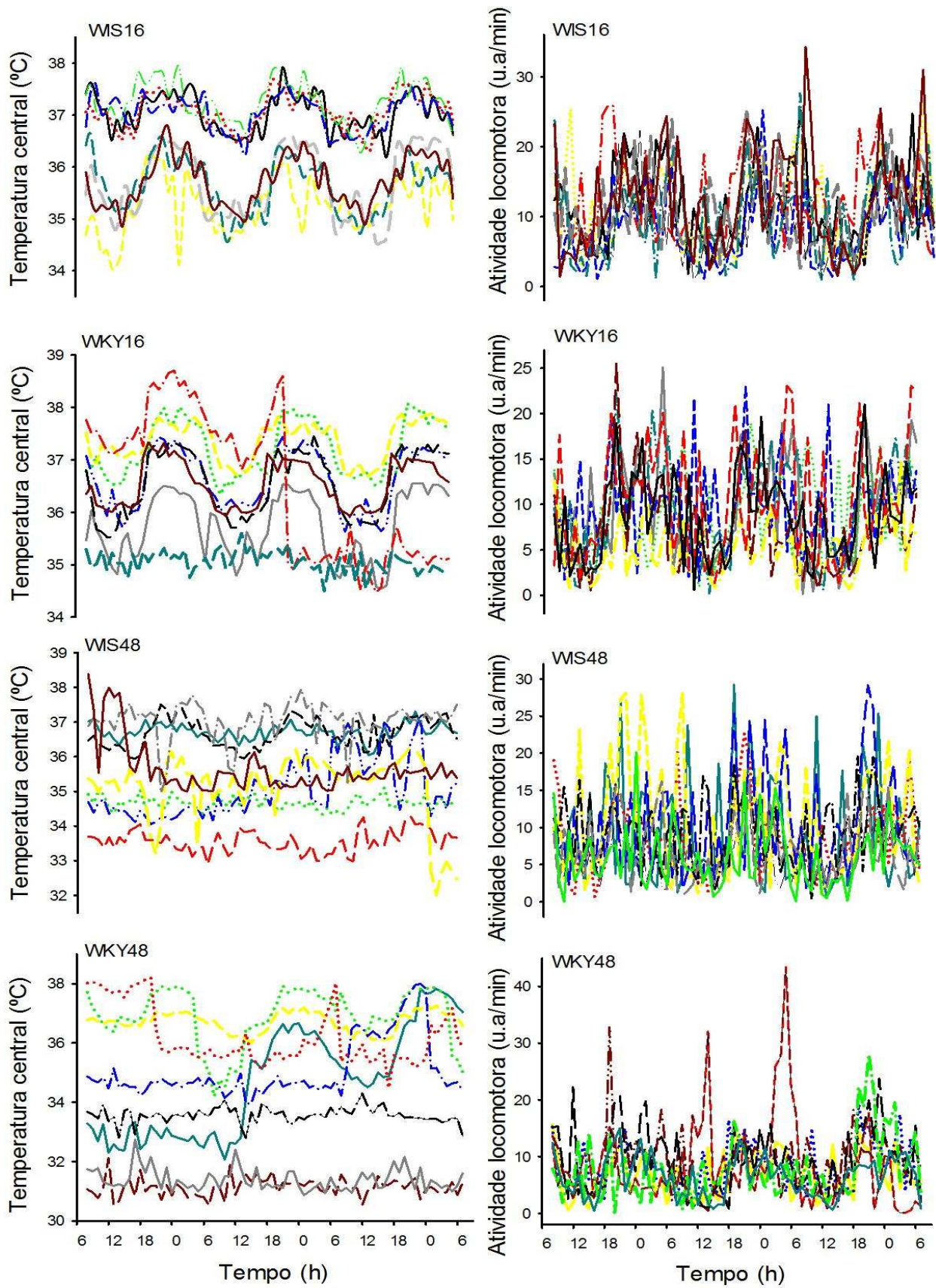


Figura 4. Registros individuais do comportamento da temperatura central e da atividade locomotora de todos os animais do estudo.

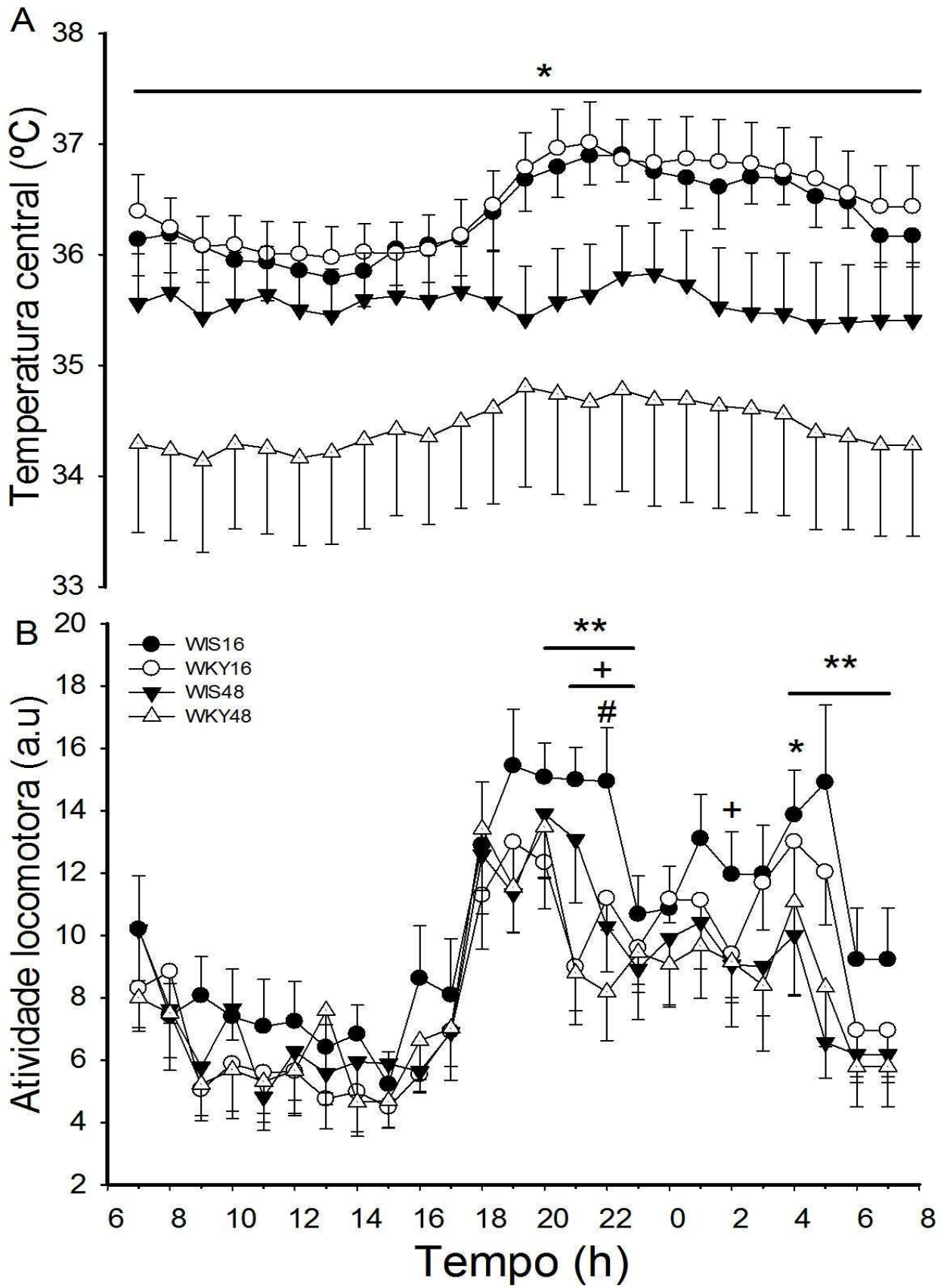


Figura 5. Comportamento da temperatura central (A) e da atividade locomotora (B) dos animais durante 24h. Dados expressos como média \pm EPM ($p < 0,05$). * WKY48 vs. WKY16; **WIS48 vs. WIS16; + WIS16 vs. WKY16; # WKY48 vs. WIS48.

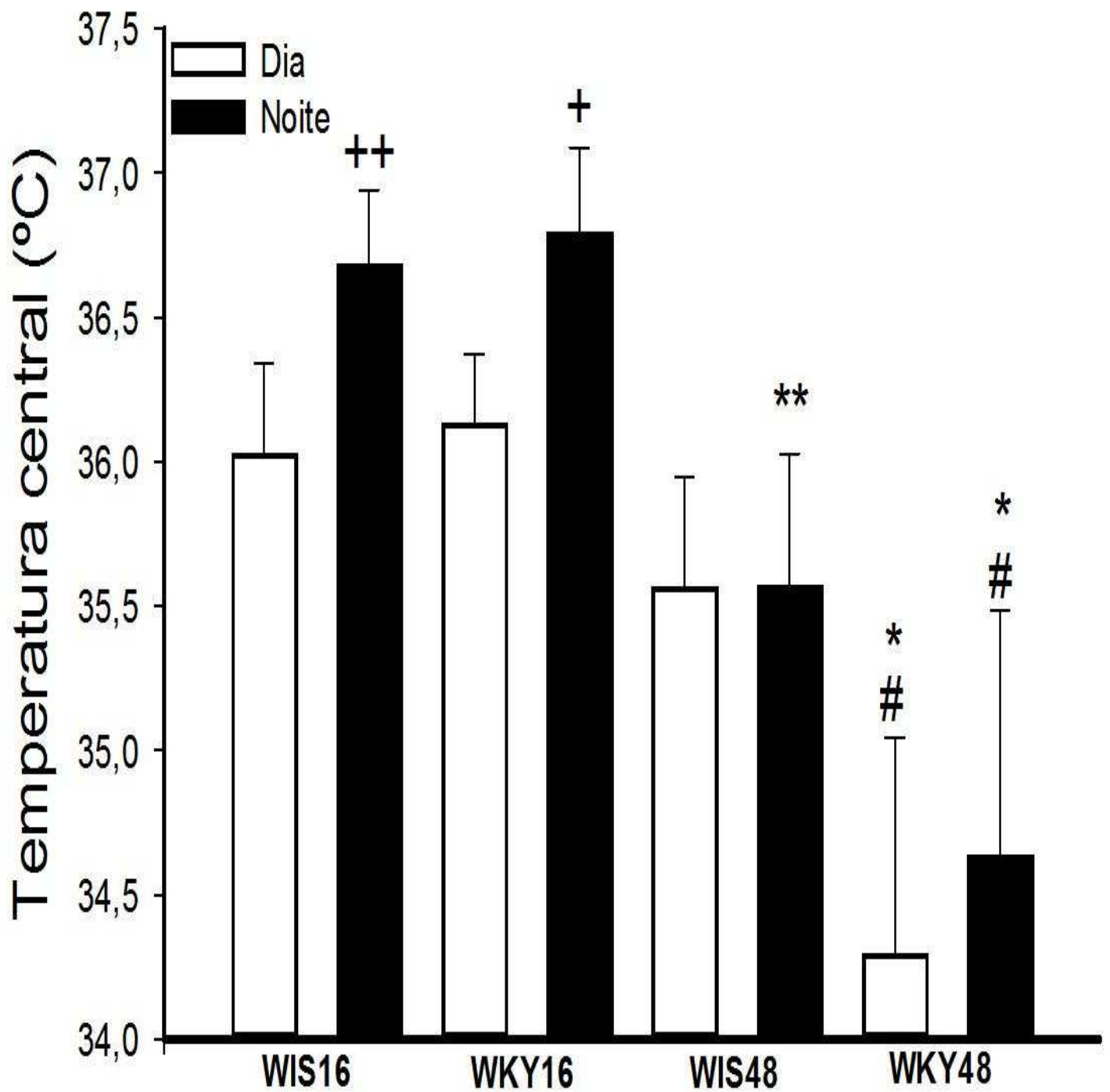


Figura 6. Temperatura central dos animais durante as fases do dia e da noite. Dados expressos como média \pm EPM ($p < 0,05$). ++ WIS16N vs. WIS16D; +WKY16N vs. WKY16D; **WIS48N vs. WIS16N; *WKY48 vs. WKY16; #WKY48.

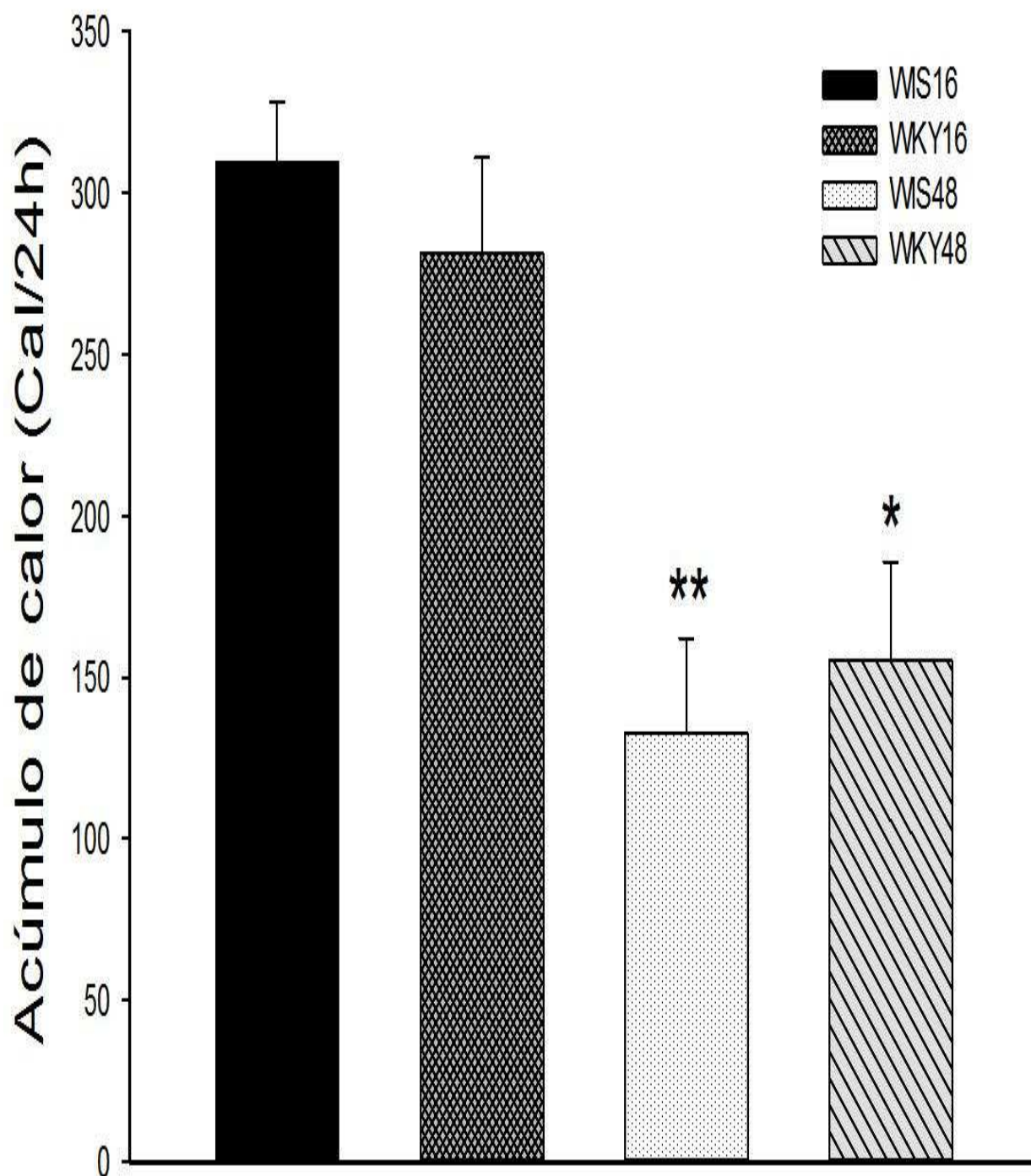


Figura 7. Acúmulo de calor dos animais durante 24h. Dados apresentados como média \pm EPM ($p < 0,05$).
 **WIS48 vs. WIS16; *WKY48 vs. WKY16.

4- Discussão:

Este estudo teve como objetivo avaliar as respostas termorregulatórias durante o repouso entre duas linhagens experimentais frequentemente utilizadas em pesquisas na área de termorregulação. De acordo com nossa hipótese, foi observado que os animais apresentaram semelhanças no comportamento termorregulatório basal. Na segunda hipótese, foi confirmado que as linhagens sofrem modificações em função do envelhecimento, o que foi mais evidente para os animais da linhagem WKY.

Pesquisas apontam que a massa corporal, assim como a composição corporal, influenciam diretamente na taxa metabólica basal e, conseqüentemente, na produção de calor metabólico em seres humanos e ratos (35-37). No presente trabalho, foram realizadas medidas da massa corporal e da PAS ao longo de 48 semanas. Como apresentado nos resultados, foi observado um efeito da linhagem sobre a massa corporal, indicando que os WIS apresentaram maior massa corporal quando comparados aos WKY (10^a-12^a e 36^a-48^a semana). Já com relação à PAS, observaram-se diferenças em apenas três momentos isolados (24^a, 38^a e 40^a semanas), indicando que os WKY apresentaram maior PAS nesses períodos.

A PAS dos WIS apresentou valores entre 109 e 131 mmHg durante o período de medidas, enquanto a dos WKY variou de 122 a 146 mmHg. De acordo com as diretrizes, para hipertensos, a PAS dentro da faixa de 120-139 mmHg representa um quadro de pré-hipertensão (38). Estudos anteriores apontam a existência de atividade simpática aumentada no coração e nos vasos sanguíneos dos SHRs, o que contribui para manutenção da PAS elevada (14, 15). Assim, a manutenção da maior pressão arterial dos WKY pode ser justificada pelo fato de esta linhagem

apresentar atividade simpático-adrenérgica semelhante à dos SHRs (9). No entanto, esse fato carece de investigação.

As análises das medidas antropométricas utilizadas serviram como controle do crescimento e desenvolvimento das linhagens estudadas, além de indicar possíveis depósitos de gordura (33). No presente estudo, os WIS16 apresentaram maiores valores de circunferência abdominal, indicando maior depósito de gordura abdominal em relação aos WKY16 (33). Os WIS16 também apresentaram maiores circunferência torácica e comprimento naso-anal em comparação aos WKY16. No entanto, com o processo de envelhecimento, os WKY48 tiveram um aumento significativo dessas variáveis, igualando-se aos WIS48. A partir dessas medidas, foi possível calcular o IMC específico para roedores, que tem sido utilizado como um indicativo de obesidade. Pode ser observado na literatura que os valores normais variam entre $0,45 \pm 0,02 \text{ g/cm}^2$ para ratos com até noventa dias de idade e $0,68 \pm 0,05 \text{ g/cm}^2$ para ratos com mais de noventa dias (33). Levando em consideração que todos os animais do presente estudo tinham mais do que noventa dias de idade, foi constatado que apenas o grupo WIS16 apresentou valores médios de IMC acima do recomendado (WIS16: $0,71 \text{ g/cm}^2$). Existem evidências de que o IMC elevado indicaria uma correlação positiva com o acúmulo de gordura, perfil lipídico alterado e estresse oxidativo em roedores (33).

Foi evidenciado que os animais da linhagem WIS apresentaram maior percentual de gordura em comparação aos WKY, independente da idade. A organização mundial da saúde preconiza que indivíduos com maior porcentagem de gordura estão sujeitos a maiores níveis de estresse térmico devido à característica isolante desse tecido (39). Nesse sentido, o tecido adiposo subcutâneo funcionaria como uma barreira térmica, diminuindo a necessidade de gasto energético para a

manutenção da temperatura corporal (40). Apesar disso, pelo menos neste estudo, a T_{central} basal dos animais foi semelhante nos grupos com diferenças no percentual de gordura. Em estudo recente, os mesmos autores discutem que a maior parte dos depósitos de gordura dos ratos situa-se em uma região mais profunda do corpo (41). Sendo assim, o posicionamento anatômico da gordura corporal encontrada nos ratos impossibilita a função de isolamento térmico desse tecido (41).

Os animais com dezesseis semanas apresentaram maior acúmulo de calor em relação aos animais mais velhos (WIS16: 309,273 cal vs. WIS48: 132,805 cal; WKY16: 281,273 cal vs. 154,986 cal; $p < 0,05$). O cálculo do acúmulo de calor leva em consideração a variação da T_{central} (42). Sendo assim, era esperado que os animais mais velhos exibissem valores menores de acúmulo de calor ao longo do dia, uma vez que estes apresentaram menor variação da T_{central} (fig. 3). Levando em consideração que os animais mais velhos apresentaram um aumento da massa corporal, pode-se concluir que, pelo menos no presente trabalho, esse não foi o fator determinante para o acúmulo de calor encontrado.

Um importante achado deste trabalho foi a resposta do ritmo circadiano da T_{central} dos animais com 48 semanas. Foi observado que os grupos de animais mais velhos tiveram sua T_{central} reduzida e não apresentaram o aumento típico de temperatura no período noturno (figuras 5 e 6), o que é caracterizado por uma baixa amplitude da curva de T_{central} (22, 43). Tal fato ficou mais evidente na linhagem WKY48, o que pode ser justificado pelo fato de os WKY serem mais sensíveis e responderem de maneira exacerbada a condições limitantes, como o envelhecimento (12).

Estima-se que quanto maior for a amplitude do ritmo circadiano, maior será a resistência deste a mudanças em seu padrão, ou seja, maiores amplitudes podem

ser associadas com menores variabilidades (26, 43). Existem evidências de associação entre os diferentes ritmos circadianos. Sendo assim, estudos prévios apontam que maiores amplitudes da T_{central} relacionam-se com a maior duração e melhor qualidade do sono, além da manutenção do nível de atividade locomotora e liberação de hormônios importantes, como a melatonina (44). Dessa forma, esses achados indicam que os animais mais velhos podem apresentar menor resistência a modificações de sua T_{central} e, conseqüentemente, dificuldade de sincronização com outras variáveis biológicas que também apresentam ritmicidade, bem como com o ambiente externo (24, 45).

Estudos prévios apontaram que o envelhecimento foi acompanhado por um declínio do metabolismo e, conseqüentemente, por uma menor disponibilidade energética (46, 47). Partindo do pressuposto de que a manutenção da T_{central} exige determinado consumo energético, o metabolismo reduzido pode ser o responsável pela redução da T_{central} em função da idade (36, 48-50).

A atividade locomotora exibiu valores semelhantes entre todos os grupos durante o período do dia, quando, por característica, esses animais se encontram em estado de repouso (23, 43, 45). Todos os grupos apresentaram aumento do nível de atividade no final da tarde e diminuição desta por volta das 02 horas. No entanto, no final da madrugada, os animais com 16 semanas voltaram a aumentar sua atividade, o que não aconteceu com os animais de 48 semanas de ambas as linhagens. Sabe-se que o ritmo circadiano da atividade locomotora possui associação com a T_{central} (23). Entretanto, mesmo com o aumento do nível de atividade, os animais com 48 semanas não apresentaram o aumento associado da T_{central} , o que reforça os indícios de perda de sincronização das variáveis biológicas por consequência do envelhecimento (24).

Portanto, as linhagens estudadas apresentam similaridades no comportamento da temperatura basal, independentemente da idade, que, por sua vez, promove uma deterioração do ritmo circadiano da temperatura, associada a um processo de perda de sincronização com a atividade locomotora.

5- Conclusões:

O comportamento termorregulatório das duas linhagens é semelhante quando jovens. No entanto, com o envelhecimento, é possível que ocorra a perda de sincronização do ritmo circadiano da T_{central} com a atividade locomotora em ambas as linhagens, mas com maior ênfase nos WKY. Outra descoberta importante foi a redução do acúmulo de calor nos animais mais velhos, o que foi demonstrado pelos menores valores de T_{central} durante as 24 horas do dia. Tal resultado possui importância clínica, uma vez que a manutenção da temperatura é de fundamental importância para o bom funcionamento do organismo.

Limitações:

Um fator limitante do estudo foi a possibilidade de desprendimento de alguns sensores de telemetria da parede do músculo reto abdominal, de forma a se deslocarem no interior da cavidade peritoneal dos animais estudados, o que pode ter suscitado o registro não adequado da temperatura central desses animais.

Referências:

1. Aiello EA, Villa-Abrille MC, Escudero EM, Portiansky EL, Perez NG, de Hurtado MC, et al. Myocardial hypertrophy of normotensive Wistar-Kyoto rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004 Apr;286(4):H1229-35.
2. Pegram BL, Ishise S, Frohlich ED. Effect of methyldopa, clonidine, and hydralazine on cardiac mass and haemodynamics in Wistar Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res*. 1982 Jan;16(1):40-6.
3. Liang N, Mitchell JH, Smith SA, Mizuno M. Exaggerated sympathetic and cardiovascular responses to stimulation of the mesencephalic locomotor region in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2016 Jan 1;310(1):H123-31.
4. Igreja B, Wright LC, Soares-da-Silva P. Sustained high blood pressure reduction with etamicastat, a peripheral selective dopamine beta-hydroxylase inhibitor. *J Am Soc Hypertens*. 2016 Mar;10(3):207-16.
5. Damatto RL, Lima AR, Martinez PF, Cezar MD, Okoshi K, Okoshi MP. Myocardial myostatin in spontaneously hypertensive rats with heart failure. *Int J Cardiol*. 2016 Jul 15;215:384-7.
6. Blanco JH, Gastaldi AC, Gardim CB, Araujo JE, Simoes MV, Oliveira LF, et al. Chronic cholinergic stimulation promotes changes in cardiovascular autonomic control in spontaneously hypertensive rats. *Auton Neurosci*. 2015 Dec;193:97-103.
7. Angelone T, Quintieri AM, Pasqua T, Filice E, Cantafio P, Scavello F, et al. The NO stimulator, Catestatin, improves the Frank-Starling response in normotensive and hypertensive rat hearts. *Nitric Oxide*. 2015 Aug 1;50:10-9.
8. Collins HL, Loka AM, DiCarlo SE. Daily exercise-induced cardioprotection is associated with changes in calcium regulatory proteins in hypertensive rats. *American Journal of Heart Circulation Physiology*. 2004;288:532-40.
9. Chiueh CC, McCarty R. Sympatho-adrenal hyperreactivity to footshock stress but not to cold exposure in spontaneously hypertensive rats. *Physiol Behav*. 1981 Jan;26(1):85-9.
10. Kurtz TW, Morris RC, Jr. Biological variability in Wistar-Kyoto rats. Implications for research with the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*. 1987 Jul;10(1):127-31.
11. Hendley ED, Cierpial MA, Mccarty R. Sympathetic-Adrenal Medullary Response to Stress in Hyperactive and Hypertensive Rats. *Physiology & Behavior*. 1988;44(1):47-51.
12. Zafar HM, Pare WP, Tejani-Butt SM. Effect of acute or repeated stress on behavior and brain norepinephrine system in Wistar-Kyoto (WKY) rats. *Brain Res Bull*. 1997;44(3):289-95.
13. Deschepper CF, Picard S, Thibault G, Touyz R, Rouleau JL. Characterization of myocardium, isolated cardiomyocytes, and blood pressure in WKHA and WKY rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002 Jan;282(1):H149-55.
14. Grassi G, Seravalle G, Quarti-Trevano F. The 'neuroadrenergic hypothesis' in hypertension: current evidence. *Exp Physiol*. 2010 May 1;95(5):581-6.
15. Oparil S, Zaman A, Calhoun DA. Pathogenesis of hypertension. *Annals of Internal Medicine*. 2003 Nov 4;139(9):761-76.

16. Tejani-Butt SM, Pare WP, Yang J. Effect of repeated novel stressors on depressive behavior and brain norepinephrine receptor system in Sprague-Dawley and Wistar Kyoto (WKY) rats. *Brain Res.* 1994 Jun 27;649(1-2):27-35.
17. Campos HO, Leite LHR, Drummond LR, Cunha DNQ, Coimbra CC, Natali AJ, et al. Temperature Control of Hypertensive Rats during Moderate Exercise in Warm Environment. *J Sport Sci Med.* 2014 Sep;13(3):695-701.
18. Frank MK, de Mello MT, Lee KS, Daubian-Nose P, Tufik S, Esteves AM. Sleep-related movement disorder symptoms in SHR are attenuated by physical exercise and an angiotensin-converting enzyme inhibitor. *Physiol Behav.* 2016 Feb 1;154:161-8.
19. Esteves AM, Lopes C, Frussa-Filho R, Frank MK, Cavagnolli D, Arida RM, et al. Spontaneously hypertensive rats: possible animal model of sleep-related movement disorders. *J Mot Behav.* 2013;45(6):487-93.
20. Carneiro-Junior MA, Quintao-Junior JF, Drummond LR, Lavorato VN, Drummond FR, da Cunha DN, et al. The benefits of endurance training in cardiomyocyte function in hypertensive rats are reversed within four weeks of detraining. *J Mol Cell Cardiol.* 2013 Apr;57:119-28.
21. Drummond LR, Kunstetter AC, Vaz FF, Campos HO, Andrade AG, Coimbra CC, et al. Brain Temperature in Spontaneously Hypertensive Rats during Physical Exercise in Temperate and Warm Environments. *Plos One.* 2016;11(5):e0155919.
22. Refinetti R. The circadian rhythm of body temperature. *Front Biosci-Landmrk.* 2010 Jan;15:564-94.
23. Refinetti R. Metabolic heat production, heat loss and the circadian rhythm of body temperature in the rat. *Exp Physiol.* 2003 May;88(3):423-9.
24. Weinert D. Circadian temperature variation and ageing. *Ageing Res Rev.* 2010 Jan;9(1):51-60.
25. Cornelissen G. Cosinor-based rhythmometry. *Theor Biol Med Model.* 2014;11:16.
26. Myers BL, Badia P. Changes in circadian rhythms and sleep quality with aging: mechanisms and interventions. *Neurosci Biobehav Rev.* 1995 Winter;19(4):553-71.
27. Krauchi K. How is the circadian rhythm of core body temperature regulated? *Clin Auton Res.* 2002 Jun;12(3):147-9.
28. Cagnacci A. Influences of melatonin on human circadian rhythms. *Chronobiol Int.* 1997 Mar;14(2):205-20.
29. Gibson EM, Williams WP, 3rd, Kriegsfeld LJ. Aging in the circadian system: considerations for health, disease prevention and longevity. *Exp Gerontol.* 2009 Jan-Feb;44(1-2):51-6.
30. Halberg J, Halberg E, Regal P, Halberg F. Changes with age characterize circadian rhythm in telemetered core temperature of stroke-prone rats. *J Gerontol.* 1981 Jan;36(1):28-30.
31. ARMITAGE P, BERRY G, editors. *The planning of statistical investigations.* Oxford, Blackwell 1987.
32. Campos HO, Leite LH, Drummond LR, Cunha DN, Coimbra CC, Natali AJ, et al. Temperature Control of Hypertensive Rats during Moderate Exercise in Warm Environment. *J Sports Sci Med.* 2014 Sep;13(3):695-701.

33. Novelli EL, Diniz YS, Galhardi CM, Ebaid GM, Rodrigues HG, Mani F, et al. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Lab Anim.* 2007 Jan;41(1):111-9.
34. Nielsen SS. *Food analysis laboratory manual*. Edition S, editor. West Lafayette: Springer; 2010.
35. Kaiyala KJ, Morton GJ, Leroux BG, Ogimoto K, Wisse B, Schwartz MW. Identification of Body Fat Mass as a Major Determinant of Metabolic Rate in Mice. *Diabetes.* 2010 Jul;59(7):1657-66.
36. Johnstone AM, Murison SD, Duncan JS, Rance KA, Speakman JR. Factors influencing variation in basal metabolic rate include fat-free mass, fat mass, age, and circulating thyroxine but not sex, circulating leptin, or triiodothyronine. *American Journal of Clinical Nutrition.* 2005 Nov;82(5):941-8.
37. Cramer MN, Jay O. Biophysical aspects of human thermoregulation during heat stress. *Auton Neurosci.* 2016 Apr;196:3-13.
38. Herdy A, López-Jiménez F, Terzic C, Milani M, Stein R, Carvalho T, et al. Diretriz Sul-Americana de Prevenção e Reabilitação Cardiovascular. *Sociedade Brasileira de Cardiologia.* 2014;103(2).
39. Koppe C, Kovats S, Jendritzky G, Menne B. *Heat Waves: Risks and Responses*. Organization WH, editor 2004.
40. Lehmann JF, Warren CG, Scham SM. Therapeutic heat and cold. *Clin Orthop Relat Res.* 1974 Mar-Apr(99):207-45.
41. Fischer AW, Csikasz R, von Essen G, Cannon B, Nedergaard J. No insulating effect of obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2016 May 17;ajpendo 00093 2016.
42. GORDON CJ. *Temperature regulation in laboratory rodents*. Press CU, editor. United Kingdom 1993.
43. Refinetti R, Ma H, Satinoff E. Body temperature rhythms, cold tolerance, and fever in young and old rats of both genders. *Exp Gerontol.* 1990;25(6):533-43.
44. Morris M, Lack L, Barrett J. The effect of sleep/wake state on nocturnal melatonin excretion. *J Pineal Res.* 1990;9(2):133-8.
45. Weinert D, Waterhouse J. Diurnally changing effects of locomotor activity on body temperature in laboratory mice. *Physiol Behav.* 1998 Mar;63(5):837-43.
46. van Pelt RE, Dinneno FA, Seals DR, Jones PP. Age-related decline in RMR in physically active men: relation to exercise volume and energy intake. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001 Sep;281(3):E633-9.
47. Fukagawa NK, Bandini LG, Young JB. Effect of age on body composition and resting metabolic rate. *Am J Physiol.* 1990 Aug;259(2 Pt 1):E233-8.
48. Lane MA, Baer DJ, Rumpler WV, Weindruch R, Ingram DK, Tilmont EM, et al. Calorie restriction lowers body temperature in rhesus monkeys, consistent with a postulated anti-aging mechanism in rodents. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Apr 30;93(9):4159-64.
49. Krems C, Luhrmann PM, Strassburg A, Hartmann B, Neuhauser-Berthold M. Lower resting metabolic rate in the elderly may not be entirely due to changes in body composition. *Eur J Clin Nutr.* 2005 Feb;59(2):255-62.

50. Nakamura K. Central circuitries for body temperature regulation and fever. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2011 Nov;301(5):R1207-28.

Capítulo 2: Estudo comparativo da termorregulação durante o exercício físico em dois modelos experimentais: Wistar versus Wistar Kyoto.

Rezende, L. M. T¹; Araújo, S. R¹; Rodrigues, J. A¹; Marins, J. C. B¹; Favorato, L. S. C²; Pereira, V. G²; Alves S, R. D. M³; Natali, A. J¹; Coimbra, C. C⁴; Prímola-Gomes, T. N¹.

1- Departamento de Educação Física – Universidade Federal de Viçosa.

2- Departamento de Medicina Veterinária – Universidade Federal de Viçosa.

3- Departamento de Nutrição – Faculdade de Ciência e Tecnologia de Viçosa.

4- Departamento de Fisiologia e Biofísica/ICB – Universidade Federal de Minas Gerais.

Resumo:

Objetivo: analisar o comportamento termorregulatório de duas linhagens amplamente utilizadas na pesquisa científica durante o exercício físico de caráter aeróbico.

Método: foram utilizados 32 animais, divididos em quatro grupos experimentais (WIS16; WKY16; WIS48; WKY48). Foram analisadas a temperatura central (T_{central}) e temperatura da pele (T_{pele}), obtidas durante o exercício físico, que foi dividido em três sessões: exercício progressivo até a fadiga (EPF); exercício constante relativo (ECR); e exercício constante absoluto (ECA). Os dados de T_{central} foram coletados por meio de transmissão do sinal de telemetria e posterior análise pelo software VitalView.

Resultados: foi constatado que os animais da linhagem WKY apresentam melhor desempenho durante o exercício aeróbico. No entanto, o comportamento da T_{central} e da T_{pele} é semelhante entre as linhagens durante os protocolos de exercício propostos. Com relação ao acúmulo de calor, foi demonstrado que os animais da linhagem WIS acumulam mais calor do que os WKY, independentemente da massa corporal.

Conclusão: as linhagens estudadas apresentam comportamento termorregulatório semelhante durante o exercício físico aeróbico.

Palavras-chave: Exercício físico; termorregulação; linhagens experimentais.

Abstract:

Objective: To analyze the thermoregulatory behavior of two strains widely used in scientific research during exercise aerobic character.

Methods: 32 animals were used and divided into four experimental groups (WIS16; WKY16; WIS48; WKY48). core temperature were analyzed (Tcentral) and skin temperature (Tskin) obtained during the exercise, which was divided into three sessions: progressive exercise until fatigue (EPF), constant exercise for (ECR) and absolute constant exercise (ECA) . Data Tcentral were collected through transmission of telemetry signal and subsequent analysis by VitalView software.

Results: it was found that animals of WKY line perform better during aerobic exercise. However, the behavior of Tcentral and Tskin is similar between the lines during the proposed exercise protocols. Regarding the heat accumulation it was found that animals of WIS lineage accumulate more heat than independent of body mass WKY.

Conclusion: the studied strains have similar thermoregulatory behavior during aerobic exercise.

Keywords: Physical exercise; thermoregulation; experimental strains.

1- Introdução:

Estudos sobre as respostas do organismo ao exercício físico têm recebido atenção ao longo dos anos, uma vez que a inatividade física é associada ao surgimento de doenças crônicas, como a hipertensão, a diabetes mellitus tipo II e a doença arterial coronariana, levando, assim, à redução da qualidade e expectativa de vida da população (1-3). Sendo assim, diversos aspectos fisiológicos relacionados à prática de exercícios físicos precisam ser entendidos. A relação entre exercício físico e controle da temperatura corporal possui grande importância, devido ao fato de o balanço térmico ser essencial à manutenção da homeostase corporal (4).

O exercício físico realizado de forma contínua promove um aumento agudo da temperatura central (T_{central}), em função de um desequilíbrio entre as taxas de produção e dissipação de calor (5). Essa resposta termorregulatória é caracterizada por duas fases, sendo, a primeira, conhecida como fase dinâmica e, a segunda, como fase estável (6). Durante a fase dinâmica, a T_{central} aumenta de forma exponencial, em função da maior demanda metabólica e, conseqüentemente, maior produção de calor imposta pelo início do exercício físico (7). Em contraste, a dissipação de calor diminui, refletida pela queda da temperatura da pele (T_{pele}), sugerindo um processo de vasoconstrição periférica, visando redistribuir o fluxo sanguíneo à musculatura ativa (8). Após esse momento inicial, a T_{pele} tende a aumentar até que a taxa de dissipação equilibre a taxa de produção de calor, promovendo, assim, a estabilização da T_{central} e da T_{pele} , caracterizando a fase dinâmica do comportamento termorregulatório durante o exercício físico (6, 8, 9).

Diante disso, o controle da temperatura corporal é fundamental durante o exercício físico, principalmente em condições patológicas, como no caso da

hipertensão arterial (16, 17). Tais estudos demonstraram que os animais da linhagem SHR apresentam maiores temperaturas abdominal e central em comparação aos WIS durante o exercício físico realizado em ambientes neutro (25°C) e quente (32°C) (16, 17).

Estudos acerca de exercício físico associado à hipertensão arterial essencial, habitualmente, utilizam o Rato Espontaneamente Hipertenso (SHR) como modelo biológico, uma vez que estes apresentam a progressão da pressão arterial semelhante ao ocorrido nos humanos (10, 11). O SHR foi desenvolvido a partir da linhagem Wistar Kyoto (WKY) e, portanto, esta tem sido a linhagem utilizada como controle dos SHRs (10). No entanto, existem evidências de que essas linhagens apresentariam grande variabilidade biológica, como padrão de pressão arterial e de crescimento distintos, em diferentes laboratórios de pesquisa (12). Os ratos da linhagem Wistar (WIS), por sua vez, têm sido apontados como uma alternativa de controle para o rato SHR, em diversas áreas, incluindo a fisiologia cardiovascular (13, 14) e a fisiologia renal (15), e também em pesquisas na área da termorregulação e exercício físico (16, 17). Embora os WIS sejam aceitos como controles dos ratos SHRs em estudos de diferentes áreas, frequentemente surge uma pergunta que ainda permanece sem resposta: os animais das linhagens WKY e WIS apresentam comportamento termorregulatório semelhante durante o exercício físico? A resposta a essa pergunta é de fundamental importância, uma vez que a escolha da linhagem experimental mais adequada é um ponto-chave na pesquisa científica.

Dessa forma, o presente estudo objetivou comparar as respostas termorregulatórias durante o exercício físico entre dois modelos experimentais (WIS vs. WKY) que são frequentemente utilizados na pesquisa científica, de modo a

esclarecer as possíveis diferenças e permitir a escolha do modelo adequado para as pesquisas na área de termorregulação e exercício físico. Nossa hipótese foi a de que os grupos das duas linhagens apresentariam comportamento termorregulatório semelhante durante o exercício físico.

2- Materiais e métodos:

2.1- Amostra:

Foram utilizados 32 animais, divididos em quatro grupos, de forma aleatória: WIS com 16 semanas (n=8), WKY com 16 semanas (n=8), WIS com 48 semanas (n=8) e WKY com 48 semanas (n=8). Os animais foram obtidos a partir do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa (UFV), permaneceram alojados em gaiolas coletivas, em ambiente controlado, com temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, ciclo de 12 horas claro/12 horas escuro, e tiveram livre acesso à água e ração *ad libitum*. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Viçosa (50/2015). Todos os procedimentos foram acompanhados por um médico veterinário (CRMV-MG: 8981).

2.2- Pressão arterial, peso corporal e medidas antropométricas:

A pressão arterial (PA) foi mensurada por meio do método não invasivo de pletismografia (LE5001; Panlab®, Barcelona, Espanha) de cauda (18). A pressão arterial foi aferida no momento inicial e final das coletas de dados, ou seja, quando os animais completaram dezesseis e quarenta e oito semanas, respectivamente.

Assim como a pressão arterial, o peso corporal dos animais também foi medido na décima sexta semana de vida dos animais, e as medidas foram repetidas

quando estes completaram 48 semanas. Para aferição, foi utilizada uma balança eletrônica (Rochelle, modelo 3252).

2.3- Procedimento cirúrgico:

Para a medida da temperatura central, foi implantado um sensor de temperatura (G2 E-Mitter, modelo ER4000, Mini-Mitter, USA) em cada animal, os quais já se encontravam sob efeito de anestésico inalatório (Isoflurano 1,5% e oxigênio 100% em fluxo constante de 1 L/min; Isoflurano, BioChimico, RJ, Brasil). Após a indução da anestesia, cada animal foi fixado em decúbito dorsal sobre uma plataforma devidamente aquecida, para evitar hipotermia induzida pelo anestésico. Feita a tricotomia e a assepsia (Iodopovidona, 10%), uma incisão ventral de aproximadamente 2 cm foi realizada na pele e, seguidamente, na linha alba do músculo reto abdominal, permitindo acesso à cavidade peritoneal. O sensor foi implantado na cavidade intraperitoneal e fixado à fáscia do músculo reto abdominal. Por fim, o músculo e a pele foram suturados, e foi realizada uma nova assepsia da região.

Imediatamente após o procedimento cirúrgico e 12 horas após, os animais receberam uma dose de 0,07 mL de antibiótico (Chemitril injetável 2,5%, Chemitec) e 0,01 mL de anti-inflamatório (Flunixin injetável-Chemitec).

2.4- Protocolo de exercício:

Respeitado o período pós-cirúrgico e a devida recuperação dos animais, foram iniciados os protocolos de exercício físico. Assim, os animais foram submetidos à adaptação à esteira rolante (velocidade de 10 m/min, inclinação de 5° e estimulação elétrica de 0,02 mA) para animais de pequeno porte (Panlab, S.L.U, Barcelona, Espanha), por 5 dias consecutivos. Após a familiarização, os animais

foram submetidos a três protocolos de exercício, com intuito de descobrir se os animais realmente apresentariam comportamento termorregulatório semelhante durante o exercício físico:

1) *Exercício progressivo até a fadiga (EPF)*. Este teve início com velocidade de 10 m/min, sendo acrescido 1 m/min a cada três minutos de exercício, até que o animal entrasse em fadiga (19-21). O estado de fadiga foi determinado como o momento em que o animal não conseguia mais acompanhar a velocidade da esteira, permanecendo na grade de estimulação elétrica por, pelo menos, dez segundos (19, 20). A velocidade máxima foi determinada como a velocidade atingida no último estágio completo.

2) *Exercício constante com intensidade relativa (ECR)*. Este foi fixado em 60% da velocidade máxima de corrida, que foi calculada a partir da velocidade máxima encontrada no EPF (22).

3) *Exercício constante com intensidade absoluta (ECA)*. Foi adotada uma velocidade de 18 m/min, com duração de trinta minutos (22).

2.5- Variáveis calculadas:

- *Limiar térmico para o aumento da temperatura da pele da cauda (LTC)*: o LTC representou o valor médio da T_{central} registrado no momento em que a temperatura da pele começou a aumentar significativamente ($p < 0,05$), em comparação com o menor valor atingido após o início do exercício (8).

- *Sensibilidade termoeferente (ganho)*: foi obtido a partir da inclinação da reta na fase do aumento exponencial da temperatura da pele, em função da variação da temperatura central (17).

- *Acúmulo de calor (AC)*: o AC foi calculado utilizando a fórmula adaptada seguinte (5), sendo normalizado para cada 100 g de peso corporal.

$$AC = [(\Delta T_{int} \cdot m \cdot c)100]/m$$

Onde:

AC: Acúmulo de calor (cal);

ΔT_{int} : Diferença entre a $T_{central}$ final e inicial do exercício (°C);

m: massa corporal (g);

c: calor específico dos tecidos do animal (0,8264 cal.g⁻¹.°C⁻¹).

- *Taxa de acúmulo de calor (TAC)*: a TAC foi calculada utilizando a fórmula adaptada seguinte, sendo normalizada para cada 100 g de peso corporal (5).

$$TAC = \left(\frac{\Delta T_{int} \cdot m \cdot c}{TTE} \right) 100/m$$

Onde:

TAC: Taxa de acúmulo de calor (cal.min⁻¹);

ΔT_{int} : variação da temperatura interna entre o fim e o início do exercício (°C);

m: massa corporal (g);

c: calor específico dos tecidos do animal (0,8264 cal.g⁻¹.°C⁻¹);

TTE: tempo total de exercício (min).

- *Taxa de aquecimento corporal (TaqC)*: foi calculado utilizando a fórmula adaptada seguinte (5), sendo normalizada para cada 100 g de peso corporal.

$$TaqC = \left(\frac{\Delta T_{int}}{TTE} \right) 100/m$$

Onde:

TaqC: Taxa de aquecimento corporal ($^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$);

ΔT_{int} : variação da temperatura interna entre o fim e o início do exercício;

TTE: tempo total de exercício até a fadiga (min).

- *Trabalho (Kgm)*: para quantificar o trabalho realizado pelos animais, foi utilizada a seguinte fórmula (23, 24):

$$W = m \cdot TTE \cdot v \cdot \text{sen}\alpha$$

Onde:

W: Trabalho (Kgm);

m: massa corporal (kg);

TTE: tempo total de exercício (min);

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

sen α : inclinação da esteira.

2.6- Análise estatística:

Para verificar a normalidade dos dados, foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk. Em seguida, para análise da variação da T_{central} e da T_{pele} ao longo do tempo de exercício físico, foi utilizada a ANOVA, com parcelas subdivididas, seguido do teste

post hoc LSD ou Scott-Knott, quando adequado. Para comparação da massa corporal e das variáveis calculadas foi utilizada a ANOVA two way, seguido do post hoc de Tukey. Foi adotado um nível de significância de $\alpha=5\%$.

3- Resultados:

A figura 1 apresenta os dados referentes à massa corporal e à pressão arterial sistólica (PAS) dos WIS e WKY, com 16 e com 48 semanas. Com relação à massa corporal, foi encontrado efeito da linhagem apenas dentro do grupo de animais com 48 semanas, no qual os WKY48 exibiram menor massa corporal em comparação aos WIS48. Foi observado também efeito da idade para ambas as linhagens, quando os animais mais velhos apresentaram massa corporal superior em relação aos mais novos. No painel B, onde estão expostos os resultados da PAS, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos.

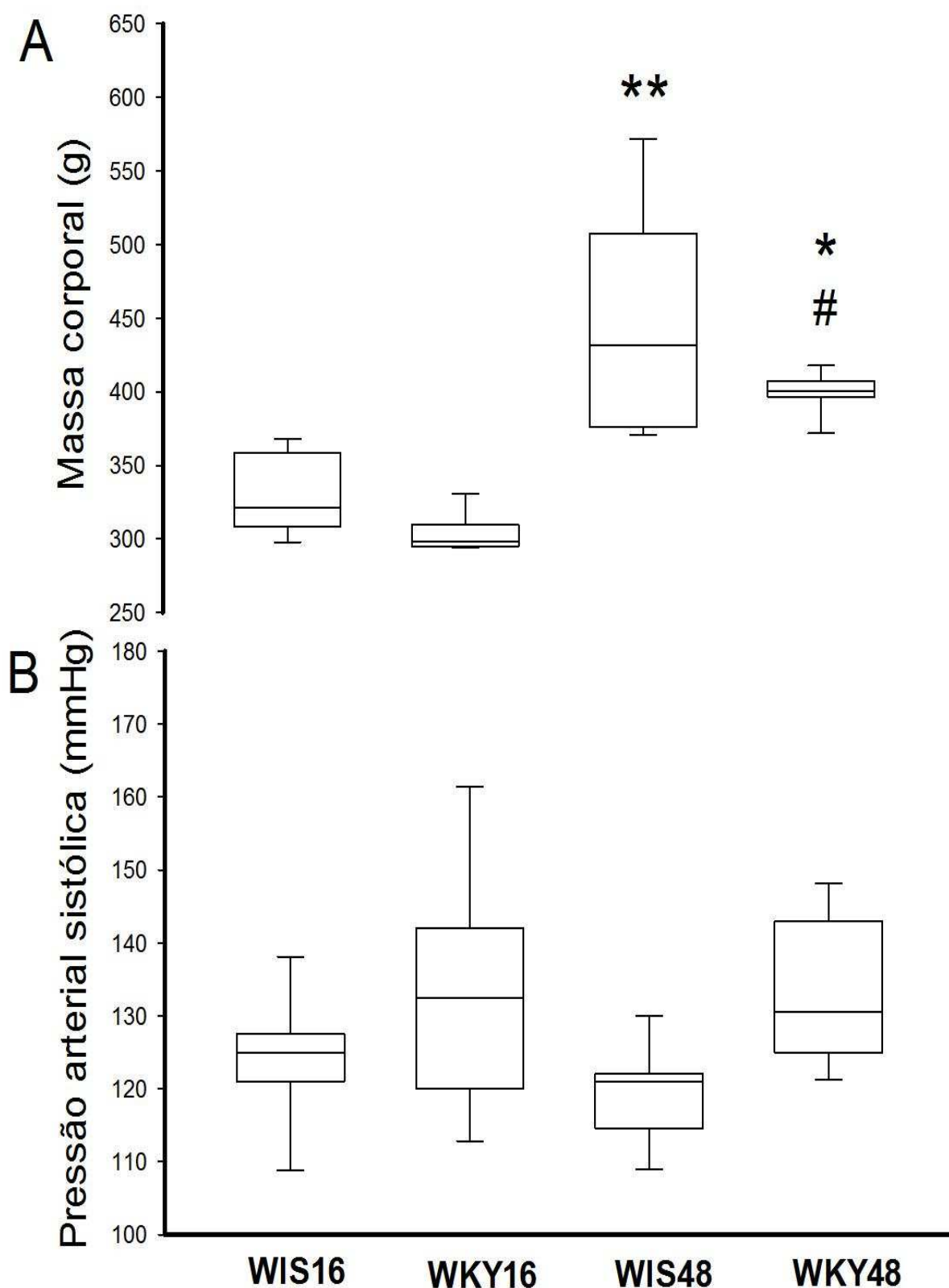


Figura 1. Massa corporal (A) e pressão arterial sistólica (B) dos animais com dezesseis e quarenta e oito semanas. Dados apresentados como mediana e percentis ($P < 0,05$). * WKY48 vs. WKY16; **WIS48 vs. WIS16; # WKY48 vs. WIS48.

Na figura 2, estão expostos os dados de desempenho durante o EPF. É possível observar, no painel A, que os WKY16 permaneceram correndo por um maior período de tempo (51 min). Confirmando esses resultados, o painel C apresenta o tempo total de exercício, onde foram observados efeitos da linhagem entre os animais com 16 semanas, indicando que os WKY16 suportaram maior tempo total de exercício e também um efeito da idade para linhagem WKY, uma vez que os animais com 48 semanas apresentaram uma queda de desempenho em relação aos animais jovens. Entretanto, não foram encontradas diferenças no trabalho realizado pelos animais durante o EPF (painel B).

A figura 3 apresenta os dados referentes à T_{central} e da T_{pele} durante o EPF. Não foram encontradas diferenças no comportamento da T_{central} dos animais nesse protocolo de exercício físico. Na T_{pele} , foi encontrada diferença entre linhagens com 48 semanas, do minuto 7 ao 10, indicando maior dissipação de calor nos WKY48 do que nos WIS48.

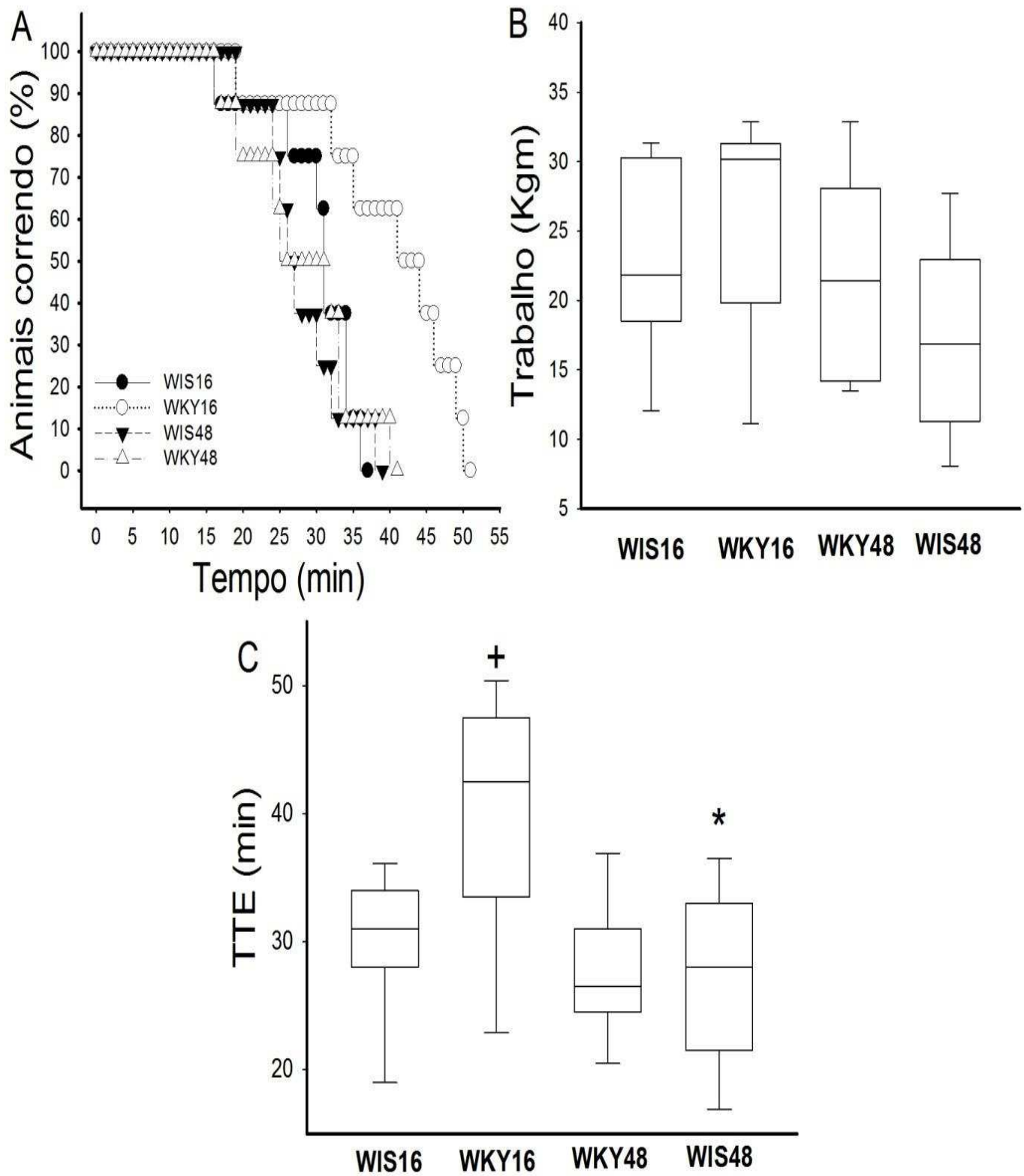


Figura 2. Desempenho dos animais no EPF. Porcentagem de animais correndo ao longo do tempo de teste (A), trabalho dos animais (B) e tempo total de exercício (C). Dados apresentados como mediana e percentis ($p < 0,05$). + WIS16 vs WKY16; * WKY48 vs WKY16.

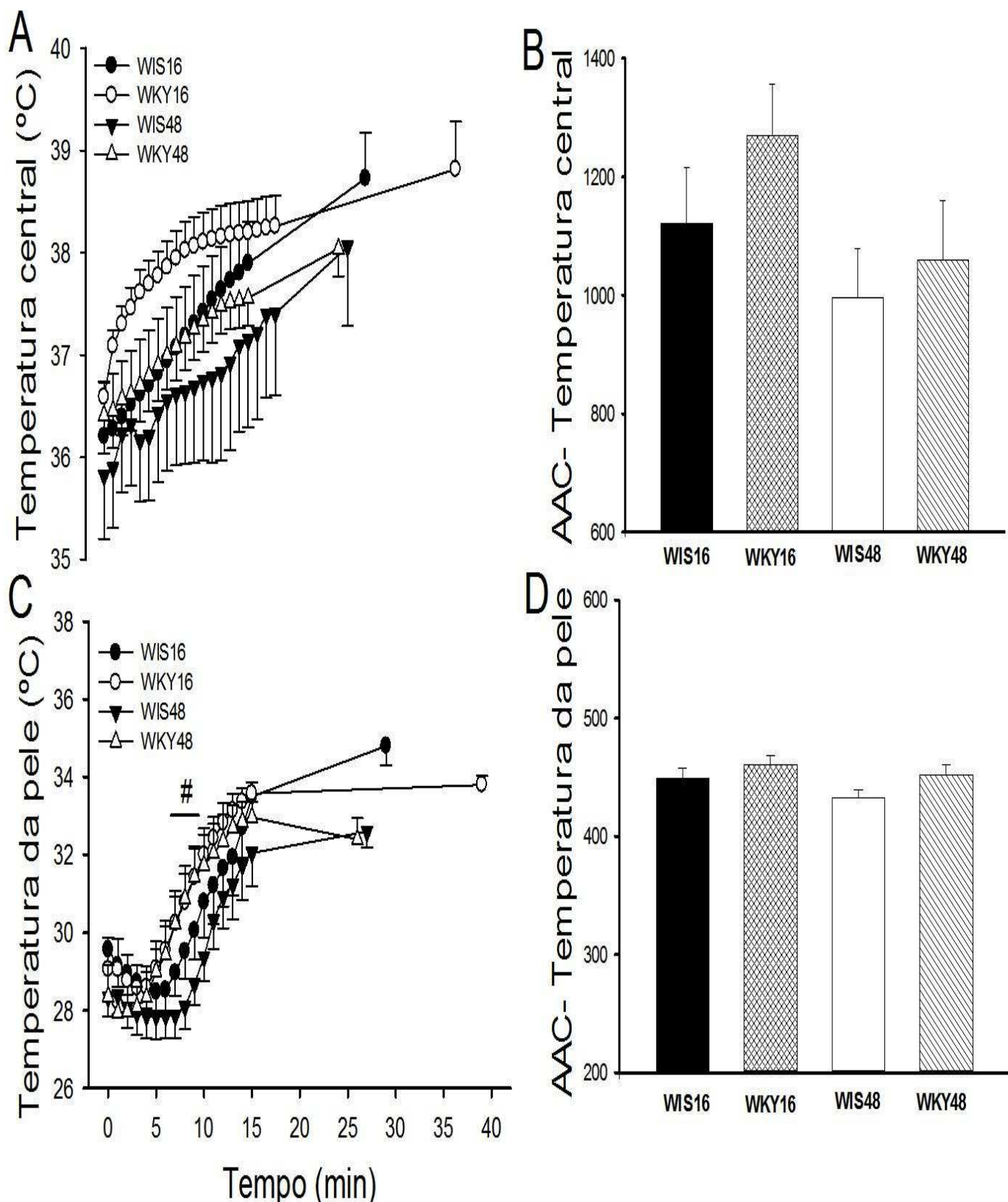


Figura 3 Temperatura central (A), área abaixo da curva da T_{central} (B), temperatura da pele da cauda (C) e área abaixo da curva da T_{pele} (D) durante o EPF. Dados apresentados como média \pm EPM ($p < 0,05$). # WIS48 vs. WKY48.

Na figura 4, pode-se observar o comportamento da T_{central} e da T_{pele} durante os ECF (60% da VMC). Foram encontradas as seguintes velocidades médias para essa modalidade de exercício: WIS16 (10,4 m/min), WKY16 (13,05 m/min), WIS48 (10,57 m/min) e WKY48 (10,8 m/min). Foi possível observar um efeito da linhagem na T_{central} , pois os animais WIS48 apresentaram menor T_{central} no minuto 0 em comparação aos WKY48. Foi encontrado também um efeito da idade, na medida em que os WIS48 apresentaram menor T_{central} nos minutos 0, 1, 22 e 30 em relação aos WIS16. Na T_{pele} , foram demonstrados efeitos da linhagem, uma vez que os WKY48 exibiram valores maiores do minuto 4 ao 12, indicando maior dissipação nesse período, em relação aos WIS48. Foi observado também que os WIS16 apresentaram maior T_{pele} no minuto 16 do que os WKY16. Foi identificado também efeito da idade, pelo fato de os WKY48 exibirem maior T_{pele} do minuto 5 ao 9 e no minuto 16 em relação aos WKY16.

A figura 5 exhibe os resultados da T_{central} e da T_{pele} dos animais durante o ECA (18 m/min). Na T_{central} , foram encontrados efeitos da linhagem do minuto 19 ao 21, quando os WIS48 exibiram maior T_{central} em relação WKY48. Foi encontrado um efeito da idade do minuto 19 ao 30, quando os WKY16 apresentaram maior T_{central} do que os WKY48. Na área abaixo da curva referente à T_{central} , foi encontrada diferença entre idades para o grupo WKY, uma vez que os WKY48 exibiram valores menores do que os WKY16 para essa variável. Na T_{pele} , foi observado um efeito da linhagem entre os animais com 48 semanas, do minuto 19 ao 21, quando os WKY48 apresentaram valores maiores nesse período do exercício em comparação aos WIS48.

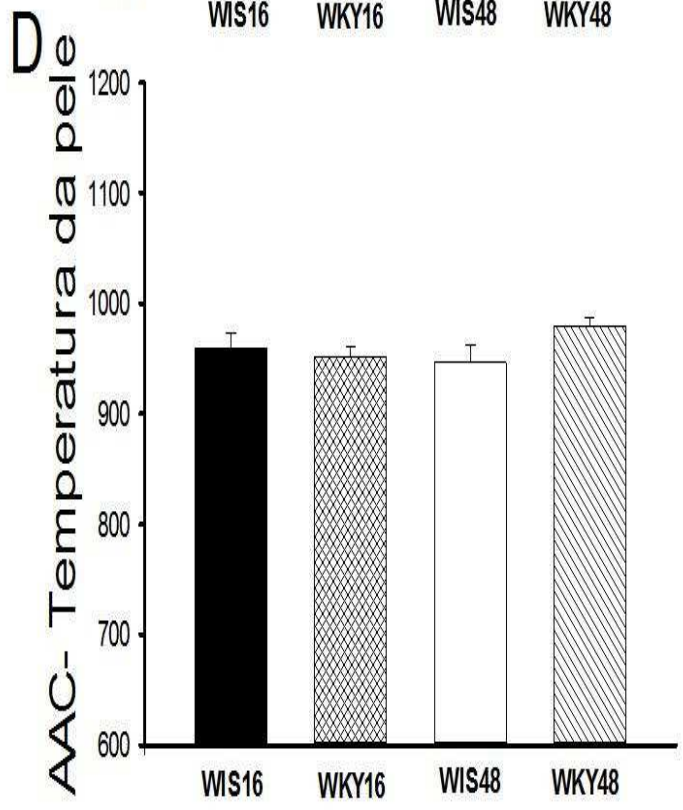
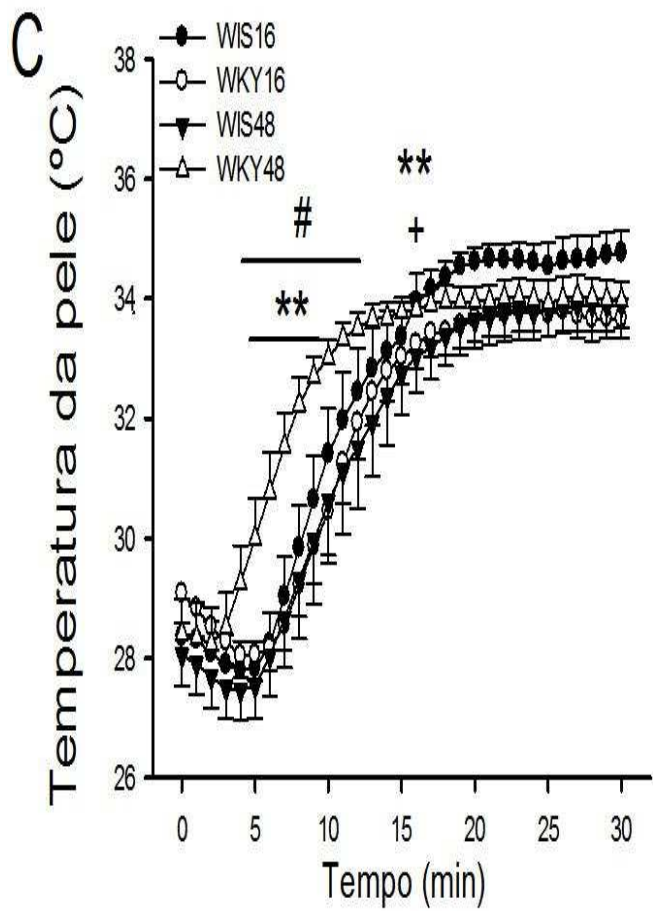
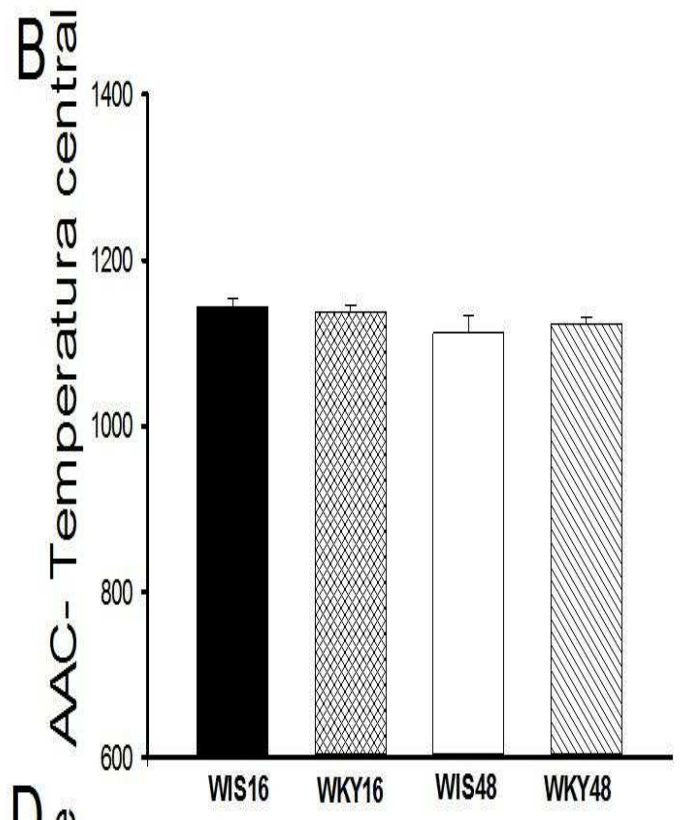
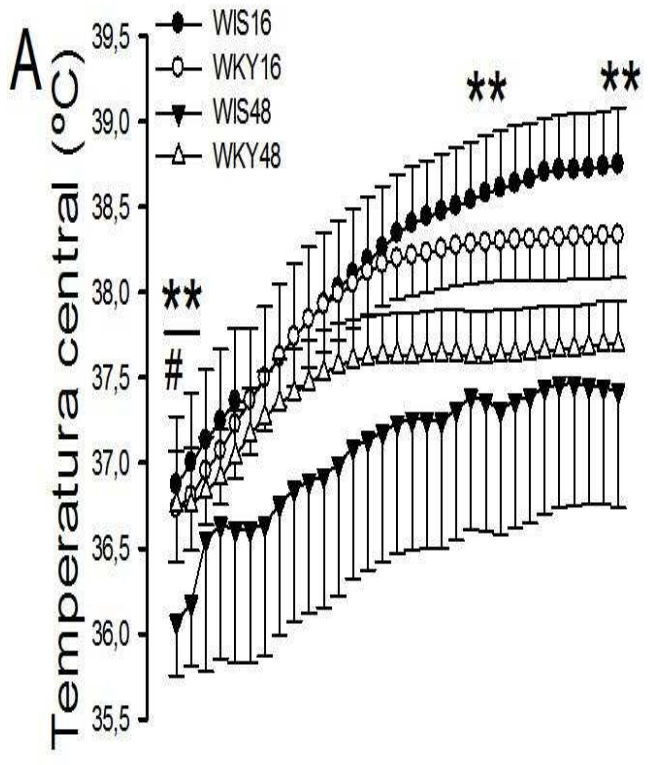


Figura 4. Temperatura central (A), área abaixo da curva da $T_{central}$ (B), temperatura da pele da cauda (C) e área abaixo da curva da T_{pele} (D) durante o protocolo de exercício relativo. Dados apresentados como média \pm EPM ($p < 0,05$). **WIS48 vs. WIS16; #WIS48 vs. WKY48.

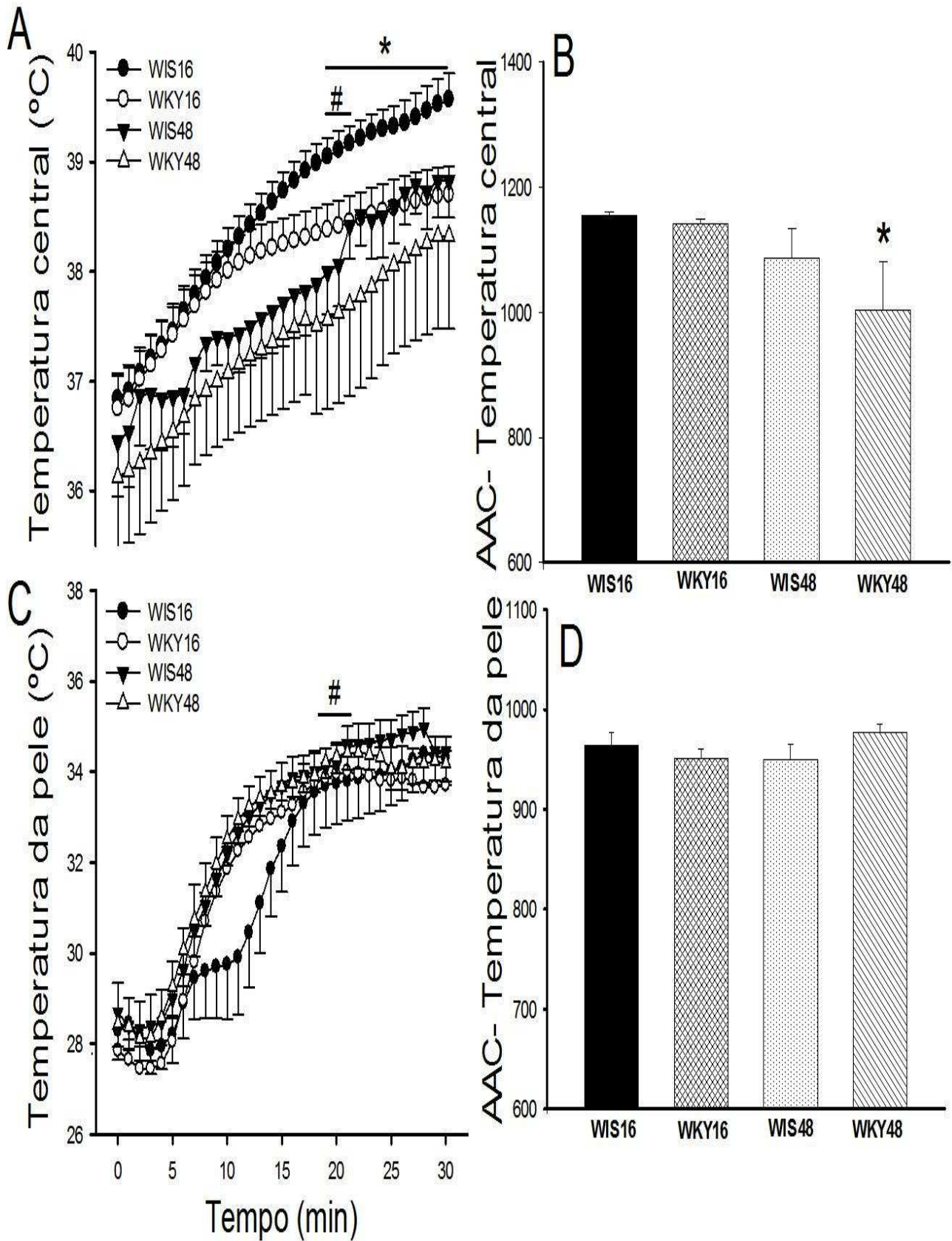


Figura 5 Temperatura central (A) e área abaixo da curva da T_{central} (B) e temperatura da pele da cauda (C) e área abaixo da curva da T_{pele} (D) durante o protocolo de exercício absoluto. Dados apresentados como média \pm EPM ($p < 0,05$). *WKY48 vs. WKY16; #WIS48 vs. WKY48.

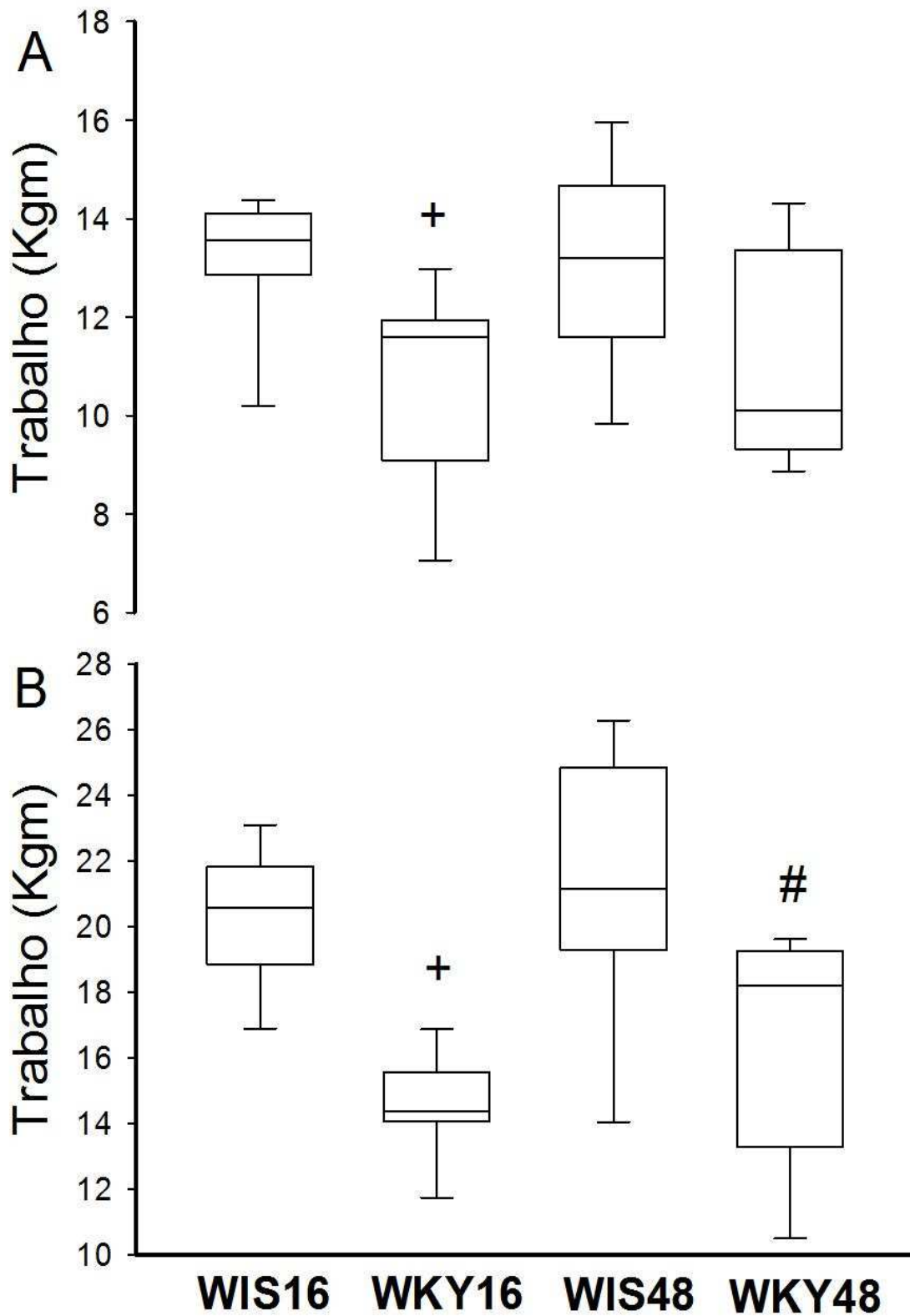


Figura 6. Trabalho (Kgm) dos animais nos protocolos de exercício relativo (A) e absoluto (B). Dados apresentados como mediana e percentis ($p < 0,05$). + WIS16 vs. WKY16; # WIS48 vs WKY48.

A figura 6 apresenta os resultados do trabalho realizado pelos animais durante o ECR e ECA. É possível observar que, no ECR, existe um efeito da linhagem entre os animais com 16 semanas, indicando que os WKY16 realizaram menos trabalho do que os WIS16. Já no ECA, foram encontrados efeitos da linhagem tanto para os animais com 16, quanto para os animais com 48 semanas, pois, em ambos os casos, os animais da linhagem WKY realizaram menor trabalho em relação aos WIS.

A figura 7 apresenta a variação da T_{pele} em função do aumento da $T_{central}$. A figura 8 exibe os valores de $T_{central}$, no qual foi estabelecido o limiar para vasodilatação da T_{pele} dos animais, onde não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos. Do lado direito, é apresentada a sensibilidade da resposta termofetora após o disparo desse sinal para vasodilatação. Foi encontrado um efeito da linhagem entre os animais com 48 semanas no ECA, sugerindo que os animais do grupo WKY apresentaram maior sensibilidade termofetora nesse momento.

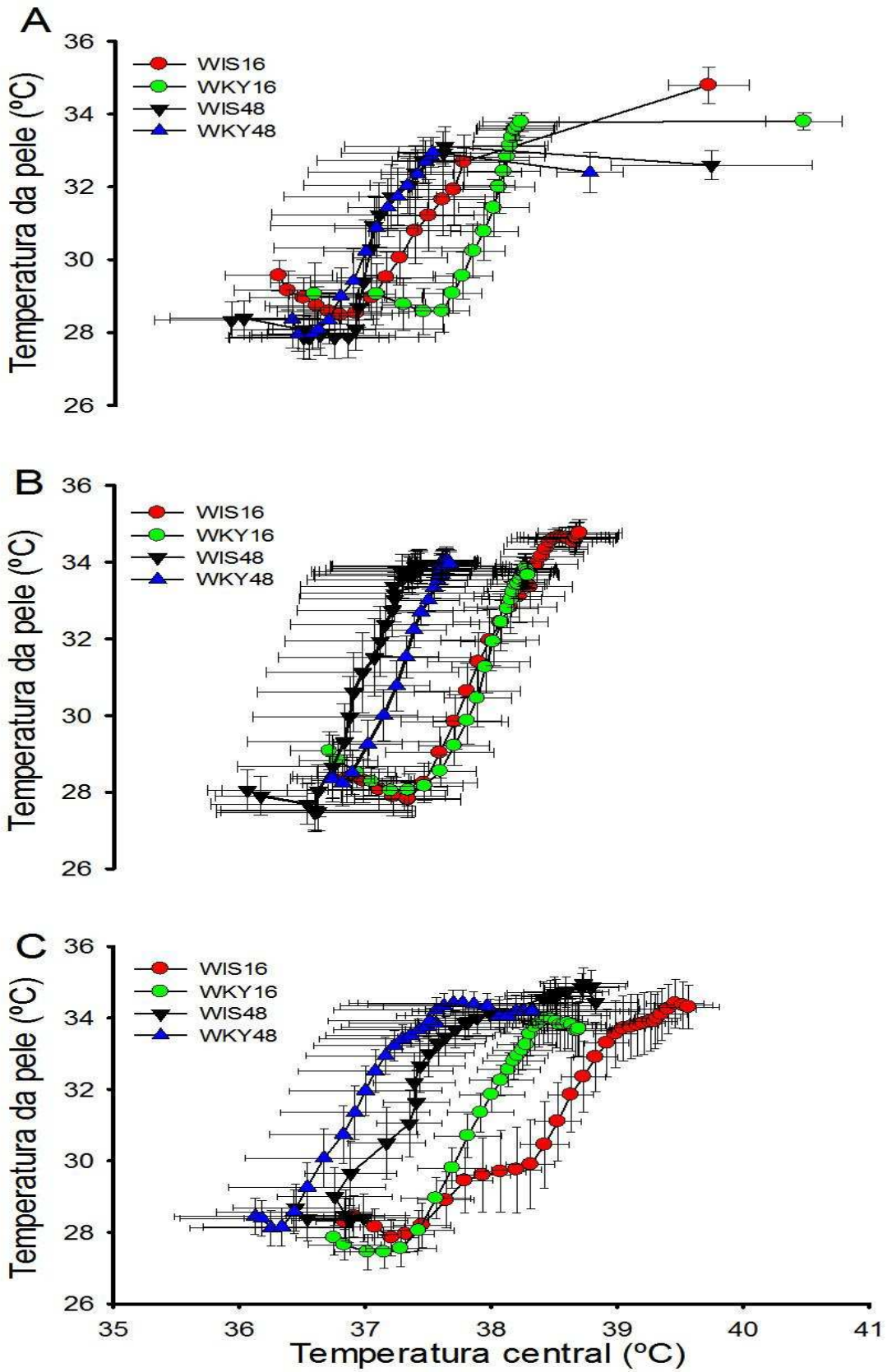


Figura 7. Relação entre temperatura da pele e temperatura central no EPF (A), ECR (B) e ECA (C).

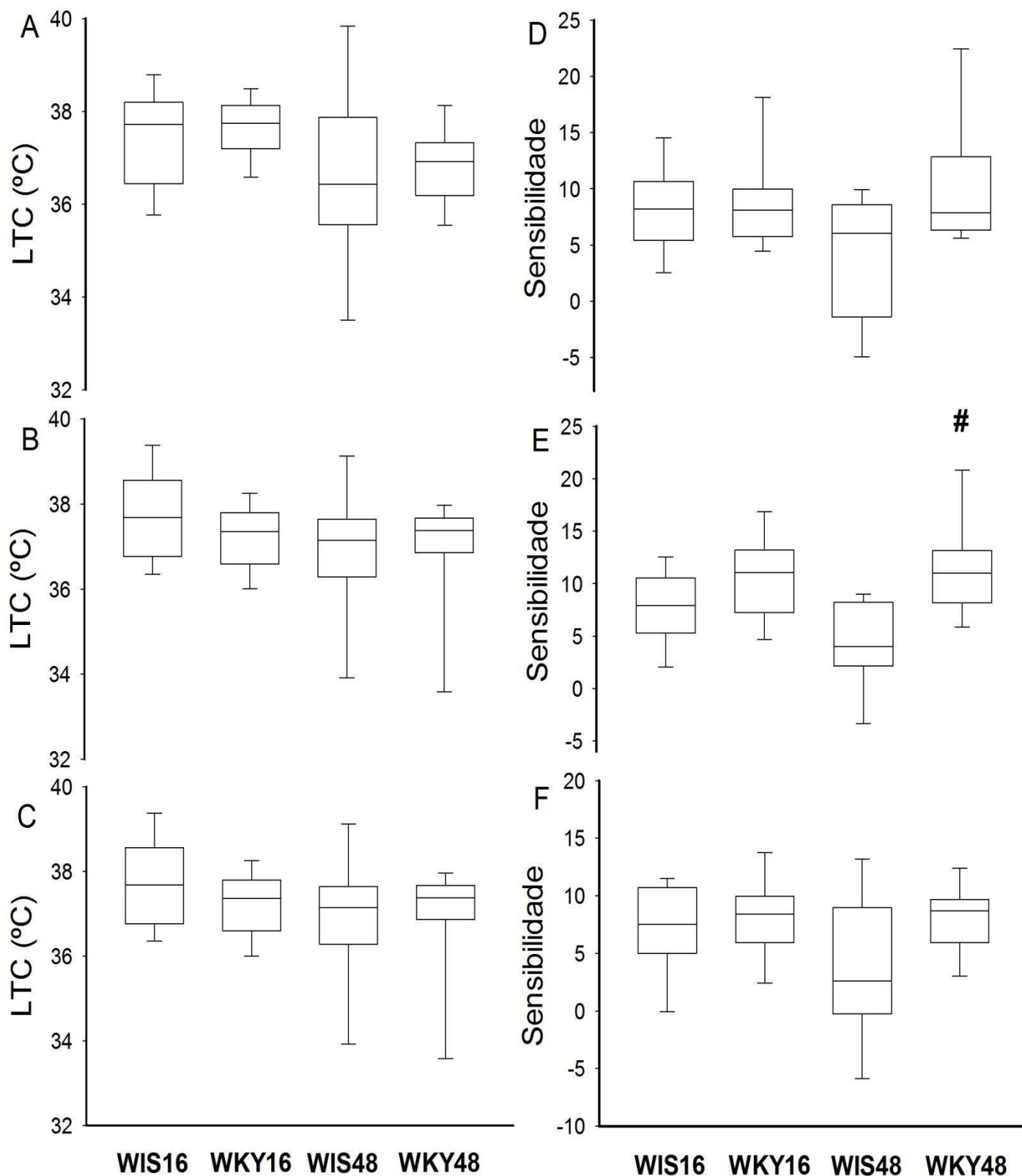


Figura 8. Limiar térmico para vasodilatação da cauda durante os protocolos de exercício máximo (A), relativo (B) e absoluto (C) e sensibilidade termoeferente nos exercícios máximo (D), relativo (E) e absoluto (F). Dados apresentados como mediana e percentis ($p < 0,05$). # WIS48 vs. WKY48.

A figura 9 apresenta os resultados de acúmulo de calor (AC) e da taxa de acúmulo de calor (TAC) nos três protocolos de exercício. Para o AC, foi encontrado efeito da linhagem para os animais com 48 semanas no protocolo de exercício absoluto (painel B), dentre os quais os WIS48 apresentaram maior acúmulo de calor do que os WKY48. Já para a variável TAC, foi observado efeito da linhagem para os animais com 16 semanas no EPF, dentre os quais os WIS16 apresentaram maior TAC do que os WKY16.

A figura 10 apresenta os resultados da taxa de aquecimento corporal (TaqC) dos animais em todos os protocolos de exercício físico. Foi encontrado um efeito da linhagem entre os animais com 48 semanas, em que os WIS48 apresentaram maior TaqC em relação aos WKY48 no ECR. Além disso, pode-se observar um efeito da idade, visto que os WKY48 apresentaram menor TaqC do que os WKY16, também no ECR.

Uma vez que os animais com 48 semanas apresentam diferenças na massa corporal, foram selecionados quatro animais do grupo WIS48 e quatro do grupo WKY48 para posterior análise do acúmulo de calor (figura 11). Foi encontrada uma diferença significativa entre as linhagens, em que os WIS48 exibiram maior AC em comparação aos WKY48.

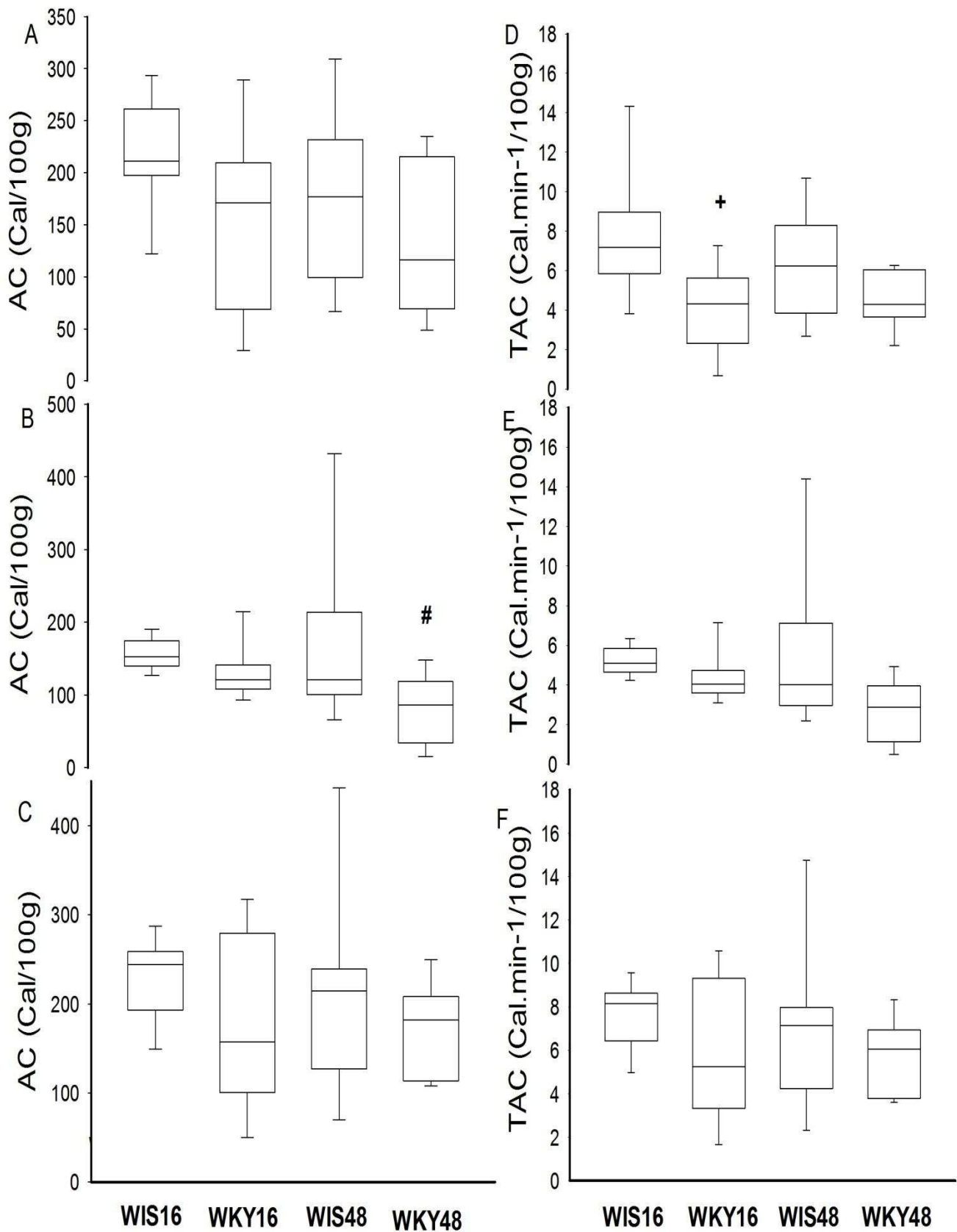


Figura 9. Acúmulo de calor (AC) dos animais nos protocolos de exercício máximo (A), relativo (B) e absoluto (C). Taxa de acúmulo de calor (TAC) durante os protocolos de exercício máximo (D), relativo (E) e progressivo (F). Dados apresentados como mediana e percentis ($p < 0,05$). + WKY16 vs. WIS16. # WIS48 vs. WKY48.

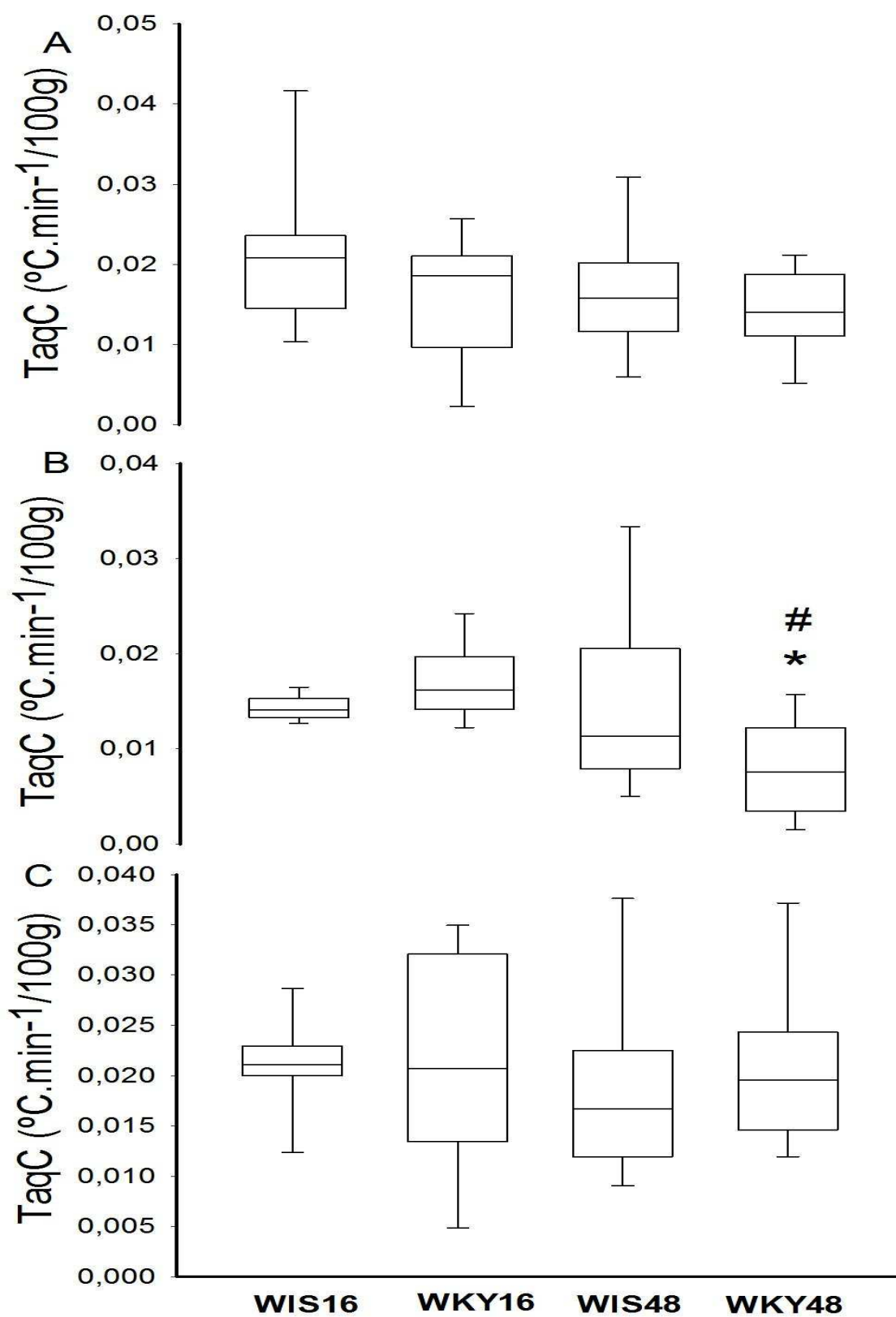


Figura 10. Taxa de aquecimento corporal durante os protocolos de exercício máximo (A), relativo (B) e absoluto (C). Dados apresentados como mediana e percentis ($p < 0,05$). # WKY48 vs. WIS48; * WKY48 vs. WKY16.

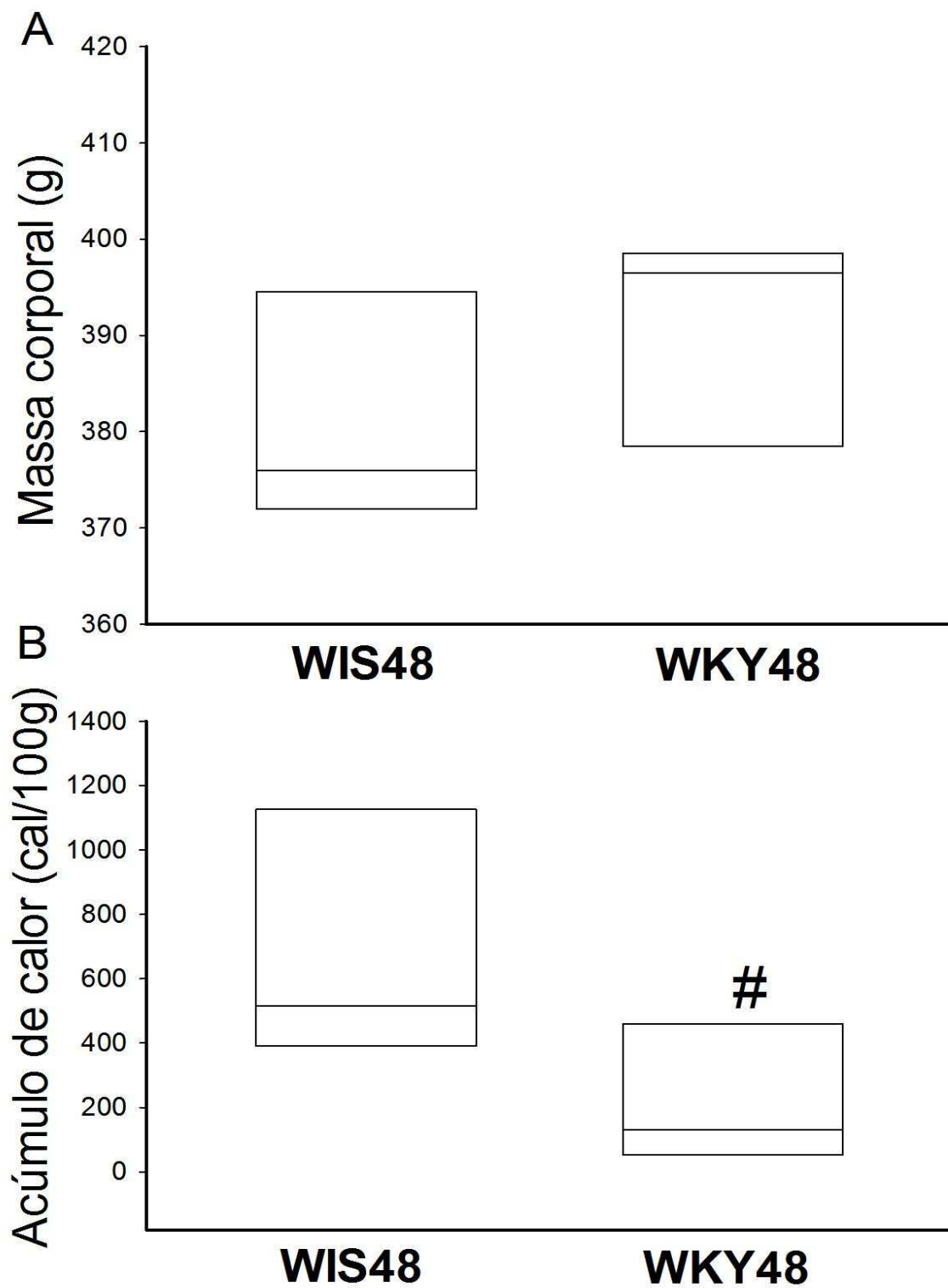


Figura 11. Animais com massa corporal semelhante (A) e seu acúmulo de calor (B) (n=4) durante o ECR. Dados apresentados como mediana e percentis (p<0,05). # WIS48 vs WKY48.

4- Discussão:

Este estudo teve como objetivo avaliar as respostas termorregulatórias durante o exercício físico em duas linhagens experimentais amplamente utilizadas na pesquisa científica (WIS e WKY). A hipótese levantada foi parcialmente confirmada, uma vez que as linhagens apresentaram comportamento termorregulatório semelhante durante o exercício físico. No entanto, os animais da linhagem WIS, pelo menos neste trabalho, demonstraram acumular mais calor do que os WKY durante o exercício físico.

Ambos os grupos estudados são caracterizados como normotensos e, portanto, são utilizados como animais-controle em pesquisas com os Ratos Espontaneamente Hipertensos (SHR) (13, 16). No entanto, existem evidências que colocam em dúvida a utilização dos WKY nessa função, uma vez que relatos apontam que esses animais apresentam grande variabilidade biológica entre os diferentes laboratórios que os utilizam (12).

Os animais da linhagem WIS com 48 semanas apresentaram massa corporal maior em relação aos WKY com a mesma idade. Esses dados possuem importância, uma vez que evidências apontam que a massa corporal influencia diretamente na produção e no acúmulo de calor metabólico em humanos e roedores (25-28).

Com relação à PAS, os animais da linhagem WIS apresentaram valores mais homogêneos, enquanto os WKY exibiram valores heterogêneos, independentemente da idade. Mesmo após essa observação, não foi encontrada diferença entre os animais das diferentes linhagens. Os resultados de maior heterogeneidade dos WKY observados vão de encontro aos achados de grande variabilidade biológica da linhagem WKY, entre os diferentes laboratórios de pesquisa (12). Além disso,

existem pesquisas que observaram valores de PAS mais baixos do que os encontrados neste trabalho para a linhagem WKY (29, 30).

O comportamento da T_{central} durante o EPF não apresentou diferenças estatísticas entre os grupos. Já a T_{pele} dos WKY48 foi maior do minuto 7 ao minuto 10, em comparação aos WIS48, indicando maior dissipação de calor durante esse período. Sabe-se que o sistema termorregulatório dos roedores utiliza-se de mecanismos como a vasodilatação dos pés e evaporação da saliva que esses animais espalham pelo corpo para promover a dissipação de calor durante o repouso (22, 28). Contudo, durante o exercício físico, a vasodilatação da cauda se torna a principal via de dissipação de calor desses animais (5, 31, 32).

Na avaliação de desempenho no EPF, os WKY16 correram por um período de tempo maior quando comparado a outros grupos, todavia o trabalho realizado não foi diferente entre os grupos. Essas descobertas podem ser explicadas, em parte, pelo fato de os WKY16 possuírem menor massa corporal que os grupos de animais mais velhos (WIS48; WKY48). Entretanto, a massa corporal entre os animais com 16 semanas foi semelhante (WIS16 vs. WKY16). Assim, os animais WIS16 podem ter corrido por um menor período de tempo em função de sua maior taxa de acúmulo de calor (WKY16: $4,12 \text{ cal}\cdot\text{min}^{-1}$ vs. WIS16: $7,93 \text{ cal}\cdot\text{min}^{-1}$; $p < 0,05$) observada durante o exercício progressivo até a fadiga. O aumento excessivo da temperatura orgânica é responsável por promover alterações funcionais e estruturais (33). Tais alterações afetam o transporte eletrolítico através de membranas, a interação entre os filamentos de actina e miosina e a respiração mitocondrial, além de promover um aumento na razão de troca respiratória, o que indica maior utilização de energia por meio de vias anaeróbicas (34).

Com o intuito de entender o comportamento termorregulatório durante o exercício em uma faixa de esforço relativo para todos os animais, foi realizado um protocolo de corrida com intensidade relativa a 60% da VMC.. O trabalho realizado foi menor no grupo WKY16 em relação ao WIS16, no entanto não houve diferença entre os animais mais velhos, mesmo com esses grupos apresentando diferença na massa corporal e no acúmulo de calor. Assim como no EPF, os animais do grupo WKY48 apresentaram maior T_{pele} do minuto 4 ao 12 em relação aos WIS48. Além disso, com o envelhecimento, o grupo WIS apresentou uma redução da capacidade de dissipar calor do minuto 5 ao 9. Tais observações indicam que o grupo WKY dissipa, de forma mais eficiente, o calor produzido durante o exercício físico, o que é refletido pelos resultados do acúmulo de calor, uma vez que os WIS48 apresentaram valores maiores do que os WKY48 no protocolo de exercício relativo.

Além disso, foi realizado um protocolo de exercício a uma velocidade absoluta de 18 m/min (ECA). Com isso, vale ressaltar que o exercício absoluto é utilizado a fim de solicitar um determinado dispêndio energético (normalmente expresso em Kcal/min) (22). Os animais do grupo WKY realizaram um trabalho menor do que os WIS para correr os trinta minutos na intensidade determinada (WKY16: 16,45 Kgm vs. WIS16: 21,14 Kgm; WKY48: 14,51 Kgm vs. WIS48: 20,26 Kgm). Como apresentado anteriormente, não foram encontradas diferenças no acúmulo de calor entre as linhagens nesse protocolo de exercício.

Os WKY16 apresentaram maior $T_{central}$ do minuto 19 ao 30 em relação aos WKY48, indicando que o envelhecimento pode ter levado a uma redução da $T_{central}$ durante o ECA. Esses achados podem ter relação com os descritos no primeiro capítulo da dissertação, nos quais os animais da linhagem WKY demonstraram diminuição do ritmo circadiano da $T_{central}$ em função do envelhecimento. Apesar

desses resultados, não foram encontradas diferenças no LTC, que representa o valor de temperatura interna, em razão do qual é enviado o comando para vasodilatação da pele da cauda e conseqüente aumento da dissipação de calor (8).

É possível observar que os animais da linhagem WIS tenderam a acumular mais calor do que os WKY. No EPF, os WIS48 acumularam mais calor do que os WKY48. Com relação à taxa de acúmulo de calor, os WKY16 demonstraram valores menores do que os observados nos WIS16, também no EPF, contudo não foi encontrada diferença na taxa de aquecimento corporal no mesmo protocolo de exercício, mas, sim, no ECR, em que os WKY48 demonstraram uma menor TaqC do que a verificada nos WIS48 e nos os WKY16. A partir desses resultados, seria possível concluir que esse maior acúmulo de calor ocorresse devido à maior massa corporal dos animais da linhagem WIS (27). Todavia, conforme demonstrado na figura 13, foram selecionados quatro animais, de ambas as linhagens, com 48 semanas e com massa corporal semelhante, com o objetivo de descobrir se o armazenamento de calor realmente sofre influência da massa corporal. Foi constatado que, mesmo para os animais de massa corporal semelhante, os animais da linhagem WIS acumularam mais calor do que os WKY. Assim, pelo menos neste estudo, o maior acúmulo de calor dos animais da linhagem WIS durante o exercício físico pode ter acontecido em função do maior percentual de gordura corporal presente nesses animais (35, 36), como apontado no primeiro capítulo desta dissertação.

5- Conclusões:

As linhagens estudadas apresentam características semelhantes em grande parte das variáveis termorregulatórias estudadas durante o exercício físico. No entanto, as poucas diferenças encontradas precisam ser observadas atentamente,

pois podem influenciar nos resultados das pesquisas, por exemplo, a massa corporal e o percentual de gordura. A linhagem de animais WKY apresentou melhor desempenho no exercício aeróbico e acumulou menos calor em função de sua menor massa e gordura corporal. No entanto, é estabelecido que existe uma grande variabilidade biológica nessa linhagem, o que pode ser observado dentro do próprio grupo estudado, que apresentou resultados heterogêneos na grande maioria dos dados.

Limitações:

Um fator limitante do estudo foi a possibilidade de desprendimento de alguns sensores de telemetria da parede do músculo reto abdominal, de forma a se deslocarem no interior da cavidade peritoneal desses animais, o que pode ter suscitado o registro não adequado da temperatura central dos animais.

Referências:

1. Lee IM, Shiroma EJ, Lobelo F, Puska P, Blair SN, Katzmarzyk PT, et al. Effect of physical inactivity on major non-communicable diseases worldwide: an analysis of burden of disease and life expectancy. *Lancet*. 2012 Jul 21;380(9838):219-29.
2. Kohl HW, Craig CL, Lambert EV, Inoue S, Alkandari JR, Leetongin G, et al. The pandemic of physical inactivity: global action for public health. *Lancet*. 2012 Jul 21;380(9838):294-305.
3. Fiuzza-Luces C, Garatachea N, Berger NA, Lucia A. Exercise is the Real Polypill. *Physiology*. 2013 Sep;28(5):330-58.
4. Bouchama A, Knochel JP. Medical progress - Heat stroke. *New Engl J Med*. 2002 Jun 20;346(25):1978-88.
5. GORDON CJ. Temperature regulation in laboratory rodents. Press CU, editor. United Kingdom 1993.
6. Lacerda ACR, Marubayashi U, Balthazar CH, Coimbra CC. Evidence that brain nitric oxide inhibition increases metabolic cost of exercise, reducing running performance in rats. *Neuroscience Letters*. 2006 Jan 30;393(2-3):260-3.
7. Gagnon D, Kenny GP. Does sex have an independent effect on thermoeffector responses during exercise in the heat? *J Physiol-London*. 2012 Dec;590(23):5963-73.
8. Lacerda ACR, Marubayashi U, Coimbra CC. Nitric oxide pathway is an important modulator of heat loss in rats during exercise. *Brain Res Bull*. 2005 Sep 30;67(1-2):110-6.
9. Wilson NC, Gisolfi CV, Farber J, Hinrichs DK. Colonic and tail-skin temperature responses of the rat at selected running speeds. *Journal of Applied Physiology*. 1978;44(4):571-5.
10. Okamoto K, Tabei R, Fukushima M, Nosaka S, Yamori Y. Further observations of the development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J*. 1966 Jun;30(6):703-16.
11. Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J*. 1963 Mar;27:282-93.
12. Kurtz TW, Morris RC, Jr. Biological variability in Wistar-Kyoto rats. Implications for research with the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*. 1987 Jul;10(1):127-31.
13. Collins HL, Loka AM, DiCarlo SE. Daily exercise-induced cardioprotection is associated with changes in calcium regulatory proteins in hypertensive rats. *American Journal of Heart Circulation Physiology*. 2004;288:532-40.
14. Carneiro-Junior MA, Quintao-Junior JF, Drummond LR, Lavorato VN, Drummond FR, da Cunha DN, et al. The benefits of endurance training in cardiomyocyte function in hypertensive rats are reversed within four weeks of detraining. *J Mol Cell Cardiol*. 2013 Apr;57:119-28.
15. Wende P, Strauch M, Unger T, Gretz N, Rohmeiss P. [Autoregulation of kidney circulation, glomerular filtration rate and plasma renin activity in spontaneously hypertensive rats and normotensive Wistar rats]. *Med Klin (Munich)*. 1993 Apr 15;88(4):207-11.
16. Campos HO, Leite LHR, Drummond LR, Cunha DNQ, Coimbra CC, Natali AJ, et al. Temperature Control of Hypertensive Rats during Moderate Exercise in Warm Environment. *J Sport Sci Med*. 2014 Sep;13(3):695-701.

17. Drummond LR, Kunstetter AC, Vaz FF, Campos HO, Andrade AG, Coimbra CC, et al. Brain Temperature in Spontaneously Hypertensive Rats during Physical Exercise in Temperate and Warm Environments. *Plos One*. 2016;11(5):e0155919.
18. Garciarena CD, Pinilla OA, Nolly MB, Laguens RP, Escudero EM, Cingolani HE, et al. Endurance Training in the Spontaneously Hypertensive Rat Conversion of Pathological into Physiological Cardiac Hypertrophy. *Hypertension*. 2009 Apr;53(4):708-U229.
19. Rodrigues LO, Oliveira A, Lima NR, Machado-Moreira CA. Heat storage rate and acute fatigue in rats. *Braz J Med Biol Res*. 2003 Jan;36(1):131-5.
20. Wanner SP, Guimaraes JB, Rodrigues LOC, Marubayashi U, Coimbra CC, Lima NRV. Muscarinic cholinceptors in the ventromedial hypothalamic nucleus facilitate tail heat loss during physical exercise. *Brain Res Bull*. 2007 Jun 15;73(1-3):28-33.
21. Primola-Gomes TN, Campos LA, Lauton-Santos S, Balthazar CH, Guatimosim S, Capettini LSA, et al. Exercise capacity is related to calcium transients in ventricular cardiomyocytes. *Journal of Applied Physiology*. 2009 Aug;107(2):593-8.
22. Wanner SP, Primola-Gomes TN, Pires W, Guimarães JB, Hudson ASR, Kunstetter AC, et al. Thermoregulatory responses in exercising rats: methodological aspects and relevance to human physiology. *Temperature- multidisciplinary biomedical journal*. 2016;2(4):457-75.
23. BROOKS GA, P WT. Determination of metabolic and heart rate response of rats to treadmill exercise. *Journal of Applied Physiology*. 1978;45(6):1009-15.
24. Brooks GA, Donovan CM, White TP. Estimation of anaerobic energy production and efficiency in rats during exercise. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*. 1984 Feb;56(2):520-5.
25. Jay O, Garipey LM, Reardon FD, Webb P, Ducharme MB, Ramsay T, et al. A three-compartment thermometry model for the improved estimation of changes in body heat content. *Am J Physiol-Reg I*. 2007 Jan;292(1):R167-R75.
26. Johnstone AM, Murison SD, Duncan JS, Rance KA, Speakman JR. Factors influencing variation in basal metabolic rate include fat-free mass, fat mass, age, and circulating thyroxine but not sex, circulating leptin, or triiodothyronine. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2005 Nov;82(5):941-8.
27. Kaiyala KJ, Morton GJ, Leroux BG, Ogimoto K, Wisse B, Schwartz MW. Identification of Body Fat Mass as a Major Determinant of Metabolic Rate in Mice. *Diabetes*. 2010 Jul;59(7):1657-66.
28. Gordon CJ. Thermal Biology of the Laboratory Rat. *Physiology & Behavior*. 1990 May;47(5):963-91.
29. Aiello EA, Villa-Abrille MC, Escudero EM, Portiansky EL, Perez NG, de Hurtado MC, et al. Myocardial hypertrophy of normotensive Wistar-Kyoto rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004 Apr;286(4):H1229-35.
30. Hendley ED, Cierpial MA, Mccarty R. Sympathetic-Adrenal Medullary Response to Stress in Hyperactive and Hypertensive Rats. *Physiology & Behavior*. 1988;44(1):47-51.
31. Tanaka H, Yanase M, Nakayama T. Body-Temperature Regulation in Rats during Exercise of Various Intensities at Different Ambient-Temperatures. *Japanese Journal of Physiology*. 1988;38(2):167-77.

32. Grant RT. Vasodilation and body warming in the rat. *J Physiol*. 1963 Jul;167:311-7.
33. Rodrigues LO, Oliveira A, Lima NR, Machado-Moreira CA. Heat storage rate and acute fatigue in rats. *Braz J Med Biol Res*. 2003 Jan;36(1):131-5.
34. Febbraio MA, Snow RJ, Stathis CG, Hargreaves M, Carey MF. Effect of heat stress on muscle energy metabolism during exercise. *J Appl Physiol* (1985). 1994 Dec;77(6):2827-31.
35. Koppe C, Kovats S, Jendritzky G, Menne B. Heat Waves: Risks and Responses. Organization WH, editor2004.
36. Lehmann JF, Warren CG, Scham SM. Therapeutic heat and cold. *Clin Orthop Relat Res*. 1974 Mar-Apr(99):207-45.