

Frederico Sander Mansur Machado

**Interações do sistema circadiano com a atividade física e a
temperatura ambiente**

Belo Horizonte

Junho de 2017

Frederico Sander Mansur Machado

**Interações do sistema circadiano com a atividade física e a
temperatura ambiente**

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

Orientador: Dr. Cândido Celso Coimbra

Co-orientadora: Dra. Maristela Oliveira Poletini

Belo Horizonte

Junho de 2017

043 Machado, Frederico Sander Mansur.
Interações do sistema circadiano com a atividade física e a temperatura ambiente [manuscrito] / Frederico Sander Mansur Machado. - 2017.

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

Orientador: Dr. Cândido Celso Coimbra. Co-orientadora: Dra. Maristela Oliveira Poletini.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

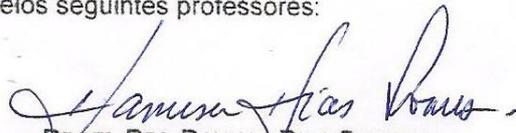
1. Fisiologia. 2. Ritmos circadianos - Teses. 3. Exercícios físicos. 4. Temperatura - Teses. I. Coimbra, Cândido Celso. II. Poletini, Maristela Oliveira. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 612

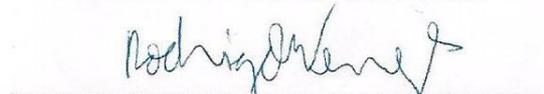
**"INTERAÇÕES DO SISTEMA CIRCADIANO COM A ATIVIDADE
FÍSICA E A TEMPERATURA AMBIENTE"**

FREDERICO SANDER MANSUR MACHADO

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia 13 de junho de 2017, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:


PROF. DR. DANUSA DIAS SOARES
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS


PROFA. DR. FERNANDA GASPAR DO AMARAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO


PROF. DR. RODRIGO CUNHA ALVIM DE MENEZES
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO


PROF. DR. SAMUEL PENNA WANNER
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS


PROFA. DR. MARISTELA DE OLIVEIRA POLETINI
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
CO-ORIENTADORA


PROF. DR. CANDIDO CELSO COIMBRA
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ORIENTADOR

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

Belo Horizonte, 13 de junho de 2017

Trabalho realizado nos laboratórios de Endocrinologia e Metabolismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais e de Hypothalamic Integration Mechanisms do Nederlands Herseninstituut (NIN) do Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen (KNAW).

Apoio Financeiro: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (PRPq/UFMG).

“Existe uma teoria que diz que, se um dia alguém descobrir exatamente para que serve o Universo e por que ele está aqui, ele desaparecerá instantaneamente e será substituído por algo ainda mais estranho e inexplicável.

Existe uma segunda teoria que diz que isso já aconteceu”.

Douglas Adams – O Restaurante no Fim do Universo

Ao Vô Elias e à Dinda, meus avós cientistas.

Aos meus pais.

À Flávia.

Agradecimentos

Ao Prof. Cândido Celso Coimbra, pela orientação e, sobretudo, pela confiança e autonomia durante toda a minha formação acadêmica e científica

À Prof^a Maristela Oliveira Poletini, pela presença e orientação nas oscilações sazonais e circanuais que envolveram esse trabalho de doutorado

Ao Prof. Raphael Escorsim Szawka pelo auxílio nas dosagens de HPLC e pela presença constante no laboratório

À Prof. Adelina Martha dos Reis pelo acolhimento no laboratório e zelo pela qualidade da pós-graduação que demonstrou durante todos esses anos de convívio

Às minhas colegas de experimentos, Nayara Horta, Thais Cardoso e Quezia Rodrigues. Mesmo com o modelo de restrição ao sono e estresse crônico me acompanhando, vocês persistiram “bravamente”.

Aos “antigos” colegas de laboratório: Daniela Rocha, Fernanda Machado, Juliana Guimarães, Paulo Lima, Daniel Lima, Luciana Firmes, Laura Leite e Samuel Wanner

Aos “atuais” colegas de laboratório no Brasil: Lucas Drummond, Helton Campos, Gleisy Kelly, Paola Fernandes, Flávia Araújo, Roberta Lopes, Nayara Aquino, Henrique Santiago, Laísa Hipólito, Daniela Gusmão e Patrícia Henriques

À Dr^a. Simone Pio, pela organização, calma e simplicidade que trouxe ao laboratório de Endocrinologia.

Ao Prof. Andries Kalsbeek, pelo acolhimento, orientação e simpatia antes, durante e após minha passagem pelo Laboratório de Integração Hipotalâmica do Metabolismo durante o doutorado sanduíche

Ao técnico Ewout Foppen, pela amizade e ajuda durante os experimentos e na adaptação aos holandeses

Aos colegas do laboratório de Mecanismos de Integração Hipotalâmica do Metabolismo, Anneloes Opperhuizen, Yan Su, Zhi Zhang, Daniela Moro-Chao, Aurea Velazquez, Satish Sen, Dawei Wang, Paul De Goede, Remi Jansen

Aos professores e colegas da Pós-Graduação

Ao Sílvio, do biotério da Fisiologia

Ao Rodner e à Cinthya da Secretaria

Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPEMIG

Ao povo brasileiro, que financiou toda a minha formação acadêmica e científica.

Aos animais.

Resumo

Background: O relógio biológico interno pode ser sincronizado por diferentes agentes ou *zeitgebers*. A atividade física regular e os ciclos de temperatura constituiriam estímulos secundários para a sincronização do sistema circadiano de controle temporal aos ciclos diários de claro/escuro. Portanto, o presente trabalho investigou tanto o efeito do exercício físico no sistema circadiano, quanto a influência do horário do dia nos ajustes fisiológicos induzidos pela exposição ao frio em ratos Wistar.

Materiais e métodos: No primeiro experimento, investigou-se o efeito de uma única sessão de exercício físico (40%, 70% e teste de exercício progressivo até a fadiga) em diferentes componentes do sistema circadiano, tais como: a expressão de genes de relógio em músculo esquelético e adrenais (rtPCR); a secreção de corticosterona (ELISA); as oscilações de temperatura interna e atividade locomotora espontânea (telemetria). No segundo experimento, avaliou-se o efeito do treinamento físico em diversos níveis do sistema circadiano de controle temporal em condições de repouso, tais como: a expressão de genes do relógio no músculo esquelético (rtPCR); a secreção de corticosterona (ELISA), as oscilações de temperatura interna e atividade locomotora espontânea (telemetria); a atividade serotoninérgica e dopaminérgica no sistema nervoso central (HPLC). Após 8 semanas de treinamento, os animais foram eutanasiados em diferentes horários do dia para colheita de cérebro, músculo esquelético e sangue. No terceiro experimento, estudou-se o efeito do horário do dia nos ajustes fisiológicos e no relógio periférico (rtPCR) em resposta à exposição aguda ao frio. Os animais foram submetidos a condições de temperatura ambiente constante (23 °C) ou ambiente frio (4 °C) em seis horários diferentes do dia por 3 horas. Imediatamente após os animais foram eutanasiados para colheita de tecido adiposo marrom e músculo esquelético.

Resultados: O exercício físico durante a fase clara do ciclo claro/escuro, alterou transitoriamente o balanço térmico circadiano ao elevar a temperatura interna de maneira independente dos aumentos sustentados de atividade locomotora. Esse desequilíbrio no balanço entre temperatura interna e atividade locomotora espontânea foi acompanhado por uma elevação nos níveis de corticosterona dependente da carga de trabalho. A exposição dos animais à esteira sem a realização de exercício induziu uma elevação na transcrição de PER1 no músculo gastrocnêmio que foi atenuada de forma inversamente proporcional pela carga de trabalho realizada durante o exercício.

O exercício físico realizado regularmente durante a fase clara por 8 semanas promoveu ajustes no balanço térmico diário aumentando a atividade locomotora espontânea durante a fase escura, sobretudo nas últimas horas dessa fase do dia. Centralmente, tais ajustes foram acompanhados por alterações na atividade serotoninérgica e dopaminérgica na área pré-óptica e serotoninérgica no núcleo paraventricular do hipotálamo. Periféricamente, o treinamento induziu um aumento na transcrição de PER1 no músculo gastrocnêmio durante a transição da fase escura para a clara, indicando uma adaptação em pelo menos um dos componentes moleculares do relógio biológico periférico.

Durante a exposição ao frio durante a fase de repouso observou-se uma atenuação da mudança de substrato energético preponderante. Tal alteração foi acompanhada de uma leve hipertermia associada ao aumento da taxa metabólica. Adicionalmente, o horário do dia influenciou a intensidade da resposta ao frio de diversos componentes moleculares do relógio periférico, tais como CLOCK, PER1, CRY1, CRY2 e REV-ERB α de maneira tecido-específica no músculo sóleo e no tecido adiposo marrom, sugerindo a participação do sistema circadiano periférico na modulação da resposta ao frio.

Conclusão: O presente trabalho demonstrou que o exercício físico pode influenciar o sistema circadiano de controle temporal modulando periféricamente a atividade de genes do relógio e promovendo ajustes na variação diária de atividade monoaminérgica basal em áreas diretamente envolvidas no controle da temperatura interna e no balanço térmico. Além disso, ficou caracterizada não apenas a importância do horário do dia como fator determinante da intensidade dos ajustes metabólicos ao ambiente frio, mas também a provável participação do relógio periférico na modulação dessas respostas.

Abstract

The internal biological clock can be synchronized by different entraining agents or *zeitgebers*. Regular physical activity and temperature cycles would be secondary stimuli for the synchronization of the circadian system to daily light/dark cycles. Therefore, the present study investigated both the effect of physical exercise on the circadian system and the influence of daylight hours on the physiological adjustments induced by cold exposure in Wistar rats.

In the first experiment, the effect of a single physical exercise session (groups: rest, submaximal exercise at 40 and 70% of the average maximum velocity verified for the evaluated population, exercise test until fatigue) was investigated in different components of the circadian system: the expression of clock genes in skeletal muscle and adrenal (rtPCR); corticosterone secretion (ELISA); the oscillations of body temperature and locomotor activity (telemetry). In the second experiment the effect of physical training on several levels of the circadian system under resting conditions was evaluated: the cycle of the expression of the clock genes in skeletal muscle (rtPCR); the corticosterone cycle (ELISA), the oscillations of body temperature and locomotor activity (telemetry); cycles of serotonergic and dopaminergic activity in the central nervous system (HPLC). After 8 weeks of training, the animals were euthanized at different times of the day to harvest brain, gastrocnemius muscle and blood. In the third experiment the effect of day-time on the physiological adjustments (telemetry and indirect calorimetry) and the peripheral clock (rtPCR) in response to acute cold exposure were studied. The animals were submitted to conditions of constant ambient temperature (23 ° C) or cold environment (4 ° C) at six times of the day for 3 hours. Immediately after the animals were euthanized to harvest brown adipose tissue and soleus muscle.

When performed during the resting phase of the light / dark cycle, physical exercise temporarily altered the circadian thermal balance by elevating body temperature independently of sustained increases in locomotor activity. This transitory imbalance in the balance between body temperature and locomotor activity was accompanied by an elevated-dependent workload on corticosterone levels immediately after exercise. Surprisingly, exposure of the animals to the treadmill without exercise induced an elevation in the transcription of PER1 in gastrocnemius, attenuated in a inverse proportion to the workload performed during the exercise.

In turn, when performed with a regular schedule and for 8 weeks, physical exercise promoted adjustments in the daily heat balance by increasing the levels of locomotor activity during the active phase, especially in the last hours of this phase of the day. Centrally, such changes were accompanied by changes in serotonergic and dopaminergic activity in the preoptic area and serotonergic activity in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. Peripherally, despite the similarity in the circulating corticosterone cycle, the training induced an increase in the transcription of PER1 in the gastrocnemius, especially during the transition from the dark phase to the light phase, indicating an adaptation of the peripheral clock.

Finally, an attenuation of substrate shift evoked by cold exposure during the resting phase was observed. Such alteration was accompanied by mild hyperthermia associated with increased metabolic rate. In addition, the time of day influenced the intensity of the expression of several molecular components of the peripheral clock, such as CLOCK, PER1, CRY1, CRY2 and REV-ERB α in different ways for the soleus muscle and the brown adipose tissue, suggesting the participation of the peripheral circadian system in modulating the response to cold.

Thus, the present study demonstrated that physical exercise can influence the circadian system by peripherally modulating clock or clock gene activity and also by promoting adjustments in basal monoaminergic activity cycles in areas directly involved in the control of body temperature and thermal balance. In addition, it was characterized not only the importance of the time of day for the intensity of the metabolic adjustments to the cold environment, but also the likely participation of the peripheral clock in the modulation of these responses.

Lista de abreviaturas e siglas

| | |
|--|---|
| 18S: <i>18S ribosomal RNA</i> | GR: Receptor de glicocorticoide |
| 5-HIAA: Ácido 5-hidroxi-indolacético | HPRT: <i>Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase</i> |
| 5-HT: serotonina ou 5-Hidroxitriptamina | HSL: <i>Hormone-sensitive lipase</i> |
| ACC: <i>Acetyl-CoA carboxylase</i> | HSP90: <i>Heat shock protein 90</i> |
| ADRBβ: receptor β adrenérgico | LH: Núcleo lateral do hipotálamo |
| AMPK: <i>5' adenosine monophosphate (AMP)-activated protein kinase</i> | LPL: <i>Lipoprotein lipase</i> |
| ARQ: Núcleo arqueado | MnPO: Área pré-óptica mediana |
| CamK2: <i>Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase</i> | MPOA: Área pré-óptica medial |
| CIRBP: <i>Cold-inducible RNA-binding protein</i> | mTOR: <i>Mammalian mechanistic target of rapamycin</i> |
| CLOCK: <i>Circadian Locomotor Output Cycles Kaput gene</i> | NA: noradrenalina |
| CPT: <i>Carnitine palmitoyl transferase</i> | NAMPT-1: <i>Nicotinamide phosphoribosyltransferase or visfatin</i> |
| CPU: <i>caudado putamen</i> | PER1: <i>Period 1 gene</i> |
| CREB: <i>cAMP response element binding protein</i> | PER2: <i>Period 2 gene</i> |
| CRY1: <i>Cryptochrome 1 gene</i> | PGC1α: <i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha</i> |
| CRY2: <i>Cryptochrome 2 gene</i> | POA: Área pré-óptica |
| DA: dopamina | PPAR: <i>Peroxisome proliferator-activated receptors</i> |
| DBP: <i>D site of albumin promoter</i> | PVN: Núcleo paraventricular do hipotálamo |
| DHBA: dihidrobenzilamina | REV-ERBα/NR1D1: <i>nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1</i> |
| DMH: Núcleo dorsomedial do hipotálamo | SCN: Núcleo supraquiasmático do hipotálamo |
| DOPAC: Ácido 3,4-diidroxifenilacético | subPVZ: Zona sub-paraventricular do hipotálamo |
| FAS/CD36: <i>Fatty acid tranlocase or cluster of differentiation 36</i> | TAM: tecido adiposo marrom |
| FOXO1: <i>Forkhead box protein 1</i> | UCP: <i>Uncoupling proteins</i> |
| GAPDH: <i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i> | VIP: Peptídeo intestinal vasoativo |
| GLUT4: <i>Glucose transporter type 4</i> | |

SUMÁRIO

| | | |
|------------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 1 |
| 2 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 4 |
| 2.1 | RITMOS BIOLÓGICOS..... | 4 |
| 2.2 | SISTEMA CIRCADIANO DE CONTROLE TEMPORAL..... | 5 |
| 2.3 | ATIVIDADE FÍSICA E RITMOS BIOLÓGICOS | 7 |
| 2.4 | TEMPERATURA AMBIENTE E RITMOS BIOLÓGICOS | 15 |
| 3 | OBJETIVOS | 18 |
| 3.1 | OBJETIVOS GERAIS..... | 18 |
| 3.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 18 |
| 4 | MATERIAIS E MÉTODOS | 19 |
| 4.1 | CUIDADOS ÉTICOS..... | 19 |
| 4.2 | AMOSTRAS | 19 |
| 4.3 | DELINEAMENTOS EXPERIMENTAIS | 19 |
| 4.3.1 | Experimento 1: Efeito do exercício agudo no balanço térmico circadiano e na expressão dos genes do relógio. | 19 |
| 4.3.2 | Experimento 2: Efeito do treinamento físico na variação diária ritmo da expressão dos genes do relógio, hormônios, catecolaminas e do balanço térmico. | 21 |
| 4.3.3 | Experimento 3: Efeito do horário do dia nas respostas térmica, metabólica e na expressão de genes do relógio induzidas pela exposição aguda ao frio..... | 22 |
| 4.4 | PROCEDIMENTOS E TÉCNICAS EXPERIMENTAIS | 23 |
| 4.4.1 | Familiarização à esteira..... | 23 |
| 4.4.2 | Testes de capacidade física máxima e exercício submáximo..... | 23 |
| 4.4.3 | Programa de treinamento físico em esteira..... | 24 |
| 4.4.4 | Registro de temperatura interna e atividade locomotora espontânea..... | 24 |
| 4.4.5 | Registros de calorimetria indireta | 25 |
| 4.4.6 | Análises de sensibilidade dos sistemas..... | 26 |
| 4.4.7 | Dosagens de corticosterona..... | 26 |
| 4.4.8 | Dosagens de catecolaminas centrais por cromatografia líquida de alta performance (HPLC)..... | 26 |
| 4.4.9 | Determinação da expressão de genes por PCR em tempo real | 27 |
| 4.5 | PROCEDIMENTOS ESTATÍSTICOS | 32 |
| 5 | RESULTADOS | 33 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 5.1 | Efeito do exercício agudo no balanço térmico circadiano e na expressão dos genes do relógio | 33 |
| 5.1.1 | Caracterização dos componentes da carga nos tipos de exercício empregados | 33 |
| 5.1.2 | Efeito do exercício agudo nos níveis plasmáticos de corticosterona..... | 36 |
| 5.1.3 | Efeito do exercício agudo na expressão dos genes do relógio | 38 |
| 5.1.4 | Efeito do exercício agudo no balanço térmico circadiano..... | 39 |
| 5.2 | Efeito do treinamento físico na variação diária da expressão dos genes do relógio, corticosterona, catecolaminas e do balanço térmico | 43 |
| 5.2.1 | Caracterização dos componentes da carga de treinamento | 43 |
| 5.2.2 | Efeito do treinamento físico no desempenho e no balanço térmico durante o exercício | 45 |
| 5.2.3 | Efeito do treinamento físico no balanço térmico circadiano..... | 47 |
| 5.2.4 | Efeito do treinamento físico na variação diária dos níveis plasmáticos de corticosterona..... | 54 |
| 5.2.5 | Efeito do treinamento físico na variação diária da expressão dos genes do relógio no músculo esquelético..... | 55 |
| 5.2.6 | Efeito do treinamento físico na variação diária de atividade monoaminérgica no sistema nervoso central | 56 |
| 5.3 | Efeito da exposição aguda ao frio nas respostas térmica e metabólica e na expressão de genes do relógio em diferentes horários | 61 |
| 5.3.1 | Caracterização das oscilações diárias de temperatura interna, atividade locomotora espontânea e metabolismo energético..... | 61 |
| 5.3.2 | Efeito da exposição aguda ao frio em diferentes horários no balanço energético..... | 63 |
| 5.3.3 | Efeito da exposição aguda ao frio em diferentes horários do dia na expressão de genes do relógio..... | 71 |
| 5.3.4 | Efeito da exposição aguda ao frio em diferentes horários do dia na expressão de genes envolvidos no controle do metabolismo no músculo esquelético e no tecido adiposo marrom..... | 74 |
| 6 | DISCUSSÃO | 77 |
| 6.1 | Efeito do exercício agudo no balanço térmico circadiano e na expressão dos genes do relógio | 77 |
| 6.1.1 | A concentração de corticosterona é dependente da carga de trabalho em resposta ao exercício | 77 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 6.1.2 | O efeito do exercício físico em PER1 é inversamente dependente da carga de trabalho realizado..... | 78 |
| 6.1.3 | As alterações da relação entre atividade locomotora espontânea e temperatura interna após o exercício resultam do processo de recuperação | 80 |
| 6.2 | Efeito do treinamento físico na variação diária da expressão dos genes do relógio, corticosterona, catecolaminas e do balanço térmico | 82 |
| 6.2.1 | O treinamento físico promove alterações no balanço térmico diário | 83 |
| 6.2.2 | O treinamento físico promove alterações na expressão de genes do relógio no músculo esquelético..... | 85 |
| 6.2.2 | Efeito do treinamento físico na atividade monoaminérgica basal no caudado putamen, área pré-óptica e hipotálamo paraventricular..... | 87 |
| 6.3 | Efeito da exposição aguda ao frio em diferentes horários do dia nos genes do relógio e nas respostas térmica e metabólica..... | 89 |
| 6.3.1 | A exposição aguda ao frio em diferentes horários afeta o balanço térmico e a oxidação de substratos..... | 89 |
| 6.3.2 | A exposição aguda ao frio em diferentes horários afeta a expressão de genes do relógio de forma tecido-específica..... | 92 |
| 7 | CONCLUSÃO..... | 96 |
| 8 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 98 |
| | ANEXOS | 118 |

1 INTRODUÇÃO

A alternância periódica de fenômenos ambientais constitui um elemento essencial para a compreensão do processo evolutivo de seleção natural (Pittendrigh, 1993). Nesse contexto, a sucessão de dias e noites teria consolidado a existência tanto de momentos propícios à atividade quanto daqueles dedicados ao repouso. À periodicidade entre dias e noites, agregou-se a maior, ou menor, temperatura ambiente em decorrência da própria incidência de luz solar sobre a superfície da Terra. Dependendo tanto da órbita do planeta quanto da inclinação do seu eixo em relação ao Sol, a superfície do planeta é aquecida durante o dia e resfriada durante a noite. Tais movimentos astronômicos da Terra em volta do próprio eixo (rotação) e ao redor do Sol (translação) são as fontes originárias de fenômenos ambientais de natureza cíclica, quais sejam os dias e as noites, bem como as estações do ano.

A sobrevivência dos seres vivos existentes no planeta depende, em parte, da adequação de suas condições de vida a esses fenômenos periódicos inerentes ao planeta (Gerhart-Hines e Lazar, 2015). A perpetuação de uma espécie e seu conseqüente (in)sucesso evolutivo depende da melhor interpretação dos sinais ambientais disponíveis. A presença ou a ausência de luz pode facilitar a identificação de alimentos e parceiros sexualmente receptivos para alguns organismos, enquanto, para outros, pode representar uma exposição excessiva para potenciais predadores, uma menor disponibilidade de alimentos ou até mesmo uma maior dificuldade para a ocorrência da reprodução. Concomitantemente, variações da temperatura no *habitat* também podem ser traduzidas em termos de viabilidade para determinado tipo de atividade, de disponibilidade de alimento e, até mesmo, de presença de predadores ou presas no ambiente (Pittendrigh, 1993).

A modernidade, a globalização e o desenvolvimento acelerado da computação, introduziram a possibilidade de manipular com maior eficiência o ambiente no qual o indivíduo existe e interage com os demais. Em um primeiro momento, a luz artificial elétrica conduziu a uma autêntica “colonização” da noite pelos seres humanos. Interessante notar que esse processo de ocupação ocorreu em prejuízo das características diurnas desenvolvidas pela espécie ao longo do seu relativamente curto processo evolutivo. Se, por um lado, aumentou-se a sensação de segurança decorrente da presença de luz, por outro, a possibilidade de trabalho regular em momentos afeitos ao repouso

representou uma novidade com possíveis repercussões comportamentais, biológicas e de saúde (Gerhart-Hines e Lazar, 2015).

No mesmo sentido, o domínio de tecnologias que auxiliam a manutenção de um maior conforto térmico independentemente da temperatura ambiente poderia resultar em uma menor importância da variação diária desse sinal ambiental para a sobrevivência da espécie (Rensing e Ruoff, 2002). A permanência em uma sala com temperatura controlada durante todo o período de atividade pode tanto bloquear sinais temporais dependentes da temperatura ambiente, quanto potencializar sinais que conduzam ao estado de maior atividade ou sonolência. Por sua vez, a utilização de vestimentas que protegem o indivíduo do frio no inverno pode se confundir com sinais biológicos vinculados à estação do ano e, conseqüentemente, à duração dos dias e noites, alterando hábitos comportamentais de atividade.

Tendo em vista essa capacidade de atuar diretamente nos fenômenos ambientais de natureza cíclica, pode-se inferir que a modernidade introduziu um conflito de sinais biológicos para a sincronização das funções vitais dos seres humanos. Todos esses fatores recentemente incorporados ao estilo de vida da espécie humana vêm sendo associados a uma maior prevalência de doenças cardiovasculares, metabólicas e imunológicas (Escobar *et al.*, 2011; Salgado-Delgado *et al.*, 2011; Forbes-Robertson *et al.*, 2012; Gerhart-Hines e Lazar, 2015). Face a tal associação, um melhor entendimento acerca da interação entre esses agentes sincronizadores exógenos e os processos endógenos de regulação e controle fisiológicos faz-se necessário. Nesse sentido, tem-se buscado o aprofundamento do conhecimento referente aos efeitos agudos ou crônicos das diferentes situações com potencial de promover distúrbios na relação entre processos biológicos internos e condições ambientais externas no processo de dessincronização biológica.

Essa compreensão perpassa pela identificação de tais agentes ambientais, conhecidos como *zeitgebers* (do alemão *zeit*, tempo; e *geben*, dar, doar). De fato, em acordância com uma perspectiva evolutiva, reconhece-se a luz como principal *zeitgeber*. Tanto a alternância diária quanto a sazonalidade (ou a proporção da duração) dos dias e noites são as fontes primárias de informação temporal do ambiente para mamíferos. Entretanto, pode-se argumentar que a capacidade de adaptação de uma espécie a fenômenos cíclicos não deveria se restringir a um único estímulo ambiental. Consonante com essa perspectiva, outros *zeitgebers* foram identificados nas últimas décadas (Buijs e Kalsbeek, 2001). Tais agentes são denominados secundários, posto que dificilmente podem sobrepor seus sinais temporais àquele proveniente da luz ambiente. Dentre esses agentes

sincronizadores de segundo nível, reconhece-se a disponibilidade e a qualidade do alimento como um potente *zeitgeber*, sobretudo quando o foco de análise recai sobre o metabolismo energético e seu controle pelo fígado, pâncreas e tecido muscular esquelético (Gerhart-Hines e Lazar, 2015). Em um outro patamar, pode-se agrupar ainda as oscilações da temperatura ambiente e o realização de atividade física como sinalizadores temporais para o organismo (Gerhart-Hines e Lazar, 2015; Mayeuf-Louchart *et al.*, 2015; Tahara *et al.*, 2017). Apesar de constituírem fatores de menor potencial de sinalização temporal, constituem fonte de informação temporal essencial acerca das demandas térmicas e energéticas do sistema nos diferentes momentos do dia e, conseqüentemente, afetam a manutenção da homeostase do sistema. Adicionalmente, tais agentes representariam sinais capazes de se sobrepor às oscilações regulares do sistema, desencadeando respostas biológicas agudas e, algumas vezes, extremas, que, apesar de perturbar transitoriamente o sistema de sinalização temporal, elevariam a chance de sobrevivência. Tanto a exposição a temperaturas extremas quanto a prática de exercício físico com maiores cargas de trabalho servem de exemplo de sobreposição de uma resposta de defesa do equilíbrio interno à oscilação fisiológica basal.

Apesar dessa relação direta entre o sistema de controle temporal e o sistema de controle da homeostase estabelecida por meio da influência de *zeitgebers*, relativamente pouca informação acerca do tema era encontrada na literatura científica. Entretanto, esse cenário começou a ser alterado nos últimos 20 anos (Buijs e Kalsbeek, 2001). Dois fatores principais contribuíram para tal mudança: a identificação dos componentes moleculares desse sistema de sinalização temporal que tem permitido o mapeamento funcional em múltiplos níveis biológicos de um complexo relógio interno; e a associação entre estilos de vida que ignoram a existência de um relógio endógeno com o desenvolvimento de doenças não transmissíveis (Buijs e Kalsbeek, 2001). Dessa forma, a melhor compreensão da relação entre ajustes homeostáticos e sinais temporais serviria de auxílio para a elaboração de estratégias de prevenção ou tratamento de tais condições potencialmente nocivas ao bem-estar e que também permitam maximizar a qualidade de vida da população em geral.

Dessa maneira, o presente trabalho foi organizado com o objetivo de caracterizar os efeitos da manipulação de dois *zeitgebers* secundários do sistema circadiano de controle temporal, exercício físico e temperatura ambiente, tanto nas oscilações circadianas do relógio biológico, quanto nos ajustes homeostáticos envolvendo os sistemas de controle da temperatura e do metabolismo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 RITMOS BIOLÓGICOS

A maior parte das variáveis que compõem os diversos sistemas fisiológicos de controle possui oscilações diárias marcadas por picos e vales usualmente associados ao nível de atividade do sistema biológico (Foster e Wulff, 2005). Essa periodicidade fisiológica constitui um alicerce da viabilidade biológica, estando presente nos sistemas de controle e regulação de funções básicas dos organismos, tais como termorregulação, regulação do metabolismo, cardiovascular, dos ciclos de atividade e repouso, ou vigília e sono, dentre outros (Foster e Wulff, 2005). Tais variações cíclicas são manifestações de ritmos biológicos que, por sua vez, caracterizam-se por mudanças recorrentes nos níveis de atividade de determinado parâmetro biológico em intervalos regulares de tempo (Foster e Wulff, 2005).

A periodicidade de um ritmo biológico possui tanto componentes endógenos quanto exógenos que se entrelaçam no processo de sincronização de um organismo com suas funções internas e com características de natureza cíclica do ambiente no qual está inserido. Dessa forma, a alternância entre dias e noites, um dos estímulos físicos mais primitivos e anterior à própria existência da vida na Terra, constituiria fator central no desenvolvimento de um relógio biológico adaptado aos ciclos de claro/escuro, bem como às demandas ambientais associadas, tais como a disponibilidade de alimentos, a temperatura ambiental e a própria presença de indivíduos da mesma espécie ou de predadores (Aschoff, 1960; Pittendrigh, 1993; Albrecht, 2012).

Nesse sentido, o movimento de rotação da Terra ao redor do próprio eixo constitui a base de sustentação para os ritmos biológicos, dentre os quais destacam-se os ritmos circadianos, cuja periodicidade é de aproximadamente 24 horas, ou um dia (do latim *circa*, cerca de; e *diem*, dia). Analogamente, seria natural concluir que a alternância entre luz e escuridão, constitui-se como um dos principais agentes exógenos que sincronizam (ou arrastam) o relógio biológico, um *zeitgeber* por definição. De fato, outro componente evolutivo essencial para a sobrevivência de um organismo vivo seria sua capacidade de se adaptar às alterações anuais na disponibilidade de luz ambiente, decorrente de outro movimento astronômico da Terra, a sua translação em torno do sol, gerando as estações do ano.

Dessa forma, percebe-se que o desenvolvimento de um relógio biológico adaptado às oscilações diárias de claro e escuro, bem como às mudanças nas durações dessas fases

constituiria fator primário para a sobrevivência e perpetuação das espécies. Um organismo com um ritmo sincronizado aos ciclos de luminosidade estaria bem adaptado às mudanças cíclicas no ambiente, prevendo-as e antecipando ações/estratégias potencialmente vantajosas, tais como a disponibilidade de alimentos, a presença de parceiros para interagir e procriar, a atuação de predadores, ou até mesmo o calor/frio ambiental.

Evidentemente, outros fatores ambientais poderiam fornecer informações temporais relevantes. Tais fatores são considerados secundários à luminosidade ambiente (Aschoff, 1960). Essa caracterização decorre tanto de sua menor influência relativa na presença de um ciclo regular de claro/escuro, quanto pelo fato de se encontrarem direta, ou indiretamente, relacionados aos ciclos de dias e noites. Dentre os *zeitgebers* secundários pode-se destacar a ingestão de alimentos, a temperatura ambiente e a realização de atividade física (Gerhart-Hines e Lazar, 2015). A ingestão de alimentos, tendo em vista a periodicidade da disponibilidade de alimentos na natureza, ocorre com certa regularidade de horários (Schibler *et al.*, 2003). A variação da temperatura ambiente (Brown *et al.*, 2002; Chappuis *et al.*, 2013; Gerhart-Hines *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2013) e a oscilação endógena da temperatura interna (Buhr *et al.*, 2010; Saini *et al.*, 2012) constituem sinais temporais para a sincronização do relógio biológico. Por sua vez, a atividade física, quando realizada com regularidade, também pode sincronizar o relógio biológico (Salgado-Delgado, Nadia, *et al.*, 2010; Wolff e Esser, 2012; Pastore e Hood, 2013).

2.2 SISTEMA CIRCADIANO DE CONTROLE TEMPORAL

A organização estrutural do relógio biológico tem sido descrita em termos de um modelo definido em múltiplos níveis de controle e regulação hierarquicamente organizados (Aschoff e Wever, 1976; Pittendrigh, 1993; Dibner *et al.*, 2010). Existem evidências de atuação direta e indireta do sistema circadiano de controle temporal no relógio biológico intrínseco envolvido na regulação da atividade cardiovascular, da temperatura interna, do metabolismo, do sistema endócrino, do ciclo de sono/vigília, gastrointestinal (Buijs *et al.*, 1993; Kalsbeek *et al.*, 2003; Cailotto *et al.*, 2005; Scheer *et al.*, 2005; Scheer *et al.*, 2010).

Segundo o modelo comumente utilizado para descrever o sistema circadiano, o controle integrado da atividade ocorre de forma verticalizada (*up-bottom* e *bottom-up*) (Aschoff e Wever, 1976). A coordenação entre os diferentes níveis de controle seria centralmente realizada pelo núcleo supraquiasmático do hipotálamo (SCN), cuja integridade é essencial para a manutenção de ritmos biológicos (Moore e Eichler, 1972; Stephan e Zucker, 1972;

Stephan e Nunez, 1977; Stephan *et al.*, 1979; Lehman *et al.*, 1987; Scheer *et al.*, 2005). O SCN, ao integrar informações temporais provenientes do trato retino-hipotalâmico com informações provenientes de outros centros de controle de ciclos de atividade/repouso, sincroniza as fases de diferentes sistemas fisiológicos, constituindo um autêntico regente para o organismo (Kalsbeek *et al.*, 2006).

Neurônios do SCN exibem propriedades peculiares que o qualificam como relógio central do sistema circadiano de controle temporal. Esses neurônios tanto podem exibir ritmos autônomos gerados intrinsecamente quanto podem ser sincronizados pela estimulação das vias aferentes que transmitem informações temporalmente relevantes para o SCN (Vogelbaum e Menaker, 1992; Menaker e Vogelbaum, 1993; Satinoff *et al.*, 1993; Vogelbaum *et al.*, 1993). Quando isolados em cultura, esses neurônios apresentam ritmos de atividade por 30 ou mais ciclos ambientais, enquanto células de órgãos periféricos e neurônios de outras regiões cerebrais apresentam ritmos atenuados e menos sustentáveis (Yamazaki *et al.*, 2000).

Adicionalmente, o SCN projeta-se para vários centros de regulação de funções essenciais para a sobrevivência. Acredita-se que, através dessas projeções, o SCN modula direta ou indiretamente a atividade de regiões do sistema nervoso central (SNC), tais como a área pré-óptica (POA), a região sub-paraventricular do núcleo paraventricular (subPVZ) e o núcleo dorsomedial (DMH) do hipotálamo, bem como o núcleo arqueado (ARQ) (Hastings *et al.*, 2003; Kriegsfeld e Silver, 2006; Saper, 2013). Por meio dessas eferências, o SCN comunicaria aos diversos tecidos periféricos a fase do relógio central para o ajuste nos subníveis do sistema, sobretudo nas adrenais, fígado, tecido adiposo, pâncreas, tireoide e músculo esquelético.

Se o SCN consiste no elemento central do sistema, os componentes moleculares do relógio biológico, descobertos nos últimos 30 anos, constituiriam os elementos difusos da estrutura (FIG 1). Esse mecanismo molecular, distribuído por praticamente todas as células, engloba um sistema de retroalimentação fundamentado na transcrição/tradução de proteínas *BMAL1* (*brain and muscle ARNT-like protein 1*) e *CLOCK* (*circadian locomotor output cycles kaput*) na alça positiva, e *PER* (período) e *CRY* (criptocromo) na alça negativa. Essas proteínas atuam como fatores de transcrição para diversos genes (genes controlados pelo relógio) envolvidos no controle funções vitais das células, especialmente no metabolismo energético, ciclo e atividade celular (Hastings *et al.*, 2003).

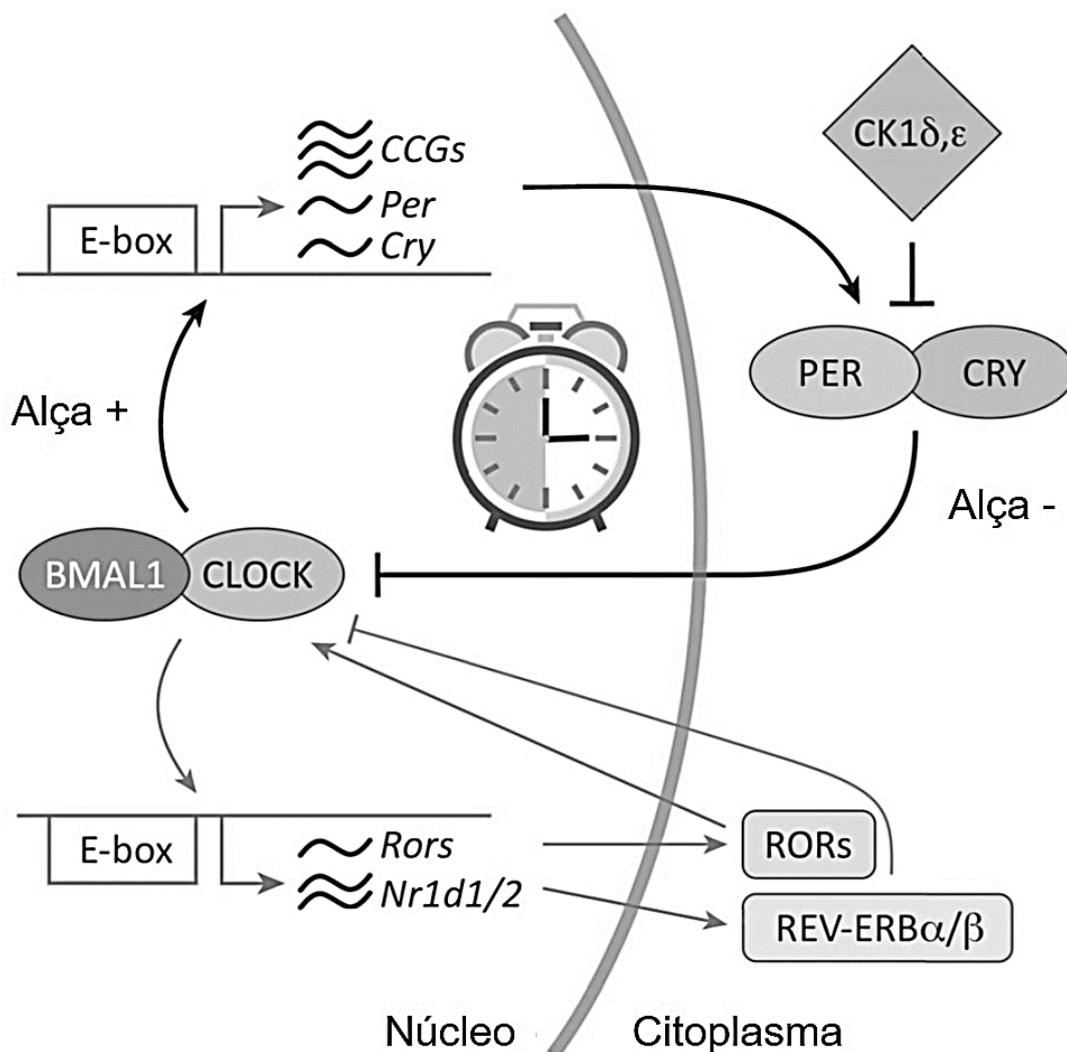


FIGURA 1. Os componentes moleculares do relógio biológico. (Schroeder e Colwell, 2013).

2.3 ATIVIDADE FÍSICA E RITMOS BIOLÓGICOS

Os ritmos de atividade física e temperatura interna constituem dois dos efetores mais estudados do sistema circadiano de controle temporal (Foster e Wulff, 2005). O acoplamento entre a produção de calor decorrente da atividade física ao aumento de temperatura interna é central para o balanço térmico circadiano (Webb, 1995; Refinetti, 2003). Essa relação direta entre os dois parâmetros serve de referência inicial para a qualidade da ritmicidade do sistema biológico (Weinert e Waterhouse, 1998; Machado *et al.*, 2015; Machado *et al.*, 2016). Quaisquer alterações nos componentes oscilatórios dessas variáveis e em sua relação poderiam sinalizar distúrbios no sistema circadiano e, potencialmente, favorecer o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e metabólicas (Kotz *et al.*, 2008).

Em roedores, a atividade física diária pode ser avaliada de diferentes formas. A atividade locomotora espontânea pode ser caracterizada como aqueles movimentos corporais

associados a ações habituais de caráter comportamental ou de atividade autonômica, podendo estar relacionada à alimentação, higiene, interação social, termorregulação (Kotz *et al.*, 2008). Não deveriam ser confundidas, portanto, a atividade locomotora espontânea com a atividade na roda, outra manifestação da atividade física em roedores, marcada por um componente motivacional intrínseco determinante (Kotz *et al.*, 2008; Garland *et al.*, 2011; Rabelo *et al.*, 2015).

Seguindo um padrão rítmico acoplado ao ciclo de sono/vigília adequado a animais com hábitos noturnos, os níveis de atividade locomotora espontânea dos ratos são elevados durante a fase ativa/escuro (dia subjetivo) e reduzidos durante a fase de repouso/clara (noite subjetiva). Essa oscilação diária da atividade locomotora espontânea influencia o próprio ritmo de temperatura interna, caracterizando uma associação direta entre os parâmetros descrita por diversos autores (Gordon, 1994; Weinert e Waterhouse, 1998; Refinetti, 2003; Lima *et al.*, 2014; Machado *et al.*, 2015). Interessante notar que, se atividade locomotora espontânea e atividade de corrida na roda não se confundem, as oscilações de ambas as variáveis possuem fases semelhantes, o que resulta em dificuldade de dissociação entre ambas em diversos trabalhos científicos abrangendo o tema (Kotz *et al.*, 2008; Virtue *et al.*, 2012; Abreu-Vieira *et al.*, 2015).

Nesse sentido, a atividade locomotora espontânea poderia ser uma das formas de controle da temperatura interna sob controle direto do relógio central. Postula-se que o controle comportamental e autonômico da temperatura interna passaria por oscilações de natureza circadiana (Pittendrigh, 1993; Briese, 1998). Inicialmente, demonstrou-se que atividade locomotora espontânea e a temperatura interna correlacionavam-se diretamente ao longo das 24 horas do dia (Büttner e Wollnik, 1982). Adicionalmente, essa relação entre as variáveis oscilaria conforme a espécie e o horário do dia (Refinetti, 2010), de tal forma que a influência da atividade locomotora espontânea sobre a temperatura interna seria maior na fase de repouso em comparação com a fase de atividade (Mrosovsky, 1996; Weinert e Waterhouse, 1998; Machado *et al.*, 2015; Machado *et al.*, 2016).

Em relação aos mecanismos de controle da atividade locomotora, tem sido proposta uma rede complexa para a modulação do nível de atividade associado ao tipo de demanda característica para determinados horários do dia (Hughes e Piggins, 2012). O elemento central desse sistema seria a atividade do SCN. O SCN integraria os sinais referentes ao ciclo claro/escuro com sinais decorrentes do ciclo de sono/vigília provenientes do hipotálamo lateral (LH), resultando em uma informação temporal transmitida para as diversas eferências do sistema relacionadas direta ou indiretamente com a atividade

locomotora. Dessa maneira, segundo esse modelo teórico, o sistema de controle da atividade locomotora espontânea circadiana é de natureza retroalimentar, uma vez que o nível de atividade constitui tanto informação para o sistema quanto traduz-se em sinalização do próprio relógio central (Hughes e Piggins, 2012).

Esse modelo é fundamentado em trabalhos que buscaram determinar não somente a importância do SCN para a regulação do ritmo de atividade locomotora, mas também a importância da via da atividade locomotora espontânea para a modulação do nível de atividade do próprio relógio central. Entretanto, em parte desses estudos, os autores não dissociavam atividade locomotora espontânea e atividade em roda (Mrosovsky e Salmon, 1987; Yamada *et al.*, 1988; Yamada *et al.*, 1990; Edgar e Dement, 1991; Edgar *et al.*, 1991; Yamanaka *et al.*, 2008; Pastore e Hood, 2013; Yamanaka *et al.*, 2013; 2016). Apesar dessa imprecisão conceitual, estudos que provocaram algum tipo de lesão do SCN demonstraram que a integridade do relógio central seria essencial para a ritmicidade da atividade locomotora espontânea e também de outros hábitos comportamentais dos animais na ausência de outros *zeitgebers* (Lehman *et al.*, 1987; Satinoff *et al.*, 1993; Vogelbaum *et al.*, 1993; Mrosovsky, 1996). Demonstrou-se, ainda, uma relação direta entre o nível de atividade neuronal no SCN e o nível de atividade locomotora espontânea (Maywood *et al.*, 1999; Schaap e Meijer, 2001; Yannielli *et al.*, 2002; Houben *et al.*, 2009). Schaap & Meijer (2001), bem como Huben e colaboradores (2009), por exemplo, demonstraram que potenciais de ação no SCN podem ser precedidos por episódios (*bursts*) de atividade locomotora. Complementarmente, a indução de episódios de atividade locomotora espontânea pode alterar a expressão de PER1 no próprio SCN, indicando um efeito direto da atividade locomotora espontânea no relógio central (Maywood *et al.*, 1999; Schaap e Meijer, 2001; Yannielli *et al.*, 2002; Houben *et al.*, 2009).

Essas observações são reforçadas por diversos relatos envolvendo modelos animais de distúrbios nos ritmos circadianos nos quais a simples introdução de um elemento que viabilize um aumento na atividade locomotora, na maioria das vezes uma roda de atividade, resulta em resgate de diversos componentes da ritmicidade biológica ou até mesmo em facilitação do processo de resincronização a novos ciclos de claro/escuro, característicos do trabalho em turno invertido/noturno (*shiftwork*) e do *jet lag* em resposta a mudanças abruptas no fuso horário (Mrosovsky e Salmon, 1987; Yamada *et al.*, 1988; Yamada *et al.*, 1990; Edgar e Dement, 1991; Edgar *et al.*, 1991; Dallmann e Mrosovsky, 2006; Salgado-Delgado *et al.*, 2008; Yamanaka *et al.*, 2008; Salgado-Delgado, Nadia, *et*

al., 2010; Pastore e Hood, 2013; Yamanaka *et al.*, 2013; Hsieh *et al.*, 2014; Yamanaka *et al.*, 2016). Têm sido demonstrado que a introdução da roda de atividade por 8 semanas proporciona o resgate não apenas dos níveis de atividade locomotora, como também de atividade mitocondrial em animais com uma mutação no gene que codifica a proteína CLOCK (Pastore e Hood, 2013). Em um modelo de trabalho noturno de 8 horas de atividade forçada em uma roda durante a fase de repouso, observou-se um desacoplamento entre a atividade do SCN e atividade locomotora, temperatura interna, alimentação, metabolismo e atividade do sistema nervoso central (Salgado-Delgado *et al.*, 2008; Salgado-Delgado, Nadia, *et al.*, 2010; Hsieh *et al.*, 2014). Analogamente, propõe-se que a exposição regular de animais à roda de atividade durante a fase de repouso poderia ser um modelo de estudo para “conflitos de *zeitgebers*” (Dallmann e Mrosovsky, 2006). No mesmo sentido, a sincronização a diferentes ciclos de claro/escuro pode ser favorecida com a introdução da roda de atividade na fase adequada (Mrosovsky e Salmon, 1987; Yamada *et al.*, 1988; Yamada *et al.*, 1990; Edgar e Dement, 1991; Edgar *et al.*, 1991; Yamanaka *et al.*, 2008; 2013; 2016). De fato, Edgar & Dement (1991) demonstraram que o relógio circadiano poderia ser sincronizado pela atividade regular em horários específicos.

A maior parte dos trabalhos investigando a função de *zeitgeber* da atividade física foi realizada em gaiolas individuais nas quais eram introduzidas rodas de atividade que permitiam a avaliação do ritmo de atividade (Mrosovsky e Salmon, 1987; Yamada *et al.*, 1988; Yamada *et al.*, 1990; Edgar e Dement, 1991; Edgar *et al.*, 1991; Yamanaka *et al.*, 2008; 2013; 2016). Com o desenvolvimento de técnicas e equipamentos que permitem o registro contínuo tanto da atividade na roda quanto da atividade fora da roda simultaneamente (De Visser *et al.*, 2005), associado com outros componentes fisiológicos e, posteriormente, moleculares, tornou-se possível caracterizar a ação sincronizadora da atividade física em diferentes níveis do sistema circadiano. Nesse sentido, o acesso à roda de atividade promoveu ajustes de fase em animais selvagens (*wild type*, WT) e em animais com deficiência na produção de VIP (polipeptídeo intestinal vasoativo) que expressavam a luciferase acoplada à região promotora do gene PER2. Tais ajustes foram observados na atividade locomotora, na frequência cardíaca, na temperatura interna e na bioluminescência de PER2::LUC no fígado e nas adrenais (Schroeder *et al.*, 2012). Por sua vez, Yamanaka e colaboradores (2008 e 2016) observaram que 3 horas de atividade na roda podem facilitar o realinhamento da atividade de PER2 na musculatura esquelética e nos pulmões de camundongos submetidos a protocolos de avanço/atraso de fase.

Em conjunto, parece evidente que a literatura científica sobre o tema fortalece o papel da atividade física como *zeitgeber* para o sistema circadiano (Harrington, 2012; Schroder e Esser, 2013; Pendergast *et al.*, 2014; Yasumoto *et al.*, 2015; Sasaki *et al.*, 2016; Aoyama e Shibata, 2017; Takahashi *et al.*, 2017). Entretanto, as implicações da quantidade de atividade física, bem como de seus efeitos agudos e cumulativos no relógio interno ainda são pouco conhecidas. Sugere-se que tanto a intensidade quanto o horário do estímulo podem modular a atividade dos diferentes *outputs* do sistema. Em contrapartida, a confirmação da hipótese é prejudicada pela falta de delimitação entre as diferentes modalidades de atividade física. De fato, boa parte das pesquisas sobre o tema não diferencia atividade locomotora espontânea e atividade na roda para efeito de caracterização de ritmos circadianos (Mrosovsky e Salmon, 1987; Yamada *et al.*, 1988; Yamada *et al.*, 1990; Edgar e Dement, 1991; Edgar *et al.*, 1991; Yamanaka *et al.*, 2008; 2013; 2016). Além disso, também desconsidera eventuais diferenças entre a atividade de corrida na roda em relação ao exercício físico em esteira rolante (Wolff e Esser, 2012; Sasaki *et al.*, 2016). Essa caracterização não deveria ser restrita ao plano conceitual e limitada ao ambiente dos profissionais da atividade física, uma vez que dela dependeria a estruturação dos diferentes níveis de influência da atividade física no sistema circadiano.

De fato, muitas das adaptações descritas para animais apresentados à roda de atividade se assemelham às aquelas usualmente descritas após diferentes períodos de treinamento de corrida em esteira. Leasure & Jones (2008) demonstraram que animais submetidos a exercício de corrida em esteira apresentaram traços de ansiedade e aumento de corticosterona circulante em comparação com animais que percorriam a mesma distância voluntariamente em uma roda de atividade. Além disso, a própria dinâmica dos episódios de atividade física era distinta, sendo que animais correndo na roda de atividade desenvolviam maiores velocidades em intervalos mais curtos e durante um menor tempo de atividade física. Já os animais submetidos à corrida na esteira desenvolviam velocidades mais lentas e cadenciadas, resultando em maior duração de atividade (Leasure e Jones, 2008). Tais diferenças poderiam representar sinais diferentes para o relógio interno, avaliado central ou periféricamente.

Apesar de relativamente pouco testadas, estas diferenças já foram objeto de análise em trabalhos que investigaram o efeito do exercício físico no relógio biológico. Tanto a atividade na roda quanto a corrida em esteira promovem avanços de fase quando realizadas na metade da fase clara ou atrasos de fase, quando realizadas na metade da fase escura (Marchant e Mistlberger, 1996). Todavia, a corrida em esteira aprofundou essas

mudanças de fase em comparação com a corrida na roda de atividade. Após 8 semanas de treinamento, animais submetidos à corrida em esteira ou na roda de atividade durante a fase de repouso apresentaram avanços de fase similares nas fases de PER2 na musculatura esquelética e nos pulmões, mas não no SCN (Wolff e Esser, 2012). Em ambos os casos, os autores não se preocuparam com o controle e/ou registro da intensidade da atividade física, tornando complexa qualquer extrapolação quanto a influência desse parâmetro no efeito observado sobre o relógio biológico, e na caracterização das prováveis vias de sinalização envolvidas no processo.

Em linhas gerais, esse efeito sincronizador do relógio interno pela atividade física poderia ser mediado por diversos fatores diretamente relacionados à resposta aguda ao exercício/atividade física, ou aos efeitos cumulativos da regularidade associados à pontualidade do estímulo. Um dos fatores que poderiam atuar nesse processo de reajuste seria a secreção de glicocorticoides normalmente associada a episódios de elevada demanda metabólica/energética (Mastorakos *et al.*, 2005). Reconhece-se que os glicocorticoides constituem uma das principais formas pelas quais o SCN comunica aos diversos tecidos periféricos a fase do relógio interno (Balsalobre *et al.*, 2000; So *et al.*, 2009; Chung *et al.*, 2011; Kalsbeek, Van Der Spek, *et al.*, 2012). A introdução da roda de atividade por 8 semanas resulta em alterações nos ritmos circadianos de corticosterona (Ottawa *et al.*, 2007), o que poderia representar uma das formas através das quais o SCN promove os reajustes de fase necessários em relação ao ciclo claro/escuro .

A temperatura interna constitui outro fator influenciado diretamente pela atividade física que poderia compor a via de sinalização para o ajuste de fase do sistema. Após o trabalho de Buhr e colaboradores (2010) ficou evidente que as oscilações circadianas da temperatura interna compunham um dos sinais utilizados pelo sistema circadiano para ajustar as fases entre os diversos componentes centrais (extra-SCN) e periféricos do relógio biológico. Dessa forma, ao promover aumentos comparáveis e transitórios na temperatura interna, a atividade física poderia, indiretamente, produzir sinais temporais relevantes para o sistema, potencialmente desencadeando uma resposta de reajuste de fase.

O exercício físico, envolvendo uma ação planejada com a finalidade de provocar um desequilíbrio momentâneo na homeostase, constitui um dos instrumentos do processo de treinamento para induzir adaptações positivas para o desempenho físico. Uma única sessão de exercício, em decorrência do aumento do gasto energético, desencadeia uma série de ajustes termorregulatórios, cardiovasculares, metabólicos, respiratórios e hormonais para atender à demanda energética elevada pela musculatura ativa. Por sua vez,

o treinamento físico pode ser compreendido como uma sucessão de sessões de exercícios físicos planejada com a finalidade de promover adaptações bem-sucedidas que resultem em aumento do desempenho. O treinamento aeróbico, ao induzir estados de desequilíbrio a intervalos regulares, proporcionaria estímulos relativamente crônicos que conduzem a adaptações cardiovasculares, metabólicas, hormonais e termorregulatórias, além de um aperfeiçoamento na eficiência mecânica (Thompson *et al.*, 2001). Há evidências de que essas adaptações seriam, pelo menos em parte, mediadas por ajustes centrais (Holschneider *et al.*, 2007; Michelini e Stern, 2009; Santiago *et al.*, 2016).

Nesse sentido, os ajustes decorrentes da sessão de exercício físico parecem ser orquestrados pelo sistema nervoso central através, principalmente, de uma rede neural integrada pela POA, hipotálamo, hipocampo, amígdala e tronco encefálico (Nagashima *et al.*, 2000; Mastorakos *et al.*, 2005; Soya *et al.*, 2007; Michelini e Stern, 2009; Barna *et al.*, 2012; Machado *et al.*, 2016). Durante o exercício físico, sequencialmente ao aumento da atividade muscular, observa-se um aumento da taxa metabólica, da frequência cardíaca, da temperatura interna e da vasodilatação cutânea ((Rodrigues *et al.*, 2003; Balthazar *et al.*, 2010; Machado *et al.*, 2016). Essas diferentes respostas são integradas e coordenadas pelo sistema nervoso central dependendo, sobretudo, da relação entre intensidade e duração do estímulo (que constituem a carga efetivamente imposta ao sistema) (Soya *et al.*, 2007). Além disso, o próprio desempenho físico seria limitado pela capacidade desses diferentes sistemas de manter um nível de atividade que atenda à demanda do exercício físico.

O momento em que o indivíduo reduz (ou não aumenta) a sua taxa de trabalho necessária para a realização de um exercício culminando na interrupção da atividade, caracteriza o estado de fadiga (Rodrigues *et al.*, 2003). Essa capacidade resulta de uma combinação de fatores diretamente relacionados aos sistemas fisiológicos sob maior demanda durante o exercício: hipertermia excessiva, depleção de substratos energéticos, redução de *drive* central, bem como o próprio estado físico, psicológico e nutricional (Cheung e Sleivert, 2004; Noakes, 2011). O sistema nervoso central exerceria um papel determinante no balanço entre esses diferentes sistemas por meio da atividade monoaminérgica, principalmente de dopamina (DA) e serotonina (5-HT) (Meeusen *et al.*, 2006; 2007; Soares *et al.*, 2007; Balthazar *et al.*, 2010; Cordeiro *et al.*, 2014; Rabelo *et al.*, 2015).

A DA estaria diretamente envolvida na modulação de circuitos envolvidos no controle motor, motivação e termorregulação durante o exercício (Foley e Fleshner, 2008; Balthazar *et al.*, 2009; Balthazar *et al.*, 2010). Por sua vez, a 5-HT estaria associada,

sobretudo, com a regulação da atividade locomotora espontânea durante o ciclo claro/escuro, na modulação do apetite, da letargia e da temperatura interna (Meeusen *et al.*, 2006). De fato, tanto a taxa de aumento da temperatura interna (González-Alonso *et al.*, 1999; Rodrigues *et al.*, 2003; Cheung e Sleivert, 2004; Lambert *et al.*, 2005; Meeusen *et al.*, 2007) quanto a temperatura interna crítica (Fuller *et al.*, 1998; Walters *et al.*, 2000) seriam regulados pelo balanço monoaminérgico central serotoninérgico (Bailey *et al.*, 1993a; b; Soares *et al.*, 2007; Cordeiro *et al.*, 2014) e dopaminérgico (Hasegawa *et al.*, 2005; Roelands *et al.*, 2008; Balthazar *et al.*, 2009; Roelands *et al.*, 2009; Balthazar *et al.*, 2010; Hasegawa *et al.*, 2011; Zheng e Hasegawa, 2016).

Se durante o exercício físico, o balanço da atividade monoaminérgica parece ser essencial para a determinação dos limites da capacidade física, o treinamento físico desencadeia adaptações centrais que alterariam a própria atividade desse sistema. Nesse sentido, observa-se que o exercício regular desencadeia alterações plásticas nas redes neurais monoaminérgicas (Werme *et al.*, 2002; Foley *et al.*, 2006; Clark *et al.*, 2015; Petzinger *et al.*, 2015) possivelmente alterando a sensibilidade e a síntese de receptores serotoninérgicos e dopaminérgicos em regiões-alvos. Adicionalmente, animais selecionados segundo a capacidade intrínseca para a corrida em esteira possuem diferenças na atividade de 5-HT e DA em condições basais e em resposta ao exercício físico (Rabelo *et al.*, 2015), reforçando a importância dessas redes neurais no processo de adaptação do sistema nervoso central ao treinamento físico.

Complementarmente, o treinamento físico, ao produzir elevações de temperatura interna a intervalos regulares, promoveria adaptações nos centros termorregulatórios, em especial na POA (Santiago *et al.*, 2016), acarretando melhor adaptação ao estresse térmico e, conseqüentemente, aprimorando o desempenho físico. Essa exposição repetida à hipertermia induzida pelo exercício regular promoveria adaptações também no PVN, envolvido na resposta de mobilização de substratos por meio da ativação da via simpático-excitatória e do eixo hipotálamo, hipófise e adrenal, bem como no controle da atividade autonômica para a vasculatura cutânea (Nagashima *et al.*, 2000; Santiago *et al.*, 2016). Dessa forma, as adaptações neurais induzidas pelo treinamento físico realizado em horários regulares poderiam desencadear sinais de reajuste de fase provenientes do sistema circadiano central, possivelmente através da alteração na atividade monoaminérgica para regiões de controle motor e de termorregulação, diretamente envolvidas no estado basal do ciclo claro/escuro e em resposta ao exercício físico.

2.4 TEMPERATURA AMBIENTE E RITMOS BIOLÓGICOS

Se o papel da atividade física e das oscilações de temperatura interna é bem aceito na comunidade científica, a despeito da relativa adaptação do sistema termorregulatório às mudanças cíclicas na temperatura ambiente, a participação dessa alternância para a sincronização dos ritmos circadianos em mamíferos continua controversa (Rensing e Ruoff, 2002). O papel sincronizador dos ciclos de temperatura interna em mamíferos foi demonstrado tanto *in vivo* quanto *ex vivo* e *in vitro* (Brown *et al.*, 2002; Buhr *et al.*, 2010; Saini *et al.*, 2012), indicando que a relação entre os sistemas de termorregulação e de controle temporal seria bidirecional.

Geralmente, a temperatura ambiente atinge os menores valores durante a fase escura do ciclo de luminosidade, quando há menor (ou nenhuma) exposição direta à irradiação solar. Assim como o exercício físico, a exposição ao frio induz ajustes autonômicos, cardiovasculares, metabólicos e comportamentais dependentes da ativação sincronizada de múltiplas vias de controle e regulação (Nakamura e Morrison, 2011). Os ajustes promovidos nessas vias complexas e redundantes são responsáveis pela atividade fisiológica de diversos órgãos efetores, culminando com respostas tais como a vasoconstrição (retenção e acúmulo de calor) e a termogênese derivada tanto da ativação do tecido adiposo marrom (sem tremor) quanto da contração da musculatura esquelética (com tremor) (Nakamura e Morrison, 2011). A ativação sincronizada das inervações autonômicas durante a exposição ao frio para o tecido adiposo branco, marrom, fígado, adrenal e musculatura esquelética ocorreria para produzir a quantidade necessária de calor para defender a homeostase térmica sem prejuízo de outras funções fisiológicas (Morrison, 2016).

A termogênese com tremor pode ser ativada durante a exposição prolongada ao frio resultando em contração involuntária da musculatura esquelética tanto em modelos murinos (Vaillancourt *et al.*, 2009; Nakamura e Morrison, 2011) quanto em seres humanos (Weber e Haman, 2005; Hanssen *et al.*, 2015). A via neural que regula o tremor engloba: uma via aferente (receptores de frio, gânglio da raiz dorsal, corno dorsal e núcleo parabraquial lateral); um complexo para a integração dos sinais periféricos (MnPO, MPOA e DMH); e uma via efetora (núcleo pálido da raphe, corno ventral e musculatura esquelética) (Nakamura e Morrison, 2011). O nível de atividade de cada segmento da via seria resultante do balanço entre diversos sistemas de sinalização neural.

Adicionalmente, a exposição ao frio induz alterações metabólicas reguladas centralmente que defendem a homeostase da temperatura interna (Nakamura e Morrison, 2011). Com o início da exposição ocorre um aumento da taxa metabólica por meio da ativação da termogênese sem e com tremor, resultando em aumento da oxidação de carboidratos e lipídios nos tecidos diretamente envolvidos (principalmente a musculatura esquelética e o TAM) (Lowell e Spiegelman, 2000). Conseqüentemente, ocorre o aumento da mobilização de lipídios (originados da lipólise no tecido adiposo branco e marrom) utilizados como substrato principal na termogênese (Lowell e Spiegelman, 2000). Com a contração muscular, aumenta a razão ADP/ATP, a atividade de AMPK e PGC1 α e, conseqüentemente, a captação e oxidação de ácidos graxos, aumentando a disponibilidade de substratos para a termogênese (Oliveira *et al.*, 2004).

Complementarmente, têm sido demonstrado que componentes moleculares do relógio biológico influenciam diretamente a oxidação de substratos energéticos no TAM e na musculatura esquelética (Delezie *et al.*, 2012; Woldt *et al.*, 2013). Logo, o relógio biológico central poderia desempenhar um papel importante na modulação dessa resposta termorregulatória sincronizada e hierarquicamente estruturada de maneira a definir um nível basal de taxa metabólica e uma intensidade do ajuste promovido pelo sistema, balanceando a sua atividade autonômica. Nesse sentido, observa-se a necessidade do componente molecular do relógio molecular funcional no tecido adiposo marrom para o metabolismo energético (Chappuis *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2016). De fato, a deficiência na expressão do gene do relógio BMAL1 ou PER2 induz a ativação de mecanismos compensatórios de produção de calor (Chappuis *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2013). Em humanos, observou-se uma associação entre a captação de glicose pelo TAM e a produção de calor diária (Lee *et al.*, 2016). Dessa maneira, o relógio biológico poderia desempenhar um papel na modulação da resposta de defesa contra o frio, possivelmente através de ajustes nos limiares para a ativação dos órgãos efetores.

O relógio central, possivelmente através de suas interações com regiões de controle da temperatura interna, tais como a zona subPVZ, o DMH e a POA, poderia efetivamente modular a resposta termorregulatória a variações da temperatura ambiente (Deurveilher e Semba, 2003; Saper, 2013; Guzman-Ruiz *et al.*, 2015). Além disso, os componentes moleculares do relógio biológico são amplamente expressos em praticamente todas as células do corpo, interagindo com vias intracelulares diretamente relacionadas com o metabolismo e com a produção de calor (Reppert e Weaver, 2002; Delezie *et al.*, 2012; Chappuis *et al.*, 2013; Gerhart-Hines *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2013; Woldt *et al.*, 2013; Lee

et al., 2016). Em um dos poucos trabalhos investigando diretamente o tema, Brown e colaboradores (2002) demonstraram que a inversão dos ciclos de temperatura ambiental induz alterações na expressão de genes do relógio no fígado e em diversas regiões do sistema nervoso central. Entretanto, as formas através das quais a redução da temperatura ambiente em diferentes horários do dia pode sinalizar para o sistema circadiano ainda não foram esclarecidas.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Investigar o efeito do exercício físico agudo, do treinamento físico ou da exposição ao frio em diferentes horários sobre diferentes componentes do sistema circadiano controle temporal de ratos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar efeitos agudos do exercício de corrida em esteira nos principais *outputs* do sistema circadiano, tais como:
 - I. Níveis de corticosterona plasmática;
 - II. Expressão de genes do relógio no tecido muscular esquelético e nas adrenais;
 - III. Variações diárias de temperatura interna e de atividade locomotora;

- b) Determinar os efeitos de 8 semanas de treinamento físico em diferentes *outputs* do sistema circadiano, tais como:
 - I. Variações diárias de temperatura interna e atividade locomotora;
 - II. Variações diárias de corticosterona plasmática;
 - III. Variações diárias de atividade de dopamina e serotonina no sistema nervoso central.
 - IV. Variações diárias da expressão de genes do relógio no tecido muscular esquelético.

- c) Determinar os efeitos da exposição aguda ao frio (4 °C) em diferentes horários sobre:
 - I. A temperatura interna, atividade locomotora, gasto energético, utilização de substratos e ingestão alimentar;
 - II. A expressão de genes envolvidos com o relógio biológico em tecido muscular esquelético e tecido adiposo marrom.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CUIDADOS ÉTICOS

Os procedimentos experimentais referentes ao exercício físico (experimentos 1 e 2) utilizados para o presente trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), sob o protocolo número 57/2014.

Os procedimentos experimentais referentes à exposição ao frio (experimento 3) foram aprovados pelo Comitê de Experimentação Animal do Instituto Real de Ciências do Reino dos Países Baixos (*Dierexperimentencommissie, DEC/KNAW*) sob o protocolo NIN.2014.99.

4.2 AMOSTRAS

Nos experimentos envolvendo exercício físico, foram utilizados ratos recém-desmamados (4 semanas), para os protocolos envolvendo treinamento físico, e ratos adultos (≥ 11 semanas), para os protocolos envolvendo o exercício físico agudo, da linhagem Wistar, do sexo masculino, provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os animais foram mantidos em caixas coletivas (3-5/caixa), sob um ciclo claro/escuro de 12/12 horas (luzes acesas às 07:00 e apagadas às 19:00) e temperatura ambiente de $24 \pm 1^\circ\text{C}$, com livre acesso à ração e água.

Nos experimentos envolvendo a exposição ao ambiente frio, foram utilizados ratos adultos da linhagem Wistar (≥ 11 semanas), machos (Charles Rivers, Alemanha). Até o momento dos procedimentos experimentais, os animais foram mantidos em caixas coletivas (4-6/caixa), ciclo claro/escuro de 12/12 horas (luzes acesas às 07:00 e apagadas às 19:00) e temperatura ambiente de $22 \pm 1^\circ\text{C}$ e livre acesso à ração e água.

4.3 DELINEAMENTOS EXPERIMENTAIS

4.3.1 Experimento 1: Efeito do exercício agudo no balanço térmico circadiano e na expressão dos genes do relógio.

Neste experimento, buscou-se avaliar a influência de uma única sessão de exercício físico em esteira nas variações diárias de temperatura interna e atividade locomotora espontânea de ratos não treinados e também na expressão imediata de genes do relógio na musculatura esquelética e nas adrenais.

Grupos experimentais. Inicialmente (FIG 2), os animais foram separados em 4 grupos experimentais de maneira balanceada segundo o desempenho aferido em teste de corrida de intensidade progressiva até a fadiga e um outro grupo não manipulado até o término do experimento: repouso em esteira (R), exercício submáximo constante a 11m/min (aproximadamente, 40% da velocidade máxima média do grupo) (E40), exercício submáximo constante a 17 m/min (aproximadamente 70% da velocidade máxima média do grupo) (E70), exercício de intensidade progressiva até a fadiga (EPF) e grupo sem manuseio (Naïve) (FIG 2). As sessões experimentais ocorreram entre 11:00 e 13:00 (ZT4 e ZT6, respectivamente), correspondente à faixa sensível do relógio biológico às alterações de equilíbrio interno relacionadas à atividade física (Marchant e Mistlberger, 1996; Wolff e Esser, 2012). Em um segundo grupo (FIG 3), os animais foram submetidos a todas as situações experimentais em esteira para o registro contínuo de temperatura interna e atividade locomotora espontânea.

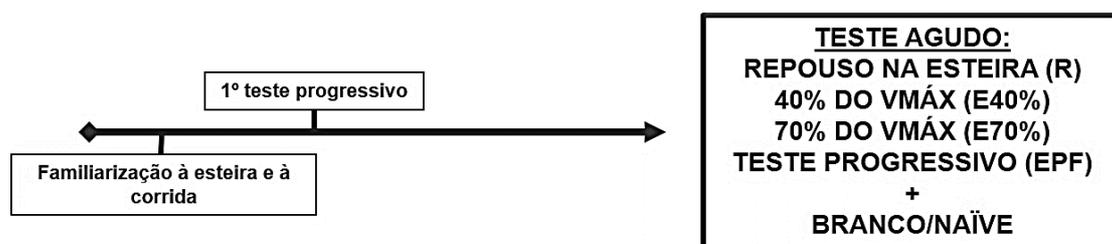


FIGURA 2. Primeiro delineamento experimental utilizado para o experimento 1.

Avaliação da variação diária da temperatura interna e atividade locomotora. Para avaliar os efeitos da sessão de exercício na **variação diária** da temperatura interna e da atividade locomotora, cada animal recebeu um sensor de telemetria na cavidade peritoneal para o registro contínuo das variáveis de interesse (FIG 3). Cada animal passou por cada um dos protocolos em esteira em um período de aproximadamente 14 dias. Dessa maneira, garantiu-se uma ordem balanceada para a realização dos procedimentos, um tempo de recuperação de pelo menos 48 horas entre sessões experimentais, bem como o registro prolongado das variáveis de interesse, acrescidas do perfil diário de ingestão alimentar e hídrica.

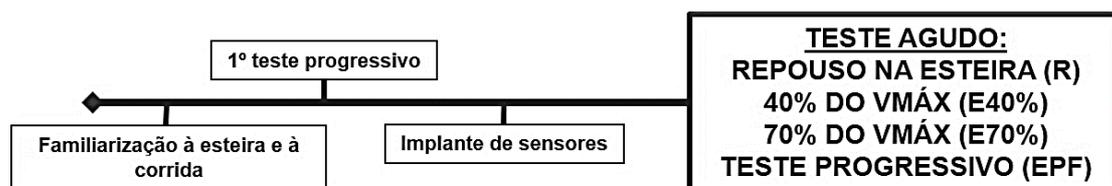


FIGURA 3. Segundo delineamento experimental utilizado para o experimento 1.

Avaliação dos efeitos agudos do exercício físico nos genes do relógio. Em um outro grupo de animais, 30 minutos após o término de uma única sessão experimental (R, E40,

E70, EPF ou Naïve), os animais foram decapitados para colheita de sangue e retirada de tecido cerebral, adrenais e músculo gastrocnêmio. Adrenais e gastrocnêmio foram utilizados para realização de PCR em tempo real da expressão dos genes do relógio PER1. O sangue foi utilizado para a dosagem imunoenzimática de corticosterona plasmática.

4.3.2 Experimento 2: Efeito do treinamento físico na variação diária ritmo da expressão dos genes do relógio, hormônios, catecolaminas e do balanço térmico.

Neste experimento, avaliou-se se a relação entre as adaptações induzidas pelo treinamento físico no desempenho, no balanço térmico e na eficiência térmica com eventuais ajustes de parâmetros circadianos, tais como temperatura interna, atividade locomotora, corticosterona plasmática, atividade serotoninérgica e dopaminérgica basais, bem como a expressão de genes do relógio em tecidos periféricos.

Grupos experimentais. Inicialmente, os animais foram separados em 2 grupos experimentais: não treinado (NT) e treinado (T). Os animais foram manipulados diariamente durante aproximadamente 9 semanas estruturadas da seguinte maneira: 1 semana de familiarização/aclimação à corrida em esteira seguida por um teste incremental de velocidade até a fadiga (T1); e 8 semanas de treinamento físico em esteira com a ocorrência de outro teste progressivo ao término da 4^a semana (T4), além de um último teste ao término da 8^a semana (FIG 4). Todos os procedimentos de exercício foram realizados durante a fase clara, no período compreendido entre os ZTs 4 e 6 (11:00 e 13:00, respectivamente).

Avaliação da variação diária da temperatura interna e atividade locomotora. Ao término da 7^a semana de treinamento, 8 animais de cada um dos grupos foram implantados com um sensor para registro de temperatura interna e atividade locomotora espontânea durante a 8^a semana de treinamento (FIG 4). Os valores de ingestão alimentar e hídrica também foram registrados simultaneamente, como formas de controle de outros parâmetros cíclicos dos ritmos biológicos.

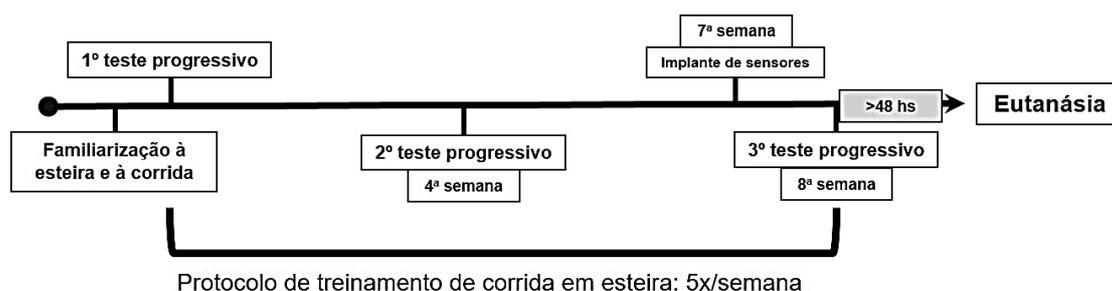


FIGURA 4. Delineamento experimental utilizado para o experimento 2.

Avaliação da variação diária de corticosterona, genes do relógio e monoaminas centrais. No mínimo quarenta e oito horas após o último teste de esforço, os animais (com e sem sensores) foram sacrificados por decapitação em 5 momentos do dia: ZT0 (07:00), ZT4 (11:00), ZT6 (13:00), ZT12 (19:00) e ZT18 (01:00). O sangue foi colhido para dosagens hormonais, o gastrocnêmio e as adrenais foram retirados para determinar a expressão de genes do relógio e o tecido cerebral foi retirado para caracterização das oscilações basais de monoaminas.

4.3.3 Experimento 3: Efeito do horário do dia nas respostas térmica, metabólica e na expressão de genes do relógio induzidas pela exposição aguda ao frio.

Neste experimento, avaliou-se o efeito do horário do dia na resposta de defesa da temperatura interna durante a exposição aguda ao ambiente frio. Com o procedimento proposto, buscou-se estabelecer uma relação entre as alterações metabólicas e comportamentais com as alterações em genes do relógio e genes controlados pelo relógio em tecidos particularmente ativos durante a exposição ao frio, o músculo esquelético sóleo e o tecido adiposo marrom.

Após uma semana de aclimação à sala de experimentos e ao manuseio, os animais receberam um sensor para registro de temperatura interna durante todo o período experimental. Após a recuperação, cada animal foi colocado em uma caixa individual integrada a uma câmara com o microambiente controlado, a um sistema de calorimetria indireta, a um sistema de registro de atividade locomotora espontânea e de ingestão alimentar e hídrica. Os animais ficaram nesse gabinete durante 2-3 dias para determinação de valores das variáveis estudadas em condições de temperatura usualmente encontradas em laboratórios de experimentação animal (23 °C).

Grupos experimentais. Após a realização dessas medidas basais, os animais foram submetidos ao frio (4 °C) durante 3 horas em 6 diferentes momentos e eutanasiados imediatamente após o término do período de exposição nos seguintes horários: ZT2 (09:00), ZT6 (13:00), ZT10 (17:00), ZT14 (21:00), ZT18 (01:00), ZT22 (05:00). Animais não manipulados e mantidos em sala experimental com temperatura ambiente semelhante (22 °C) foram utilizados como controle e sacrificados nos mesmo horários para a análise da expressão dos genes de interesse. O sangue foi colhido para dosagens hormonais, o sóleo e o tecido adiposo marrom foram retirados para determinar a expressão de genes do relógio e daqueles controlados pelo relógio.

4.4 PROCEDIMENTOS E TÉCNICAS EXPERIMENTAIS

4.4.1 Familiarização à esteira

Todos os animais utilizados para os experimentos envolvendo exercício físico foram familiarizados à esteira rolante motorizada adaptada para pequenos animais (GAUSTEC, Contagem, MG, Brasil) durante 5 dias consecutivos. Ao término do processo de familiarização, os animais estavam aptos a correr durante 5 minutos com uma velocidade de 15 m/min. Com esse procedimento, buscou-se minimizar os efeitos da mudança de ambiente nos resultados observados, bem como permitir aos animais apreender a presença da grade de choque elétrico posicionada na parte de posterior da esteira, bem como o sentido da corrida em esteira.

4.4.2 Testes de capacidade física máxima e exercício submáximo

Todos os protocolos envolvendo exercício físico foram realizados entre ZT4 e ZT6. Esse horário foi escolhido tendo por base uma curva de resposta de fase para o exercício na qual constatou-se maior efeito sincronizador do exercício em esteira motorizada quando a atividade era realizada entre os ZT4 e 6 (Marchant e Mistlberger, 1996; Wolff e Esser, 2012).

Testes progressivos até a fadiga. O protocolo de exercício com intensidade progressiva até a fadiga consistiu em uma corrida em esteira com inclinação constante de 5° e uma velocidade inicial de 10 m/min com aumentos de 1 m/min a cada 3 minutos até o momento no qual os animais interrompiam o exercício físico ou não eram mais capazes de manter a velocidade de corrida por 10 segundos (FIG 5). Os testes ocorreram em uma sala com temperatura ambiente mantida em 24°C. No Experimento 2, o último teste de esforço realizado ao término da 8ª semana de treinamento foi acompanhado apenas pelo registro contínuo de temperatura interna (sensor intraperitoneal) e da pele da cauda (sensor de superfície).

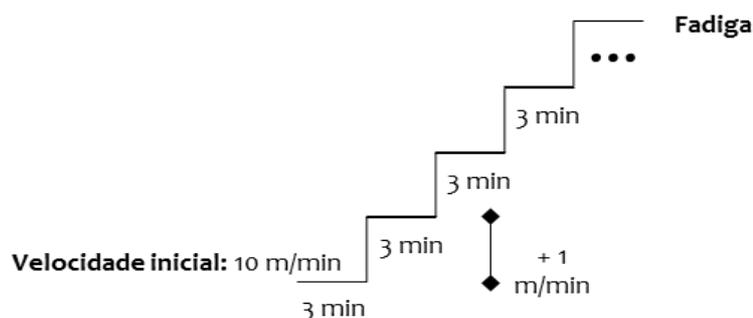


FIGURA 5. Representação esquemática do teste de exercício progressivo até a fadiga.

Testes submáximos. Os testes submáximos utilizados no Experimento 1 consistiram em 60 minutos de corrida em esteira com diferentes velocidades (11 m/min e 17m/min) definidas em função da capacidade máxima prevista para ratos adultos da linhagem Wistar. Apenas os animais utilizados para caracterização do efeito do exercício agudo na ritmicidade da temperatura interna e atividade locomotora espontânea receberam um sensor intraperitoneal para registro das variáveis avaliadas.

4.4.3 Programa de treinamento físico em esteira

O protocolo de treinamento físico consistiu em uma corrida em esteira durante 8 semanas a uma frequência de 5 dias por semana. A intensidade e a duração do exercício foram aumentadas gradualmente até que os animais alcançassem a velocidade de 25 m/min, com 5% de inclinação da esteira, durante 60 minutos (Santiago *et al.*, 2016). As sessões de treinamento foram realizadas entre ZT4 e ZT6. Para garantir uma manipulação semelhante à empregada no grupo T, os animais do grupo NT realizaram exercício em esteira durante o mesmo período de treinamento, com velocidade de 15 m/min, porém com duração de apenas 5 min/dia, 2 vezes na semana.

4.4.4 Registro de temperatura interna e atividade locomotora espontânea

Os animais utilizados nos experimentos envolvendo exercício físico (experimentos 1 e 2) receberam um sensor de telemetria (modelo G2 E-Mitter, Mini-Mitter Company, Sun River, OR, USA) intraperitonealmente durante sedação e anestesia com uma mistura de quetamina (Cetamina 10%, Syntec) e xilasina (Xilasina 2%, Agener União). Por sua vez, os animais utilizados nos experimentos envolvendo o ambiente frio (experimento 3) receberam um *data logger* para registro de temperatura interna (DST nano-T, Star-Oddi, Gardabaer, Islândia) durante sedação e anestesia por inalação (Fluoretano 4%).

Após uma laparotomia de aproximadamente 2 cm sobre a *linea* alba do músculo reto abdominal, os sensores foram fixados internamente à parede abdominal. As aberturas foram então suturadas e, ao término da cirurgia, foi aplicada uma injeção de antibiótico i.m. nas patas traseiras (Pentabiótico Veterinário ®, Fort Dodge Saúde Animal Ltda) e uma dose s.c. de analgésico antiinflamatório (Banamine ®, 50 mg/ml, Schering-Plough, S/A). A recuperação dos animais foi constatada através da aferição do peso corporal, de características gerais de pelagem e da atividade na caixa.

Após a recuperação, as caixas individuais contendo os animais dos procedimentos envolvendo exercício físico (experimentos 1 e 2) foram posicionadas sobre placas receptoras individuais (ER-4000 Energizer/Receiver, Mini-Mitter Company, Sun River,

OR, USA) conectadas em série com um computador pessoal contendo o software de aquisição de dados. Cada uma das placas receptoras foi previamente configurada para registrar continuamente os sinais emitidos em frequências específicas de um único sensor de telemetria. Segundo informações do fabricante, a precisão do sistema para o monitoramento de temperatura é de ± 0.1 °C. A atividade locomotora espontânea constitui uma medida representativa de cada deslocamento espacial do sensor (E-mitter) nos eixos longitudinal, horizontal e transversal sobre cada placa receptora. Cada uma dessas medidas foi acumulada nos intervalos de registro determinados em cada experimento e expressas em unidades arbitrárias (ua). Para fins de análise de resultados, apenas os dados gerados após as 12 horas iniciais de registro foram utilizados para as variáveis estudadas.

Os animais envolvidos nos experimentos de exposição ao frio (experimento 3) foram transferidos para caixas individuais localizadas em uma câmara de calorimetria indireta climatizada para até 8 animais (Environmental Chambers, PhenoMaster/LabMaster, TSE-Systems, Bad Homburg, Alemanha). Nesse sistema, a atividade locomotora espontânea foi medida por meio de um sistema de feixes externos à cada caixa (ActiMot2 System, PhenoMaster/LabMaster, TSE Systems, Bad Homburg, Alemanha). Cada interrupção dos feixes em um plano tri-axial representava uma medida de atividade locomotora. Essas medidas acumuladas em intervalos de 15 minutos foram registradas e armazenadas através do software (PhenoMaster/LabMaster). Por sua vez, os *dataloggers* utilizados foram previamente programados para registrar os valores de temperatura interna a intervalos de 15 minutos. Segundo informações do fabricante, a precisão do sistema para o monitoramento de temperatura é de ± 0.2 °C. Após o término dos procedimentos experimentais, os dados foram transferidos através de uma interface (Communication Box, RS-232C de 9 pinos) ligada em série com um computador pessoal contendo o software (Mercury, Star-Oddi, Gardabaer, Islândia). Para fins de análise de resultados, apenas os dados gerados após 6 horas de registro foram utilizados para ambas as variáveis descritas.

4.4.5 Registros de calorimetria indireta

No experimento 3, após o implante do *data logger*, os animais foram transferidos para caixas individuais localizadas em uma câmara de calorimetria indireta climatizada para até 8 animais. Para fins de análise de resultados, apenas os dados gerados após 6 horas de registro foram utilizados. Nesse sistema, cada caixa foi alimentada por um sistema individual de controle de entrada e saída de fluxo de ar (1,5 L/min) permitindo medidas de VO_2 e VCO_2 a cada 15 minutos (tempo necessário para que o sistema de aquisição

analisasse cada uma das caixas em funcionamento). O software de análise (PhenoMaster/LabMaster) integra os dados colhidos e calcula em tempo real o gasto energético $(CVO_2 \times VO_2 + CVCO_2 \times VCO_2)/1000$; para $CVO_2=3,941$ e $CVCO_2=1,106$ como valores de referência pré-estabelecidos para o sistema, e o quociente respiratório, ou taxas de troca respiratória (VCO_2/VO_2) para cada intervalo.

4.4.6 Análises de sensibilidade dos sistemas

No experimento 1, a associação entre a temperatura interna e a atividade locomotora espontânea antes e após os procedimentos na esteira foram avaliadas por meio de ANOVA *one-way* da razão e/ou da inclinação da reta de regressão linear para cada hora de registro. Procedimento semelhante foi realizado no experimento 2, com a finalidade de observar eventuais efeitos do treinamento nessa relação entre as variáveis de interesse. Com essa análise, buscou-se caracterizar a influência da atividade locomotora espontânea na temperatura interna durante as situações experimentais (Machado *et al.*, 2015; Machado *et al.*, 2016).

4.4.7 Dosagens de corticosterona

Nos experimentos 1 e 2, os níveis de corticosterona plasmática foram determinados através da técnica de imunoenensaio enzimático (ELISA) por meio de kits comercialmente disponíveis (para o experimento 1: Enzo LifeSciences, science Pro, São Caetano do Sul, SP, Brasil; para o experimento 2: Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, EUA). Todas as amostras foram avaliadas em duplicatas seguindo as especificações do fabricante.

4.4.8 Dosagens de catecolaminas centrais por cromatografia líquida de alta performance (HPLC)

No experimento 2, os níveis cerebrais de NA, DOPAC, DA, 5-HT e 5-HIAA, bem como a taxa de renovação de serotonina e dopamina (expressas em função da razão entre o metabólito e a monoaminas de interesse), foram determinados nas seguintes áreas de interesse: *caudado putamen*, área pré-óptica e núcleo paraventricular do hipotálamo.

Imediatamente após a eutanásia em cada horário do dia, os cérebros dos animais foram cuidadosamente removidos e congelados em gelo seco e em seguida armazenados em *freezer* -80°C até serem processados para a cromatografia líquida de alta performance de fase reversa (HPLC – *high performance liquid chromatography*).

Utilizando como referência o atlas de Paxinos & Watson (2005), os cérebros foram seccionados transversalmente em fatias de até 800 μm com um criostato (Leica CM1850,

Heidlberger, Alemanha). Dessa maneira, foi possível extrair as regiões correspondentes aos núcleos/áreas de interesse (Palkovits, 1973). Para o caudado *putamen*, a área pré-óptica e o núcleo paraventricular do hipotálamo optou-se por uma agulha de 2,0 mm utilizada bilateralmente para o CPU e centralmente (em relação ao 3º ventrículo) para POA e PVN.

Em relação ao bregma, as coordenadas utilizadas como referência para as secções de cada uma das regiões de interesse foram:

- CPU: 2,20 a 0,48 mm;
- POA: 0,48 a -0,48 mm;
- PVN: -0,96 a -1,92 mm.

Enquanto mantido em gelo, o *punch* de cada região cerebral de interesse de cada animal isoladamente foi homogeneizado com sonicador em solução de 0,15 M de ácido perclórico e 0,1 M de EDTA acrescida do padrão interno 3,4 dihidrobenzilamina (DHBA – Sigma Aldrich, Milwaukee, Estados Unidos) na concentração de 7.500 pg/μl. A solução foi centrifugada e o sobrenadante filtrado em membrana não estéril 0,22 U / 13 mm (Millex, SP, Brasil). Desse filtrado, 20 μl eram injetados no sistema de cromatografia (Shimadzu, Kyoto, Japão). Esse sistema é formado por uma coluna de carbono 18 (Purospher 5m, Merck, Darmstadt, Alemanha) precedida por uma coluna com a mesma constituição. O potencial elétrico aplicado no eletrodo de referência de Ag/AgCl foi de 850 mV. A fase móvel do sistema foi composta por 100 mM de dihidrogenofosfato de sódio mohidratado (NaH₂PO₄), 10 mM de NaCl, 0,1 mM de EDTA, 0,14 mM de ácido octanosulfônico, 90% de água MiliQ e 10% de metanol. O pH foi ajustado para 3,5 com ácido orto-fosfórico 85% e a solução foi filtrada com uma membrana de éster de celulose 0,22 U /47 mm (Millipore, SP, Brasil) antes de ser inserida no sistema com um fluxo de 1 mL/min.

A identificação e quantificação de cada pico foram alcançadas através da comparação da curva padrão previamente testada e determinada para cada área de interesse. Para relativizar a quantidade de catecolaminas e metabólitos pela quantidade de tecido utilizado, quantificou-se o nível de proteínas nas amostras pelo método de Bradford.

4.4.9 Determinação da expressão de genes por PCR em tempo real

Após a eutanásia por decapitação, os tecidos foram rapidamente removidos e congelados em recipiente contendo nitrogênio líquido (gastrocnêmio, sóleo, tecido adiposo marrom e adrenais) ou gelo seco (cérebro). As amostras foram acondicionadas em refrigerador -

80 °C até o momento de serem processadas para análise da expressão de genes de interesse. O RNA total foi extraído com *Trizol* (Invitrogen, Califórnia, Estados Unidos) conforme instruções do fabricante, ou em conjunto com o kit para extração de RNA *High Pure RNA Tissue Kit* (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha). Em seguida, a amostra foi ressuspensa em 20-80 µL de H₂O DEPC (Life Technologies, Estados Unidos), e tratada com DNase conforme instruções do fabricante (turbo-DNA-freeTM, Life Technologies, Estados Unidos).

A concentração de RNA foi determinada por leitura da absorbância em 260 nm em espectrofotômetro (Nanodrop, Thermo Scientific, Wilmington, Estados Unidos). Apenas amostras com leituras de razão 260/230 entre 1,8 e 2,2 foram utilizadas para as reações subsequentes. No experimento 3, a qualidade da extração foi ainda verificada por meio da análise da qualidade do RNA (Bioanalyzer, Agilent, Santa Clara, Estados Unidos). Nesse experimento, a reação de transcriptase reversa foi realizada em amostras de sôleo (300 µg/µL de RNA) e tecido adiposo marrom (400 µg/µL de RNA) com o kit para síntese de cDNA SensiFast (Bioline, Taunton, Estados Unidos). Nos experimentos 1 e 2, a reação de transcriptase reversa foi realizada com 2µg de RNA total das amostras de adrenal e gastrocnêmio, utilizando 2µL de oligonucleotídeos randômicos (50 ng/µL) e 2 uL de dNTPs (10 mM), 8 µL de tampão de PCR 5X, 2 uL de DTT 10 mM, 2 uL do inibidor de ribonuclease 40 U/uL, e 2 uL de Superscript III 200 U/uL, finalizando um volume de 40 µL por reação. O cDNA sintetizado foi utilizado nas reações subsequentes de PCR quantitativo (em tempo real).

No experimento 1, para determinar a expressão de RNAm dos genes de referência e de interesse (TAB 1) foram preparadas soluções contendo os *primers* e sondas (*probes*) específicos para a espécie, desenvolvidos com base nas sequências obtidas a partir do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>), desenhados e sintetizados pela empresa IDT (Coralville, IA, EUA). O composto fluorescente escolhido foi o TaqMan® (Life Technologies). As soluções para cada gene continham: os primers (300 nM para o gene de interesse e 50 nM para o 18S); a sonda (200 nM para o gene de interesse e 50 nM para o normalizador); e Platinum® Supermix (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Os ensaios foram realizados em um termociclador I5 thermal-Cycler (Bio-rad Laboratories, Hercules, CA, EUA), para selecionar o ciclo de temperatura, seguiu-se as instruções do fabricante do Supermix: 1 ciclo a 95 °C por 7 minutos seguido por 45 ciclos de 30 segundos a 95 °C e, 30 segundos a 55 °C.

No experimento 2, para determinar a expressão de RNAm dos genes de referência e de interesse (TAB 2) foram preparadas soluções contendo os *primers*, SYBR® GreenER™ *qPCR SuperMix universal* (Life Technologies, E.U.A.) e H₂O DNaseRNase-free (Life Technologies, E.U.A.), obtendo-se uma concentração final de 300 nM para os *primers* do gene de interesse e 50 nM para os *primers* do RNA 18S (utilizado como normalizador), em soluções independentes. Cada solução foi aliqüotada (48 µL, sendo cada alíquota suficiente para 2 poços) em tubos *ependorf* e o cDNA de cada amostra adicionado (2 µL/alíquota). As soluções já com cDNA foram então distribuídas nos seus respectivos poços da placa experimental (23 µL/poço) e levadas ao termociclador (ABI-PRISMA 7900) para reação nas seguintes condições: 2 min a 50 °C, 8:30 min a 95 °C, seguido por 45 ciclos de 15 s a 95 °C, 1 min a 60 °C, 1 min a 95 °C, 1 min a 55 °C e 80 ciclos de 10 s a 55 °C, com aumento gradativo de 0,5 °C. A análise dos dados foi realizada pela comparação entre o número de cópias dos poços controle e experimentais, ou entre diferentes tempos após normalização pelo nível de expressão do gene de referência.

TABELA 1. Informações sobre os *primers* e *probes* utilizados no experimento 1.

| Gene de interesse | <i>Primers</i> | <i>Probe</i> |
|--------------------|--|--|
| PER1 | Forward: 5'-ATGCAGAAACAACAGCCACGGTTC-3' Reverse: 5'-TGGCCAGGATCTTGAACACTGCTA-3' | 5'-FAM- TCG ATG TAA CGG CTT GTG TGG ACT BHQ_1-3' |
| Gene de referência | <i>Primers</i> | <i>Probe</i> |
| 18S | Forward: 5'-CGGCTACCACATCCAAGGAA-3' Reverse: 5'-GCTGGAATTACCGCGGCT-3' | 5'-HEX-TGC TGG CAC CAG ACT TGC CCT CBHQ_1-3' |

TABELA 2. Informações sobre os *primers* utilizados no experimento 2.

| Gene de interesse | <i>Primers</i> | <i>Amplicon</i> |
|--------------------|--|-----------------|
| PER1 | Forward: 5'-ATGCAGAAACAACAGCCACGGTTC-3' Reverse: 5'-TGGCCAGGATCTTGAACACTGCTA-3' | 146 |
| BMAL-1 | Forward: 5'AGGCCTTCACTGGAATGGTGCTAT3' Reverse: 5' TGACTGGCCTGGAACCTTGCTACAT3' | 110 |
| Gene de referência | <i>Primers</i> | <i>Amplicon</i> |
| 18S | Forward: 5'-CGGCTACCACATCCAAGGAA-3' Reverse: 5'-GCTGGAATTACCGCGGCT-3' | 260 |

No experimento 3, para determinar a expressão de RNAm dos genes de referência e de interesse (TAB 3) incubou-se 2 µL de cada amostra em um poço contendo a solução de PCR Master Mix SensiFast SYBR® (Bioline, Luckenwalde, Alemanha), H₂O DNaseRNase-free (Life Technologies, Califórnia, Estados Unidos) e uma dupla de *primers* do gene de interesse (*forward* e *reverse*). Uma vez preparada a placa experimental, a mesma era levada ao termociclador (LC480, Roche, Mannheim, Alemanha) programado com as seguintes condições: 5 min a 95°C (desnaturação), 35-50

ciclos de 5 s a 95°C / 10 s a 65°C / 15 s a 72°C (amplificação), 1 s a 95°C e 15 s a 65°C (liquefação/*melting*) seguido por uma fase de resfriamento de 1 min a 40°C. A análise dos dados foi feita em uma série de passos constituída pela conversão dos resultados em níveis absolutos de expressão, seguida pelo teste da eficiência do PCR de cada amostra por meio de avaliação dinâmica da linearidade da expressão das reações em uma mesma placa e, por fim, pela relativização da expressão dos genes de interesse pela expressão de 3 genes de referência mais estáveis entre os testados para cada tecido investigado.

TABELA 3. Informações sobre os *primers* utilizados no experimento 3.

| Gene de interesse | Primers | Amplicon |
|-------------------|--|----------|
| PER1 | Forward: 5'-ATGCAGAAACAACAGCCACGGTTC-3' Reverse: 5'-TGGCCAGGATCTTGAACACTGCTA-3' | 188 |
| PER2 | Forward: 5'-CACCTGAAAAGAAAGTGCGA-3' Reverse: 5'-CAACGCCAAGGAGCTCAAGT-3' | 142 |
| CRY1 | Forward: 5'-AAGTCATCGTGCGCATTTC-3' Reverse: 5'-TCATCATGGTCGTCGGACAGA-3' | 195 |
| CRY2 | Forward: 5'-TGGATAAGCACTTGGAAACGGAA-3' Reverse: 5'-TGTACAAGTCCCACAGGCGGTA-3' | 158 |
| BMAL-1 | Forward: 5'-CCGATGACGAACTGAAACACCT-3' Reverse: 5'-TGCAGTGTCGAGGAAGATAGC-3' | 214 |
| CLOCK | Forward: 5'-CGATCACAGCCCAACTCCTT-3' Reverse: 5'-TTGCAGCTTGAGACATCGCT-3' | 239 |
| DBP | Forward: 5'-CCTTTGAACCTGATCCGGCT-3' Reverse: 5'-TGCCTTCTCATGATTGGCTG-3' | 121 |
| REV-ERB α | Forward: 5'-ACAGCTGACACCACCAGATC-3' Reverse: 5'-CATGGGCATAGGTGAAGATTCT-3' | 101 |
| CREB | Forward: 5'-GCAGTGAAGGAGGAGCTTGT-3' Reverse: 5'-ACTCTGCTGGTTGTCTGCTC-3' | 71 |
| PGC1- α | Forward: 5'-TGCCATTGTTAAGACCGAG-3' Reverse: 5'-GGTCATTGGTGACTCTGG-3' | 269 |
| PGC1- β | Forward: 5'-AAAAGGCCATCGGTGAAGGT-3' Reverse: 5'-AGGAGGGCTCATTGCGTTTT-3' | - |
| PPAR- α | Forward: 5'-TCACACAATGCAATCCGTTT-3' Reverse: 5'-GGCCTTGACCTTGTTTCATGT-3' | 177 |
| PPAR- γ | Forward: 5'-CAGGAAAGACAACAGACAAATCA-3' Reverse: 5'-GGGGGTGATATGTTGAACTTG-3' | 95 |
| HSP90 | Forward: 5'-CGGGCCCACCCTGCTCTGTA-3' Reverse: 5'-ACCGAATCTTGCCAGGGCATCA-3' | 210 |
| UCP1 | Forward: 5'-AATCAGCTTTGCTTCCCTCA-3' Reverse: 5'-GCTTTGTGCTTGCACTCTGA-3' | - |
| UCP2 | Forward: 5'-GACTCTGTAAAGCAGTTCTACACCAA-3' Reverse: 5'-GGGCACCTGTGGTGCTAC-3' | 85 |
| UCP3 | Forward: 5'-GCACTGCAGCCTGTTTTGCTGA-3' Reverse: 5'-ATAGTCAGGATGGTACCGAGCA-3' | 131 |

TABELA 3. Informações sobre os *primers* utilizados no experimento 3. (continuação)

| Gene de interesse | Primers | Amplicon |
|----------------------------|--|-----------------|
| CIRP | Forward: 5'-GCGTTAGGAAGCTTGGGTGT-3' Reverse: 5'-TAACCACCACCCCTCCAGAA-3' | 119 |
| CPT1- α | Forward: 5'-ACAATGGGACATTCCAGGAG-3' Reverse: 5'-AAAGACTGGCGCTGCTCA-3' | 65 |
| CPT1- β | Forward: 5'-GTGCTGGAGGTGGCTTTGGT-3' Reverse: 5'-TGCTTGACGGATGTGGTTCC-3' | 152 |
| AMPK | Forward: 5'-TGTCACAGGCATATGGTGGTC-3' Reverse: 5'-TAGAGAATGACCCCGCTGCT-3' | 227 |
| NAMPT-1 | Forward: 5'-ACAGATACTGTGGCGGGAATTGCT-3' Reverse: 5'-TCGACACTATCAGGTGTCTCAG-3' | 252 |
| CD36 | Forward: 5'-ACAGTTTGGATCTTTGACGTG-3' Reverse: 5'-CCTTGGCTAAATAACGAACCTCTG-3' | 113 |
| GLUT4 | Forward: 5'-GGGCTGTGAGTGAGTGCTTTC-3' Reverse: 5'-CAGCGAGGCAAGGCTAGA-3' | 150 |
| HSL | Forward: 5'-TCACGCTACATAAAGGCTGCT-3' Reverse: 5'-CCACCCGTAAGAGGGAACT-3' | 169 |
| LPL | Forward: 5'-CAAAACAACCAGGCCTTCGA-3' Reverse: 5'-AGCAATCCCCGATGTCCA-3' | 140 |
| ADR- β 2 | Forward: 5'-CGCTTCACGTTTCGTGCTGGC-3' Reverse: 5'-CGACCGCTATGAGCGTGTAG-3' | 86 |
| ADR- β 3 | Forward: 5'-CTTCCCAGCTAGCCCTGTT-3' Reverse: 5'-CCTTGCTAGATCTCCATGG-3' | 110 |
| GR | Forward: 5'-ACCTGGATGACCAAATGACCC-3' Reverse: 5'-GGAGCAAAGCAGAGCAGGTTT-3' | - |
| FOXO-1 | Forward: 5'-ACGAGTGGATGGTGAAGAGTG-3' Reverse: 5'-GTAGGGACAGATTGTGGCGAA-3' | 99 |
| ACC1 | Forward: 5'-GATGATCAAGGCCAGCTTGT-3' Reverse: 5'-CAGGCTACCATGCCAATCTC-3' | 65 |
| ACC2 | Forward: 5'-GCACGAGATTGCTTTCCTAG-3' Reverse: 5'-GCTTCCGCTCCAGGGTAGAGT-3' | 101 |
| mTOR | Forward: 5'-AGCAGCATGGGGTTTAGGT-3' Reverse: 5'-CCCAGGAATCATAAGGTG-3' | 62 |
| CamK2a | Forward: 5'-TGGCGTGAAGGAATCCTCTG-3' Reverse: 5'-AAGGCTGTCATTCCAGGGTC-3' | 125 |
| Genes de referência | Primers | Amplicon |
| S18 | Forward: 5'-CTCTTCCACAGGAGGCCTACACG-3' Reverse: 5'-TGGCCAGAACCTGGCTATACTCC-3' | 344 |
| HPRT | Forward: 5'-GCAGTACAGCCCCAAAATGG-3' Reverse: 5'-AACAAAGTCTGGCCTGTATCCAA-3' | 84 |
| GAPDH | Forward: 5'-TGAACGGGAAGCTCACTGG-3' Reverse: 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3' | 306 |
| Cyclophilin | Forward: 5'-ATGTGGTCTTTGGGAAGGTG-3' Reverse: 5'-GAAGGAATGGTTTGTGGGT-3' | 162 |

4.5 PROCEDIMENTOS ESTATÍSTICOS

No experimento 1, as diferenças entre variáveis de desempenho foram avaliadas por meio de ANOVA *one-way* seguida por um teste *post-hoc* para caracterização das diferenças entre os grupos experimentais. As oscilações diárias de temperatura interna, atividade locomotora espontânea e da razão entre elas foram determinadas por ANOVA *two-way* para cada protocolo em esteira. Para estabelecer as possíveis associações entre corticosterona e carga de trabalho, expressão de PER1 e carga de trabalho, Tinterna e atividade locomotora utilizou-se a correlação de *Pearson*. Para comparar as possíveis associações entre Tinterna e atividade locomotora nos grupos experimentais (R, E40%, E70% e EPF) utilizou-se a análise de regressão linear.

No experimento 2, as diferenças entre variáveis de desempenho ao longo de 8 semanas foram avaliadas por meio de ANOVA *two-way* seguida por um teste *post-hoc* para caracterização das diferenças entre os grupos experimentais. As diferenças na temperatura interna e temperatura da pele da cauda durante as sessões de treinamento e o teste progressivo na 8ª semana de treinamento foram determinadas por ANOVA *two-way* (duração do exercício x treinamento) seguida por teste *post-hoc* adequado. As oscilações diárias de variáveis de interesse foram determinadas por ANOVA *two-way* para cada protocolo em esteira seguida.

No experimento 3, a resposta metabólica e comportamental à exposição ao frio em diferentes horários foi inicialmente avaliada por meio de ANOVA *two-way* (tempo de exposição ao frio x temperatura ambiente) seguida pelo cálculo da área total sob a curva de cada parâmetro para análise quanto ao efeito do horário por meio de ANOVA *two-way* (horário x temperatura ambiente). O efeito do horário na resposta ao frio para avaliação de genes e hormônios de interesse foi verificado por meio de ANOVA *two-way* (horário x temperatura ambiente). Os dados foram expressos em média \pm EPM. O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Efeito do exercício agudo no balanço térmico circadiano e na expressão dos genes do relógio

5.1.1 Caracterização dos componentes da carga nos tipos de exercício empregados

Para a caracterização da carga de trabalho empregada no modelo de exercício físico utilizado (corrida em esteira), cada grupo de animais (n=24 animais no total, sendo n=6 animais/grupo) foi submetido a diferentes protocolos de atividade na esteira (FIG 6). Como esperado em função do delineamento experimental proposto, o trabalho realizado (FIG 6, A e B) no grupo E40% foi menor em relação aos grupos E70% (49,6%, $p<0,001$) e EPF (35,7%, $p<0,01$) que, por sua vez, não foram diferentes entre si.

A duração dos protocolos de exercício não variou em termos absolutos (FIG 6, C). Entretanto, em termos relativos (FIG 6, D), o tempo de exercício no grupo EPF foi 14,5% menor do que o realizado pelo grupo E40% ($p<0,05$). Por sua vez, a velocidade máxima alcançada em cada teste (FIG 6, E e F), inicialmente utilizada como nossa variável de referência para a caracterização dos grupos de corrida em esteira, foi menor no grupo E40% ($p<0,0001$) e maior no grupo EPF ($p<0,0001$). Interessante notar que, em relação ao valor do pré-teste, a velocidade do grupo E40% correspondeu a $41,6 \pm 0,01\%$ àquela observada no pré-teste, enquanto, para os grupos E70% e EPF, correspondeu à $63 \pm 0,14\%$ e $100,1 \pm 0,03\%$, respectivamente.

Tendo em vista a constatação de que cada componente da carga – velocidade, duração e tipo de exercício – contribuiu de forma diferente para a carga de trabalho, novos agrupamentos foram realizados com o objetivo de isolar os efeitos de cada parâmetro nas variáveis fisiológicas estudadas. Em relação à carga de trabalho, com base na análise de frequência do parâmetro na população, chegou-se a uma divisão em 2 faixas: Leve – trabalho inferior a mediana (19,55 kgm; n=9); e Alta – trabalho superior a mediana (19,55 kgm; n=9). As 2 faixas empregadas diferenciam-se em termos de trabalho (FIG 7, A e B; $p<0,0001$) e de velocidade máxima (FIG 7, E e F; $p<0,01$), mas não quanto à duração do teste (FIG 7, C e D; $p=0,20$).

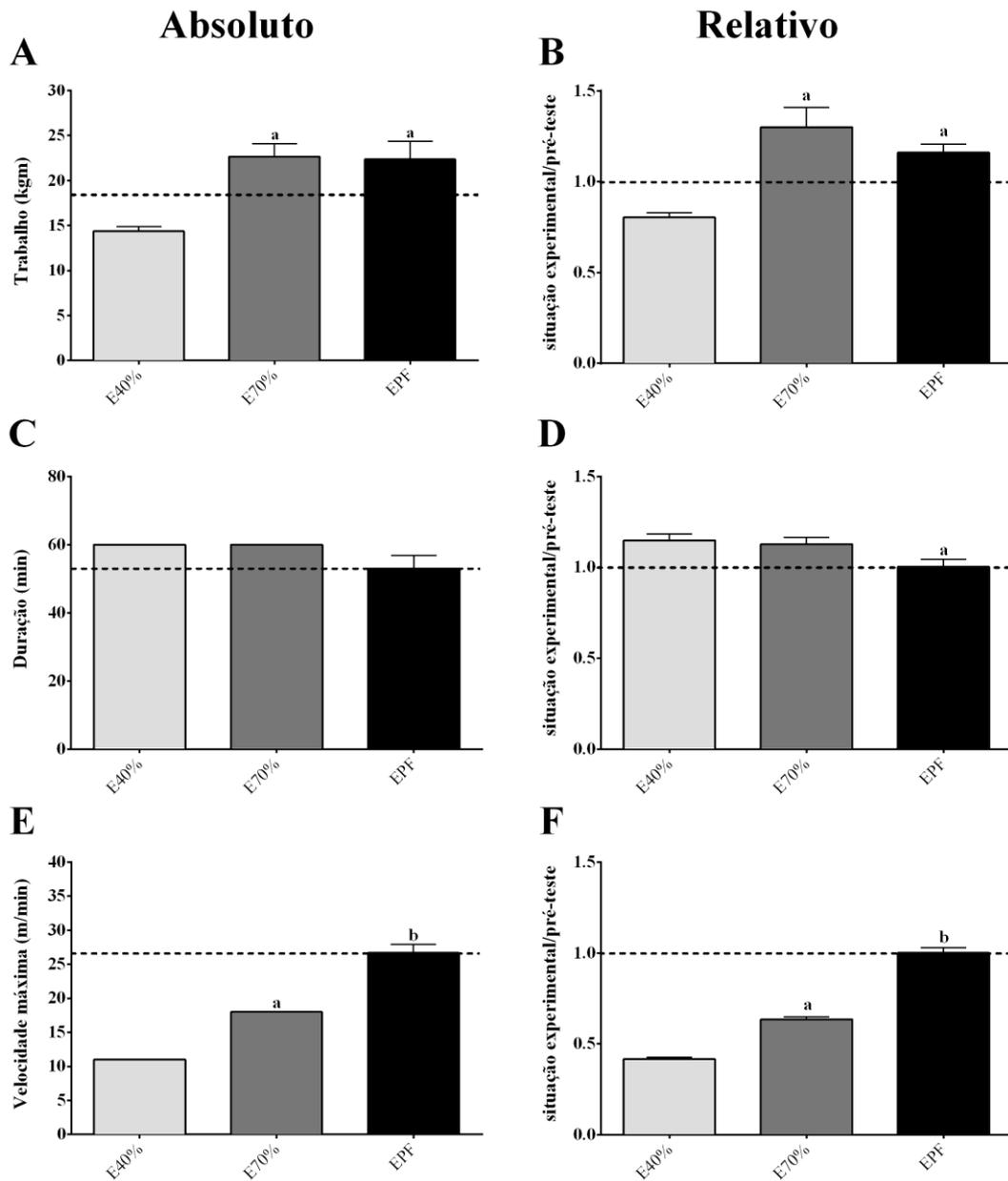


FIGURA 6. Caracterização dos componentes da carga nos 3 protocolos de exercício (E40%, E70% e EPF). Trabalho realizado (A e B), tempo de exercício (C e D) e velocidade máxima (E e F) em cada protocolo de corrida em esteira foram determinados em função da capacidade máxima previamente aferida em teste de intensidade progressiva até a fadiga (B, D e F) e em termos absolutos (A, C e E). As linhas pontilhadas representam a média obtida no progressivo de caracterização da amostra. *a* $p < 0,01$ para comparações com o grupo E40%. Resultados expressos em média \pm epm; $n=6$ /grupo.

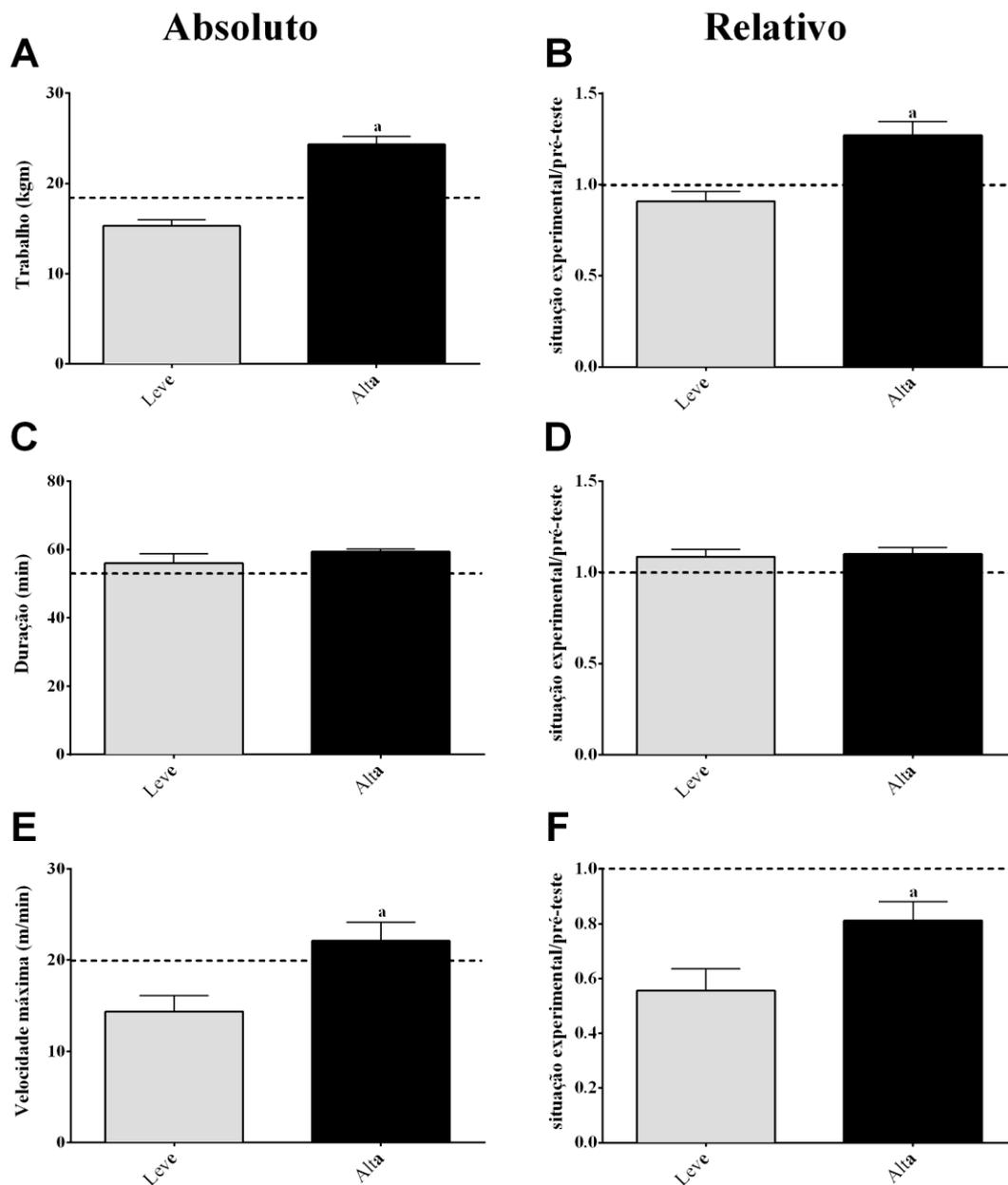


FIGURA 7. Caracterização dos componentes da carga em função das faixas de trabalho (Leve e Alta) realizado por cada animal, independentemente do protocolo de exercício físico. Trabalho realizado (A e B), tempo de exercício (C e D) e velocidade máxima (E e F) em cada protocolo de corrida em esteira foram determinados em função da capacidade máxima previamente aferida em teste de intensidade progressiva até a fadiga (B, D e F) e em termos absolutos (A, C e E). As linhas pontilhadas representam a média obtida no progressivo de caracterização da amostra. *a* $p < 0,01$ para comparações com o grupo E40%. Resultados expressos em média \pm epm; $n=9$ /grupo.

5.1.2 Efeito do exercício agudo nos níveis plasmáticos de corticosterona

De maneira geral, observou-se um aumento da concentração plasmática de corticosterona em resposta ao exercício ($F_{3,20}=4,652$; $p<0,01$; FIG 8, A) diretamente relacionada com o aumento da carga de trabalho realizada ($r=0,485$ e $p<0,05$; FIG 8, C). Esse aumento foi marcante no grupo E70% ($p<0,01$). Não foram observadas diferenças entre os grupos Nãive, Repouso e E40%. Por sua vez, o EPF não induziu aumento de corticosterona nos animais avaliados, apresentando níveis intermediários entre os grupos com menores níveis e o grupo E70%.

Em seguida, procedeu-se a análise com base na separação de grupos de carga de trabalho leve e alta. Confirmando a associação entre carga de trabalho e secreção de corticosterona, observou-se que animais com alta carga de trabalho apresentaram maiores níveis de corticosterona ($p<0,01$) em relação aos animais que não realizaram exercício ($F_{2,22}=3,566$; $p<0,05$; FIG 8, B).

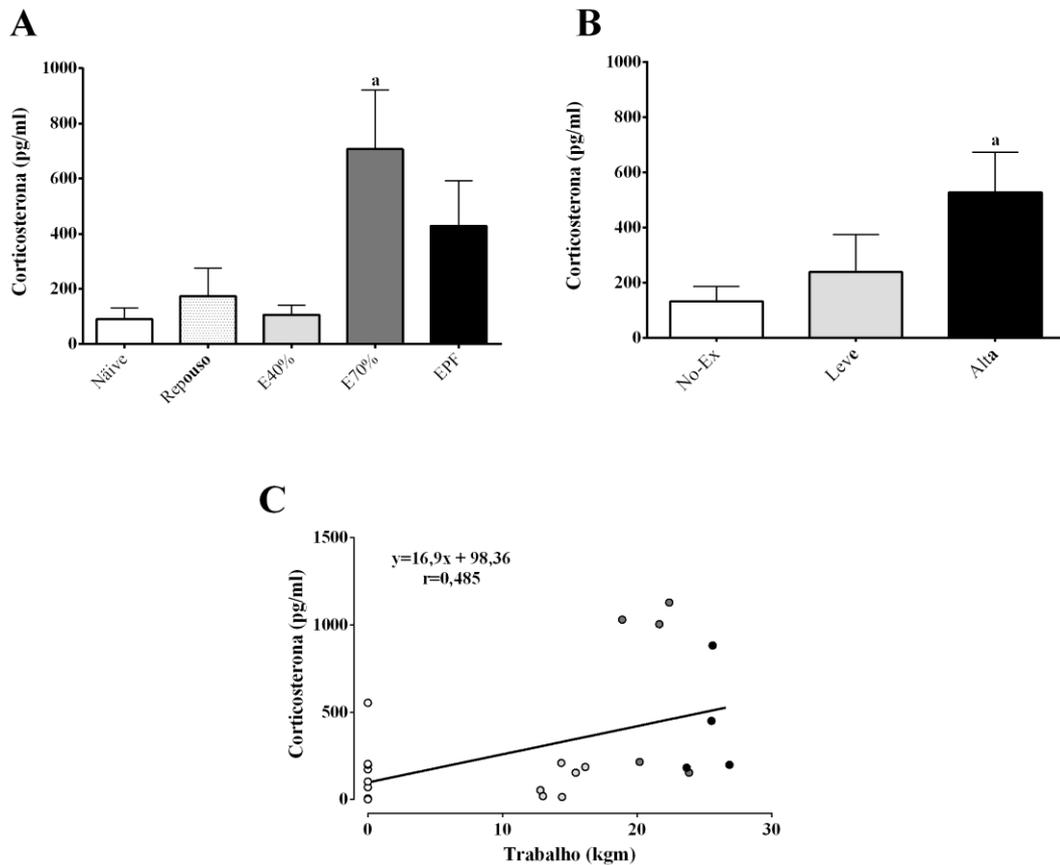
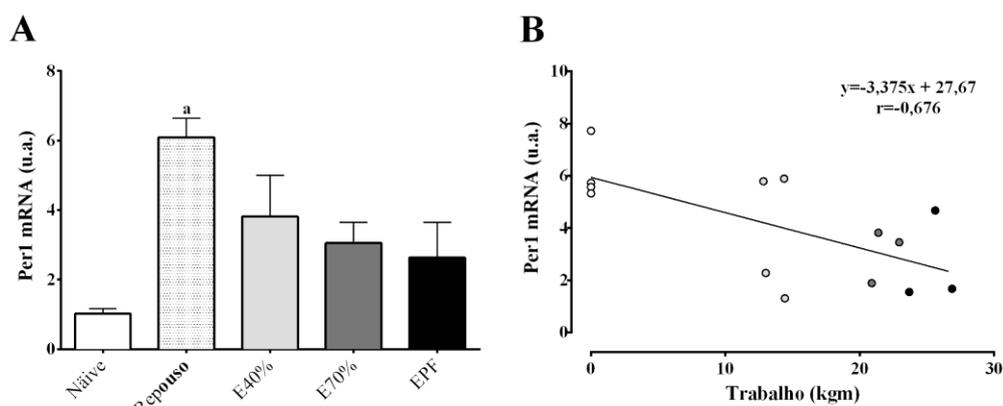


FIGURA 8. Efeito do exercício físico (E40%, E70% e EPF) e da carga de trabalho (Leve e Alta) na concentração de corticosterona plasmática. Em **A**, a concentração de corticosterona plasmática foi expressa em função dos 5 grupos experimentais (Naïve, Repouso, E40%, E70% e EPF). Em **B**, a concentração de corticosterona plasmática foi expressa em função do nível de trabalho realizado durante o exercício (Leve ou Alta), valendo-se dos animais que não realizaram exercício como controle (No-Ex). Em **C**, a associação entre a carga de trabalho realizado e a concentração de corticosterona plasmática foi expressa por meio da correlação de Pearson e a análise de regressão linear (expressa por meio da reta e da respectiva equação que a descreve). Cada círculo corresponde a um animal experimental em uma das situações empregadas. ^a $p < 0,05$ para comparações com o grupo Naïve (**A**) ou No-Ex (**B**). Resultados expressos em média \pm epm; $n = 6$ (E40%), 5 (Naïve, Repouso e E70%) e 4 (EPF).

5.1.3 Efeito do exercício agudo na expressão dos genes do relógio

Em uma análise geral dos resultados, observou-se que a simples exposição do animal à esteira de corrida promoveu um aumento na expressão de PER1 no músculo esquelético em relação ao grupo Nãive ($F_{4,12}=5,023$; $p<0,05$; FIG 9, A). A carga de trabalho do exercício realizado na esteira se correlacionou negativamente com a expressão de PER1 ($r=-0,676$; $p<0,01$; FIG 9, B). Em relação às adrenais, os resultados mostraram que a expressão de PER1 não foi alterada em nenhuma das situações experimentais utilizadas no presente trabalho (FIG 9, C e D).

Gastrocnemio



Adrenal

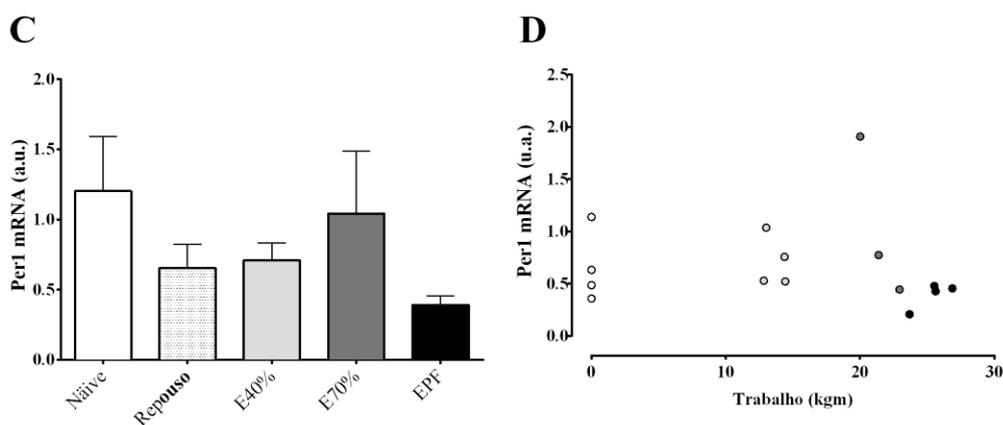


FIGURA 9. Efeito do exercício físico agudo na expressão de mRNA do gene do relógio PER1 no músculo gastrocnemio e nas adrenais. Em **A** e **C**, a expressão de PER1 foi expressa em função dos 5 grupos experimentais (Naïve, Repouso, E40%, E70% e EPF) no músculo gastrocnêmio e nas adrenais, respectivamente. Em **B** e **D**, a associação entre a carga de trabalho realizado e a concentração de corticosterona plasmática foi expressa por meio da correlação de Pearson e a análise de regressão linear (expressa por meio da reta e da respectiva equação que a descreve) em ambos os tecidos. Cada círculo corresponde a um animal experimental em uma das situações empregadas. a $p<0,05$ para comparações com o grupo Naïve. Resultados expressos em média \pm epm; para o músculo gastrocnemio, $n=4$

(Repouso e E40%) ou 3 (Naïve, E70% e EPF); para as adrenais, n=4 (Naïve, Repouso, E40% e EPF) ou 3 (E70%).

5.1.4 Efeito do exercício agudo no balanço térmico circadiano

Os testes realizados durante a fase clara do ciclo produziram alterações na temperatura interna apenas nos momentos subsequentes à realização do exercício. De maneira geral, durante os 3 dias de registro utilizados para caracterizar o perfil oscilatório (FIG 10), a variação diária de temperatura interna ($F_{71,1440}=46,73$; $p<0,0001$) foi afetada pela realização de exercício em esteira ($F_{3,1440}=3,665$; $p<0,05$), com diferenças entre os grupos E40%, E70% e EPF em relação ao Repouso (FIG 10, B) ($p<0,01$). Tais diferenças foram limitadas ao dia do teste ($F_{23,480}=39,33$; $p<0,0001$), especificamente, durante as horas subsequentes à realização do protocolo em esteira (FIG 10, B). Por essa razão, propôs-se a análise da variação de temperatura interna durante o dia experimental com base em quadrantes representativos de: 1 – repouso durante a fase clara, anterior ao teste (ZT 0 a 6); 2 – recuperação após o teste, durante a fase clara (ZT 6 a 12); 3 – primeira metade da fase escura (ZT 12 a 18); e 4 – segunda metade da fase escura (ZT 18 a 24). Essa análise revelou que o exercício de corrida em esteira aumentou a temperatura interna nos quadrantes 2 ($F_{3,120}=13,65$; $p<0,0001$) e 3 ($F_{3,120}=3,596$; $p<0,05$). Nas horas restantes da fase escura do dia do exercício a temperatura interna foi similar entre os grupos, apontando para o reequilíbrio do parâmetro.

Em relação à atividade locomotora, os testes não produziram modificações na oscilação diária dessa variável ($F_{3,480}=0,979$; $p=0,402$) (FIG 10, E). Durante os 3 dias de registro para cada condição experimental, as diferenças de fases não foram alteradas por quaisquer dos protocolos experimentais ($F_{3,1440}=0,218$; $p=0,884$).

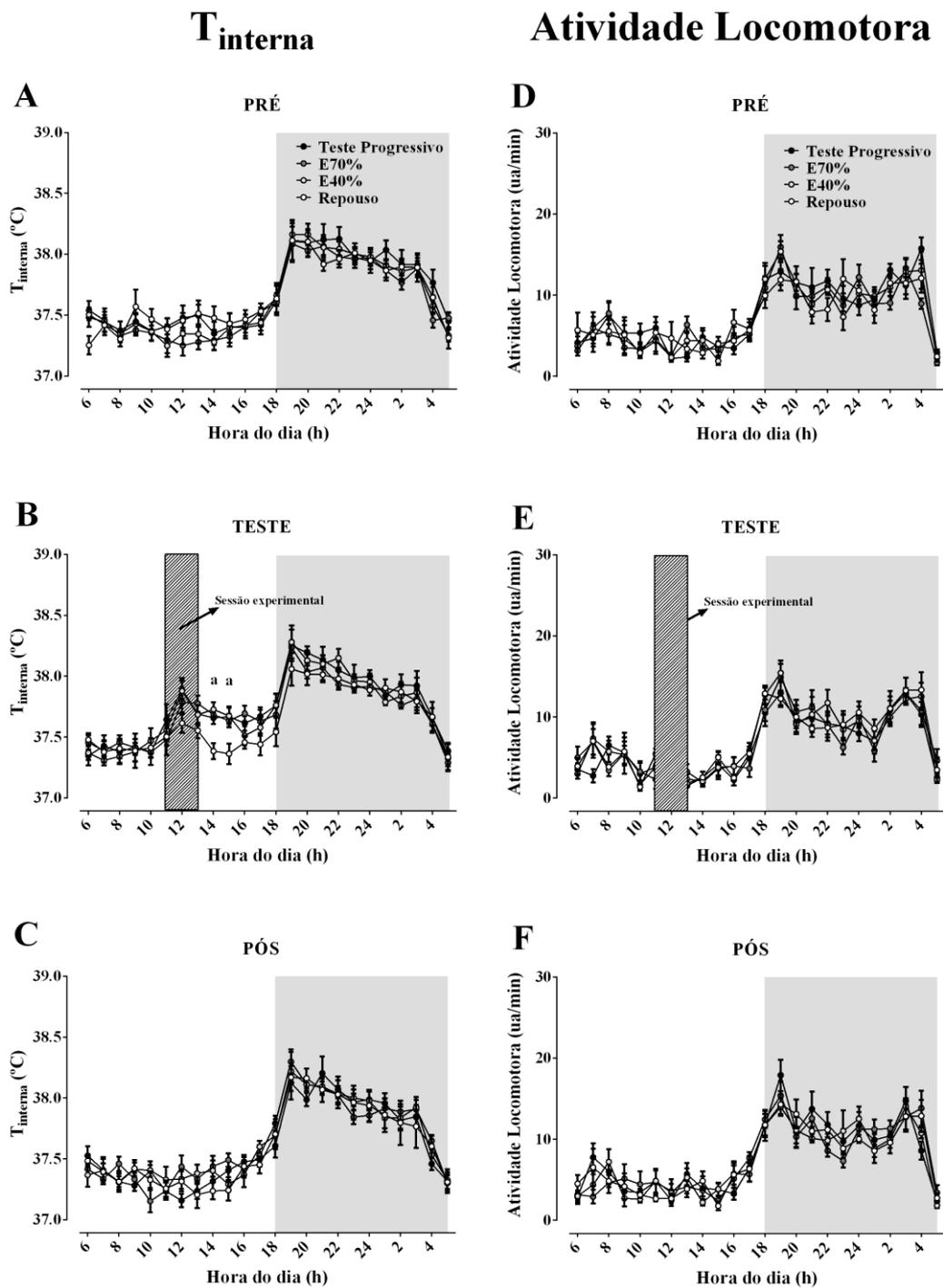


FIGURA 10. Comparações dos efeitos dos diferentes protocolos em esteira de corrida na temperatura interna (**A**, **B** e **C**) e na atividade locomotora espontânea (**D**, **E** e **F**) em cada um dos dias experimentais. As médias da temperatura interna e da atividade locomotora espontânea foram representadas isoladamente no dia imediatamente anterior à sessão experimental (**A** e **D**), no dia do experimento na esteira – Repouso, E40%, E70% e EPF (**B** e **E**), e no dia posterior à sessão experimental (**C** e **F**). As áreas sombreadas em cinza correspondem à fase escura (19:00 às 07:00). As áreas hachuradas correspondem ao período da realização das sessões experimentais (11:00 às 13:00). Resultados expressos em média \pm epm; *a* $p < 0,05$ para comparações com o grupo Repouso. $n = 6$ /grupo.

A avaliação da relação entre o efeito hipertérmico induzido pelo exercício e os níveis de atividade locomotora espontânea ao longo dos períodos de registro em termos globais (envolvendo todos os dias de registro – FIG 11) e também para cada situação experimental (FIG 12), bem como da ritmicidade da razão $ALE/T_{interna}$ (FIG 13), revelou que, via de regra, a temperatura interna está fortemente relacionada com a atividade locomotora espontânea ($r=0,770$, $p<0,0001$; FIG 11). Contudo, a realização de um protocolo em esteira atenuou esta associação que, por sua vez, foi restaurada no dia subsequente à sua execução ($F_{2,60}=5,060$; $p<0,01$). Essa alteração na relação entre as variáveis foi mais evidente após o EPF (FIG 12, D). Se, por um lado, a inclinação das retas correspondentes a cada dia de análise não foi alterada em nenhum dos casos estudados, por outro, ocorreu um deslocamento para baixo da reta apenas no dia do experimento relativo ao EPF, corroborando a análise de correlação ($p<0,001$ em EPF; $p<0,01$; FIG 12, D). Esse mesmo deslocamento não foi detectado para os grupos Repouso ou exercício submáximo, E40% e E70% (FIG 12, A, B e C, respectivamente). Por sua vez, a ritmicidade da razão $ALE/T_{interna}$ não foi alterada pelo exercício ($F_{3,1439}=0,289$; $p=0,834$), independentemente do dia analisado, ou do quadrante avaliado durante o dia da sessão na esteira (FIG 13).

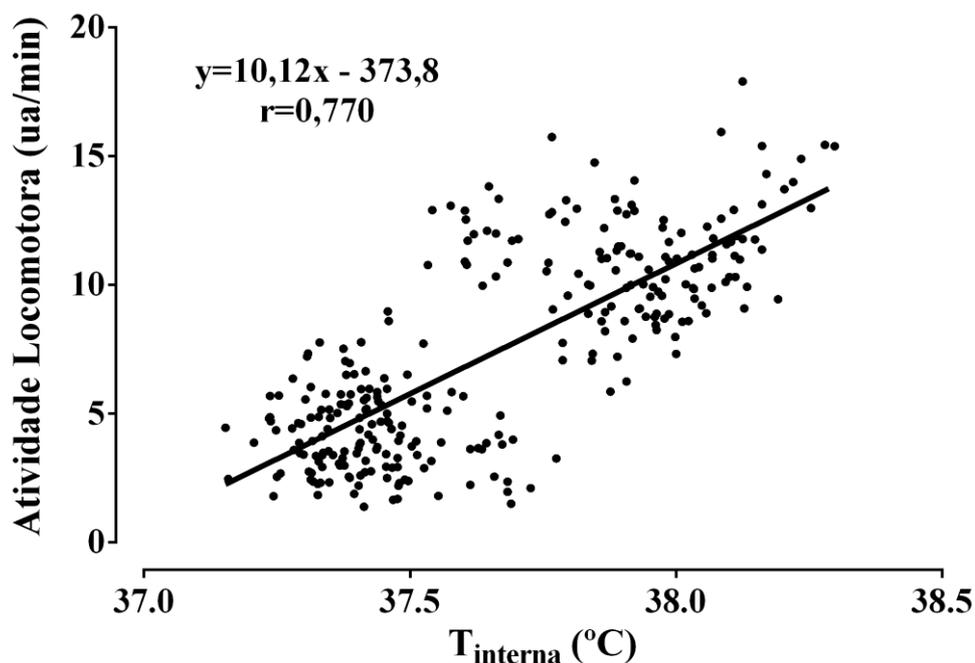


FIGURA 11. Correlação entre temperatura interna e atividade locomotora espontânea ao longo das 72 horas de registro. A associação entre as mudanças da temperatura interna e da atividade locomotora espontânea foram representados em função das médias calculadas para cada hora ao longo das 72 horas de registro para cada situação experimental. A reta de regressão linear, bem como o coeficiente de correlação foram adicionados à figura. Resultados expressos em média \pm epm. $n=6$ /grupo.

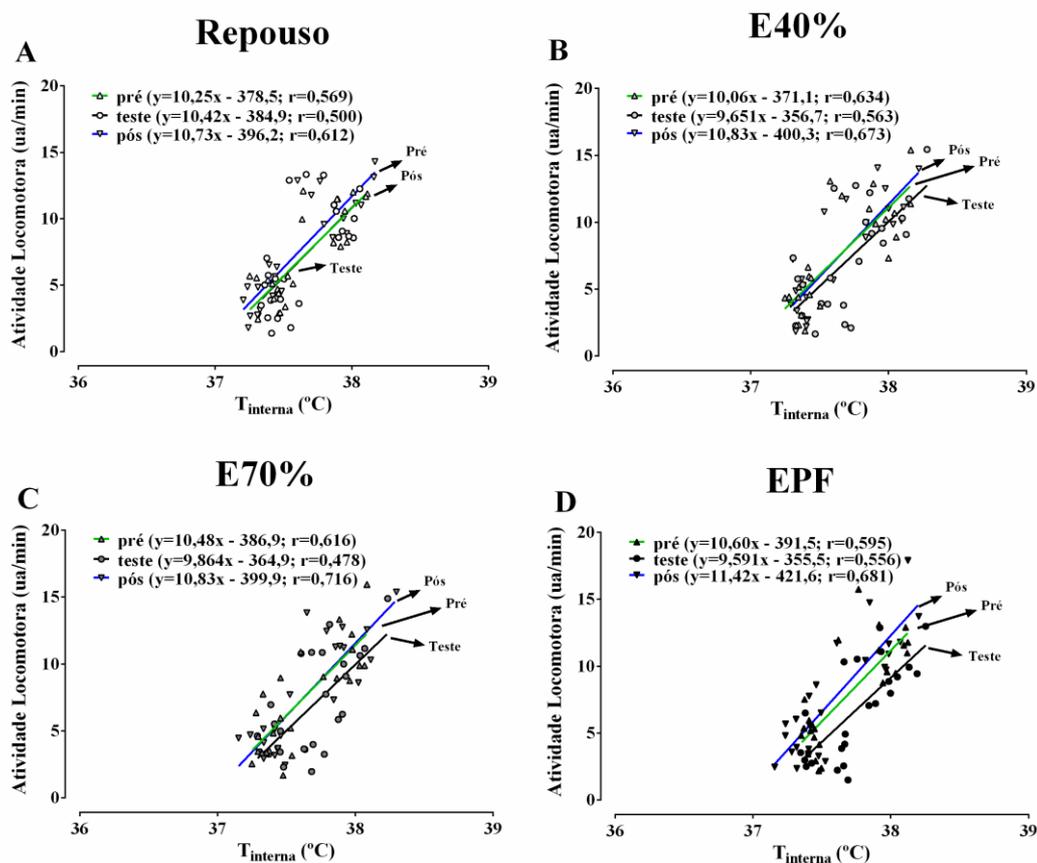


FIGURA 12. Efeito dos diferentes protocolos experimentais nas retas de regressão linear que descrevem a relação entre temperatura interna e atividade locomotora. A associação entre as mudanças da temperatura interna e da atividade locomotora espontânea foram representados em função das médias calculadas para cada dia ao longo das 72 horas de registro correspondentes a cada situação experimental (Repouso – **A**; E40% – **B**; E70% – **C**; e EPF – **D**). As retas de regressão linear, bem como os coeficientes de correlação foram adicionados à figura e apontadas em cada situação experimental para auxiliar a visualização. Resultados expressos em média \pm epm. $n=6$ /grupo.

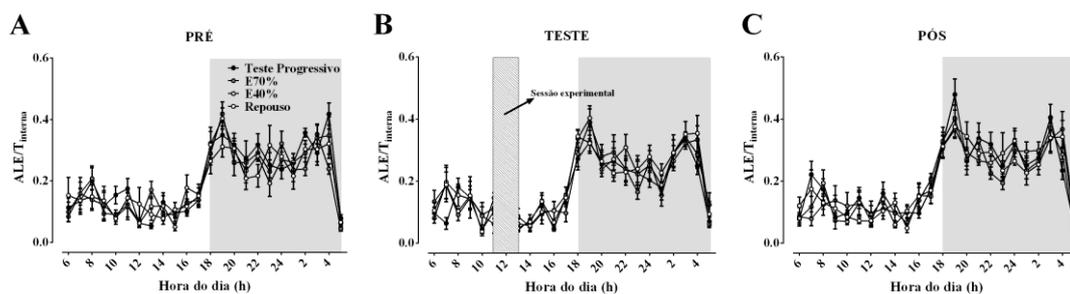


FIGURA 13. Análise da razão entre atividade locomotora espontânea e temperatura interna ao longo dos 3 dias experimentais correspondentes a cada um dos protocolos utilizados (Repouso, E40%, E70% e EPF). A razão entre as mudanças da temperatura interna e da atividade locomotora espontânea foram representados em função das médias calculadas para cada dia – anterior ao da situação experimental (em **A**); dia em que houve situação experimental (em **B**); e posterior à situação experimental (em **C**) – ao longo das 72 horas de registro. As áreas sombreadas em cinza correspondem à fase escura (19:00 às 07:00). As áreas hachuradas correspondem ao período da realização das sessões experimentais (11:00 às 13:00). Resultados expressos em média \pm epm. $n=6$ /grupo.

5.2 Efeito do treinamento físico na variação diária da expressão dos genes do relógio, corticosterona, catecolaminas e do balanço térmico

5.2.1 Caracterização dos componentes da carga de treinamento

Ao término das 8 semanas de treinamento os animais treinados estavam mais leves na oitava semana que os não treinados ($F_{2,9}=7,001$; $p<0,05$; T:323,6 ± 9,3g e NT:344,4 ± 9,1g; Nãive: 373,8 ± 9,7g). O início da dissociação do ganho de peso entre não treinados e treinados ocorreu após a sexta semana de treinamento (FIG 14).

A carga de treinamento utilizada no presente protocolo caracterizou-se por aumentos progressivos na velocidade de corrida (FIG 15, A e D) acompanhados por aumentos regulares na duração das sessões (FIG 15, B e E) ao longo das 4 primeiras semanas, com a subsequente estabilização em 60 minutos nas 4 semanas finais do protocolo de treinamento. Dessa modulação da relação entre intensidade e volume da carga resultou um aumento progressivo da carga de treinamento por sessão, estimado através do cálculo do trabalho (FIG 15, C e F).

O protocolo de treinamento foi utilizado em 31 animais, sendo que 28 animais completaram as 8 semanas (aproximadamente 90%). Dos 3 animais retirados do experimento, 2 animais não aderiram à atividade e 1 animal foi encontrado morto na caixa durante a primeira semana de treinamento. Nos animais não treinados, 21 de um total de 28 animais completaram as 8 semanas de protocolo (aproximadamente 75%). Dos 5 animais retirados do experimento, 2 tornaram-se refratários à corrida em esteira após o primeiro teste progressivo, 1 animal foi encontrado morto na caixa e 2 animais não realizaram o último teste progressivo na oitava semana.

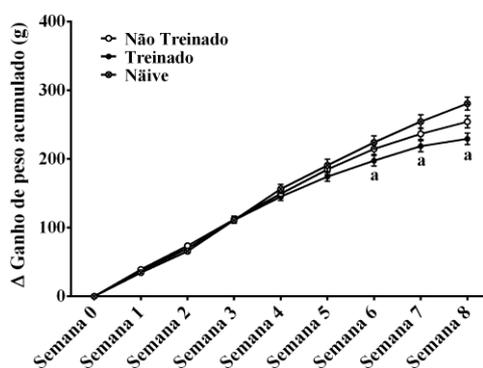


FIGURA 14. Efeito de 8 semanas de treinamento físico no ganho de peso corporal. A massa corporal dos animais dos grupos treinado e não treinado foi registrada ao longo do processo de treinamento no início de cada semana. *a* $p<0,05$ para comparações com o grupo Repouso. Resultados expressos em média ± epm; $n=26-28$ /grupo.

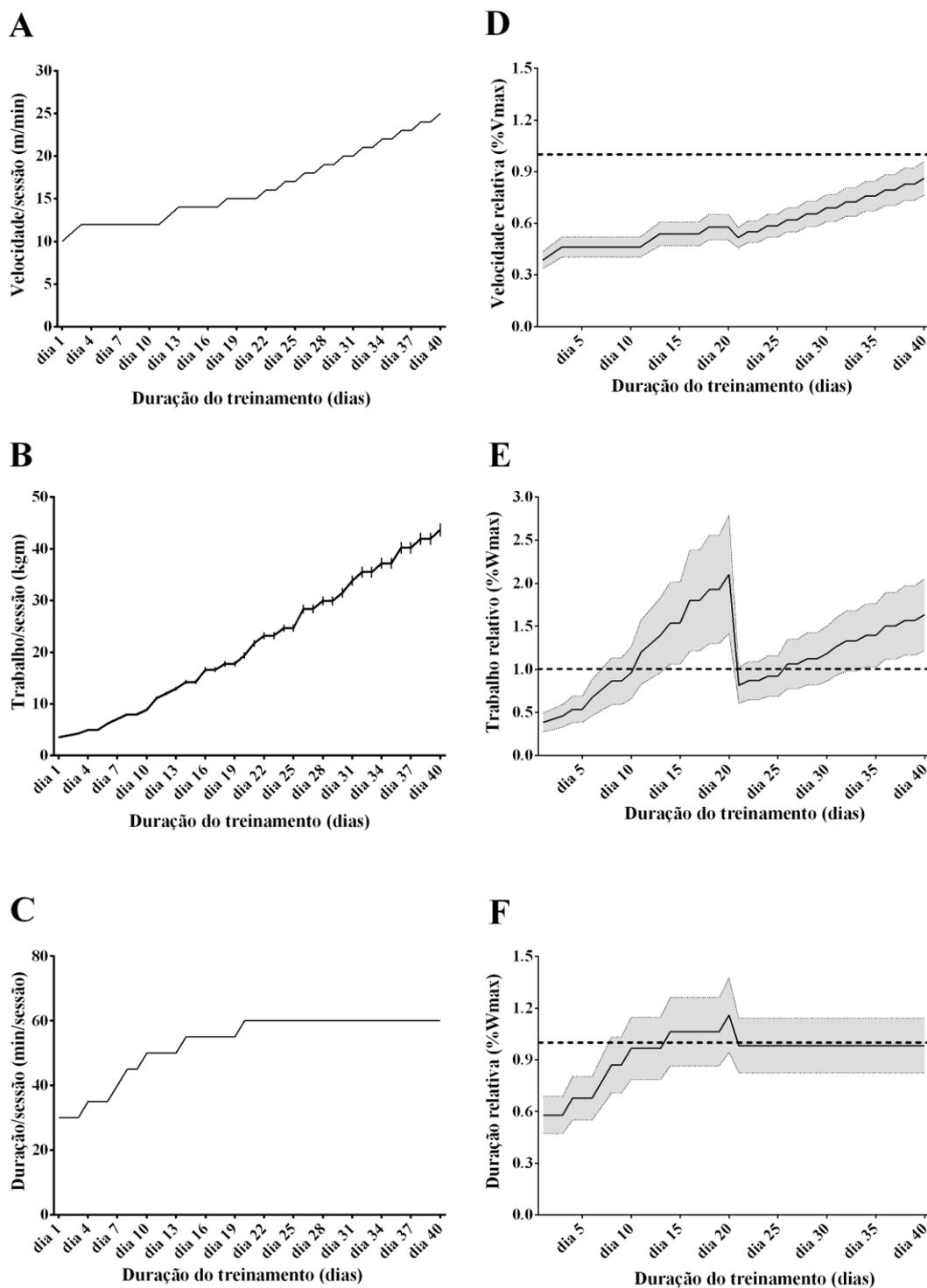


FIGURA 15. Caracterização da carga de treinamento utilizada durante as sessões de treinamento físico ao longo do período experimental (8 semanas). Velocidade de corrida (A e D), trabalho realizado (B e E) e duração da atividade (C e F) foram representados em termos absolutos (A, B, e C) e relativizados pela capacidade máxima (D, E, e F). Os animais do grupo treinado foram submetidos a 5 sessões semanais de treinamento com duração entre 30 e 60 minutos por 8 semanas. Durante os finais de semana os animais não treinavam. Todas as sessões ocorreram entre 11:00 e 13:00. Testes de capacidade máxima foram realizados antes do início do treinamento, ao final da 4ª e da 8ª semana. Os testes pré-treinamento e ao final da 4ª semana de treinamento foram utilizados para o cálculo da carga de trabalho relativa. Resultados expressos em média \pm epm; $n=26-28$.

5.2.2 Efeito do treinamento físico no desempenho e no balanço térmico durante o exercício

Ao longo das 8 semanas de treinamento de corrida em esteira, os animais apresentaram aumentos progressivos no rendimento físico (FIG 16). Tais adaptações positivas no desempenho foram detectadas já na quarta semana de treinamento em termos de velocidade máxima alcançada no teste progressivo ($F_{1,139}=62,07$; $p<0,0001$; FIG 16, A) e de carga de trabalho realizado ($F_{1,139}=67,99$; $p<0,0001$ FIG 16, B).

Além do aumento de desempenho ($p<0,0001$), o treinamento físico atenuou a hipertermia induzida pelo exercício ($F_{1,194}=67,77$; $p<0,0001$ FIG 17, A) em decorrência da redução na taxa de aquecimento corporal calculada para cada estágio do teste ($F_{1,194}=7,007$; $p<0,01$ FIG 17, B). Por sua vez, a temperatura da pele da cauda foi similar nos animais treinados e não treinados ($F_{1,207}=3,366$; $p=0,068$ FIG 17, C), apesar de uma antecipação da máxima taxa de vasodilatação da cauda (efeito do tempo de exercício: $F_{14,207}=9,113$; $p<0,0001$; FIG 17, D). No momento da interrupção do esforço, tanto temperatura interna quanto temperatura da pele da cauda foram similares nos grupos NT e T.

Em conjunto, essas observações confirmaram a eficiência do programa de 8 semanas de treinamento de corrida em esteira no aprimoramento do desempenho físico por meio do aumento da capacidade termorregulatória, verificada pela menor taxa de aquecimento corporal em resposta ao maior trabalho realizado.

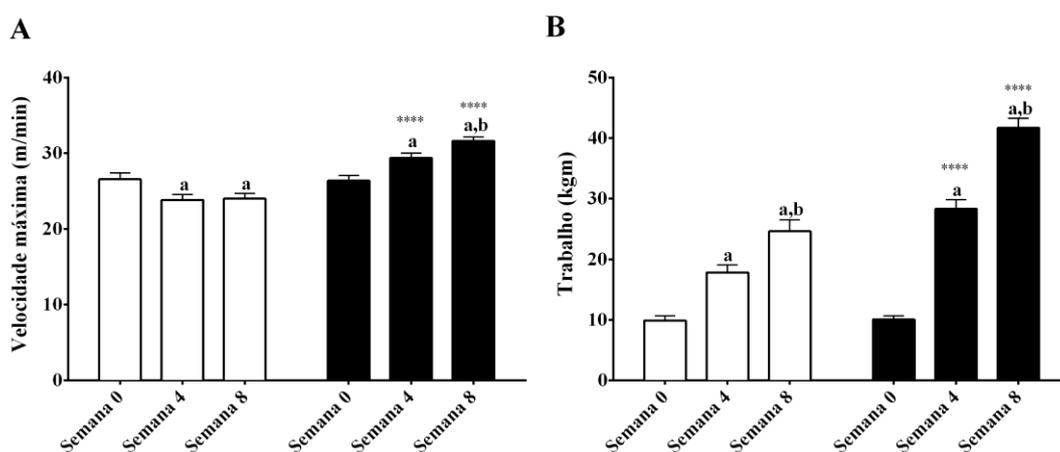


FIGURA 16. Efeito de 8 semanas de treinamento físico no desempenho físico em testes de exercício progressivo até a fadiga. A capacidade máxima foi aferida em 3 momentos do processo de treinamento através de testes de intensidade progressiva até a fadiga: na semana anterior ao início, ao final da quarta semana e ao final da oitava semana de treinamento. A velocidade máxima (m/min; em **A**) e o trabalho total realizado (kgm; em **B**) foram determinados para os animais não treinados (barras brancas) e treinados (barras pretas). *a* indica $p<0,05$ para comparações com a semana 0; *b* indica $p<0,05$ para comparações com a semana 4; **** indica $p<0,0001$ para comparações entre grupos. Resultados expressos em média \pm epm; $n=26-28$ /grupo.

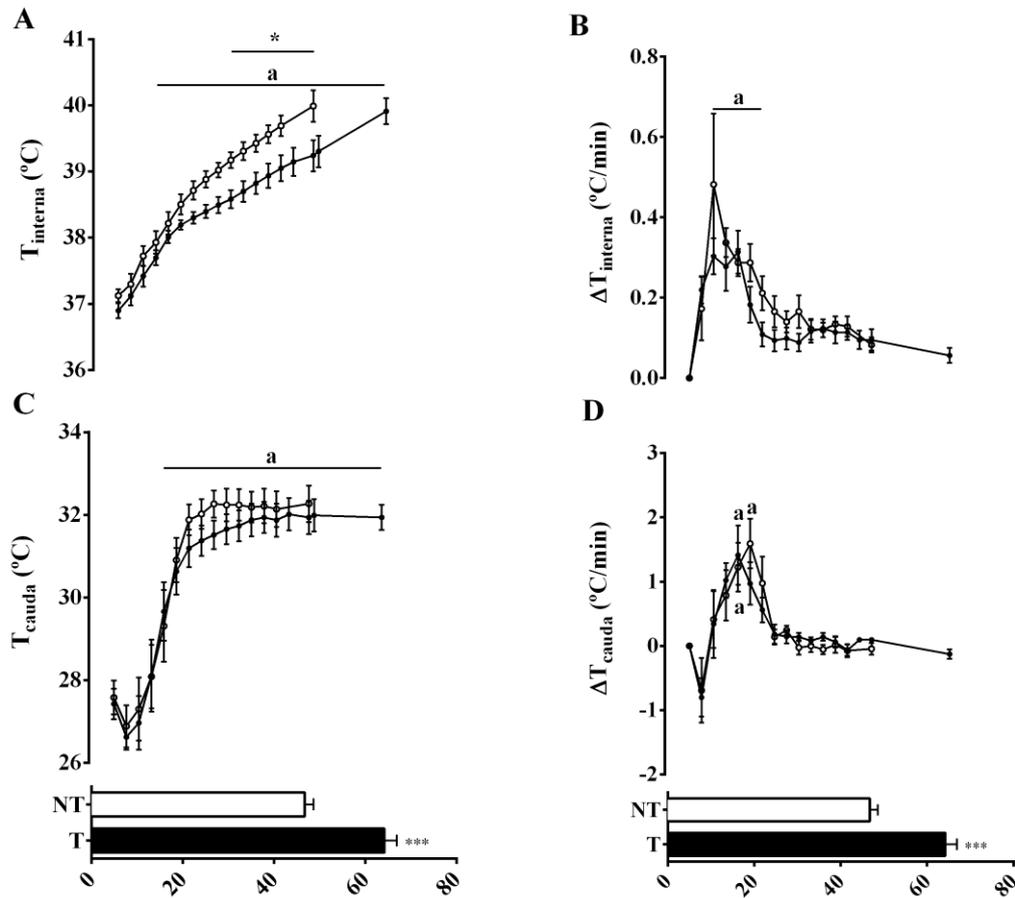


FIGURA 17. Efeito de 8 semanas de treinamento físico no balanço térmico durante o teste de exercício progressivo realizado ao término da última de semana de treinamento. A variação da temperatura interna ($^{\circ}\text{C}$; em **A**), da taxa de aquecimento corporal ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$; em **B**), da temperatura da pele da cauda ($^{\circ}\text{C}$; em **C**) e da taxa de variação da temperatura da pele da cauda ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$; em **D**) foram determinados para os animais não treinados (círculos brancos) e treinados (círculos pretos) e expressos em função do tempo de exercício. *a* indica $p < 0,05$ para comparações com o início do exercício; * indica $p < 0,0001$ para comparações entre grupos. Resultados expressos em média \pm epm; $n=7-8/\text{grupo}$.

5.2.3 Efeito do treinamento físico no balanço térmico circadiano

Ao longo dos 7 dias de monitoramento contínuo da temperatura interna e da atividade locomotora, observou-se episódios de hipertermia (FIG 18) sustentada após as sessões de treinamento e também após o teste progressivo (FIG 19 e 20).

Os episódios de hipertermia detectáveis na análise temporal diária de temperatura interna foram quantificados e relacionados com o índice de dissipação cutânea nos instantes pré e pós sessões de treinamento (FIG 18). As sessões de exercício físico durante a 8ª semana de treinamento induziram aumentos de temperatura interna de $2,02 \pm 0,15 \text{ }^\circ\text{C}$ ($F_{1,67}=353,3$, $p<0,0001$; FIG 18, A) acompanhadas por aumentos na temperatura da pele da cauda de $2,30 \pm 0,09 \text{ }^\circ\text{C}$ ($F_{1,67}=41,67$, $p<0,0001$; FIG 18, B) e do IDC ($F_{1,64}=10,20$, $p<0,01$; FIG 18, C). Interessante notar ainda um aumento na temperatura da pele da cauda imediatamente antes do início das sessões de exercício ($p<0,05$), sugerindo um processo de antecipação ao início do esforço (FIG 18, B).

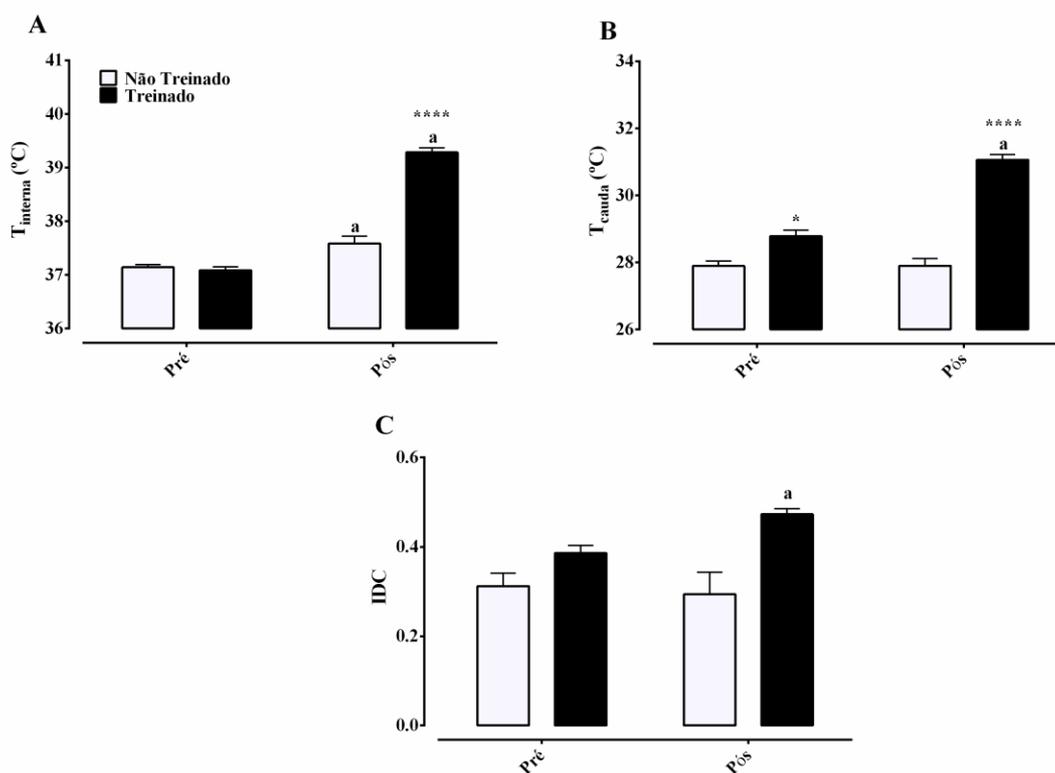


FIGURA 18. Efeitos do treinamento e das sessões de treinamento nos valores de temperatura interna, da pele da cauda e do índice de dissipação cutânea (IDC) pré e pós sessão de treinamento na 8ª semana. A temperatura interna ($^\circ\text{C}$, em A) e a temperatura da pele da cauda ($^\circ\text{C}$, em B) foram registradas imediatamente antes (Pré) e após (Pós) cada sessão de treinamento. O IDC (em C) foi calculado através da fórmula $(T_{\text{cauda}} - T_{\text{ambiente}})/(T_{\text{interna}} - T_{\text{ambiente}})$. a indica $p<0,05$ para comparações com o início do exercício; * indica $p<0,05$ para comparações entre grupos. Resultados expressos em média \pm epm; $n=7-8/\text{grupo}$.

O fenômeno observado não resultou em alterações temporais diárias na temperatura interna ($F_{1,2281}=1,245$, $p=0,265$; FIG 19, A e B; FIG 20, A). Por outro lado, ao longo dos 7 dias de registro, o treinamento físico aumentou a atividade locomotora espontânea média ($NT=6,97 \pm 0,29$ ua/min e $T=8,18 \pm 0,32$ ua/min; $F_{1,2236}=28,88$, $p<0,0001$; FIG 19, C e D; FIG 20, B). Tendo em vista a própria atividade em esteira resultante das sessões de treinamento, essa análise contém um forte viés intrínseco, prejudicando a interpretação dos resultados. Dessa forma, ao se excluir os horários correspondentes às sessões de treinamento/teste progressivo da análise, o efeito do treinamento observado anteriormente foi acentuado ($F_{1,2112}=52,34$, $p<0,0001$; FIG 20, B).

Nos dias correspondentes à realização das sessões de treinamento durante a 8ª semana de treinamento, as variações diárias de temperatura interna ($F_{120, 1573}=22, 72$, $p<0,0001$) e atividade locomotora espontânea ($F_{120, 1573}=5,73$, $p<0,0001$) foram mantidas (FIG 21, A e B). Além disso, também se observou o aumento da atividade locomotora espontânea induzido pelo treinamento ($F_{1, 1573}=27,46$, $p<0,0001$; FIG 21, C e D). Tal efeito concentrou-se na fase escura do ciclo (FIG 21, B), independentemente de alterações na temperatura interna na fase correspondente (FIG 21, A).

Após o teste progressivo realizado ao término da 8ª semana de treinamento, observou-se que a queda na temperatura interna durante a recuperação foi acentuada pelo treinamento ocorrendo imediatamente após o término do exercício nos treinados e apenas após 3 horas nos animais não treinados ($F_{47, 624}=19,45$, $p<0,0001$; FIG 22, A), caracterizando uma possível adaptação positiva do sistema de controle de temperatura interna. Além disso, houve também uma atenuação do efeito do treinamento sobre a atividade locomotora espontânea após a realização do exercício progressivo ($F_{1, 624}=7,731$; $p<0,01$; FIG 22, B).

No último dia de registro, quando não houve atividades na esteira, foi novamente observado o aumento na atividade locomotora espontânea ($F_{1,312}=7,032$; $p<0,01$; FIG 23, B). Por outro lado, a variação diária de temperatura interna não foi afetada pelo treinamento no último dia de monitoramento ($F_{1,312}=0,017$; $p=0,896$; FIG 23, A).

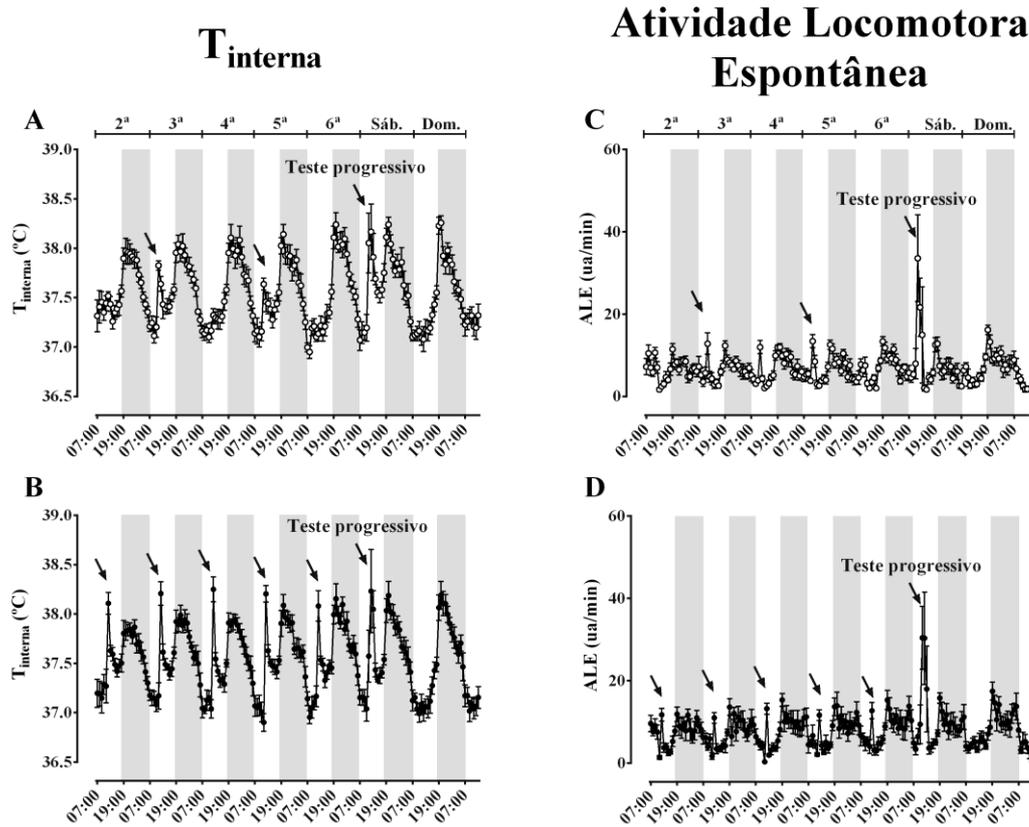


FIGURA 19. Caracterização dos efeitos das sessões de treinamento durante a 8^a semana experimental nas variações diárias de temperatura interna e atividade locomotora espontânea (ALE). O efeito do treinamento na temperatura interna (**A** e **B**) e da atividade locomotora espontânea (**C** e **D**) ao longo da oitava semana de protocolo foi representado para a sequência dos dias da semana. As setas representam atividade na esteira: sessões de treinamento nos animais treinados (**B** e **D**), ou sessões de familiarização nos animais não treinados (**A** e **C**). As áreas sombreadas em cinza correspondem à fase escura (19:00 às 07:00). Resultados expressos em média \pm epm. * indica $p < 0,05$ para comparações entre grupos. $n = 7-8/\text{grupo}$.

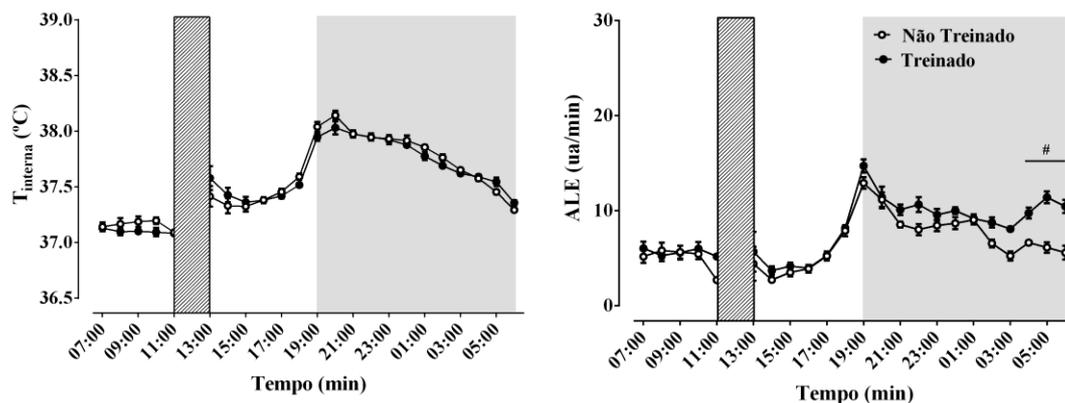


FIGURA 20. Caracterização dos efeitos das sessões de treinamento durante a 8ª semana experimental nas variações diárias de temperatura interna e atividade locomotora espontânea (ALE). O efeito do treinamento na temperatura interna (A) e da atividade locomotora espontânea (B) ao longo da oitava semana de protocolo foi representado para a média do período de registro, após se excluir os valores correspondentes às sessões de atividade em esteira. As setas representam atividade na esteira: sessões de treinamento nos animais treinados, ou sessões de familiarização nos animais não treinados. As áreas sombreadas em cinza correspondem à fase escura (19:00 às 07:00). As áreas hachuradas correspondem ao período da realização das sessões de atividade na esteira (11:00 às 13:00). Resultados expressos em média \pm epm. * indica $p < 0,05$ para comparações entre grupos. $n=7-8$ /grupo.

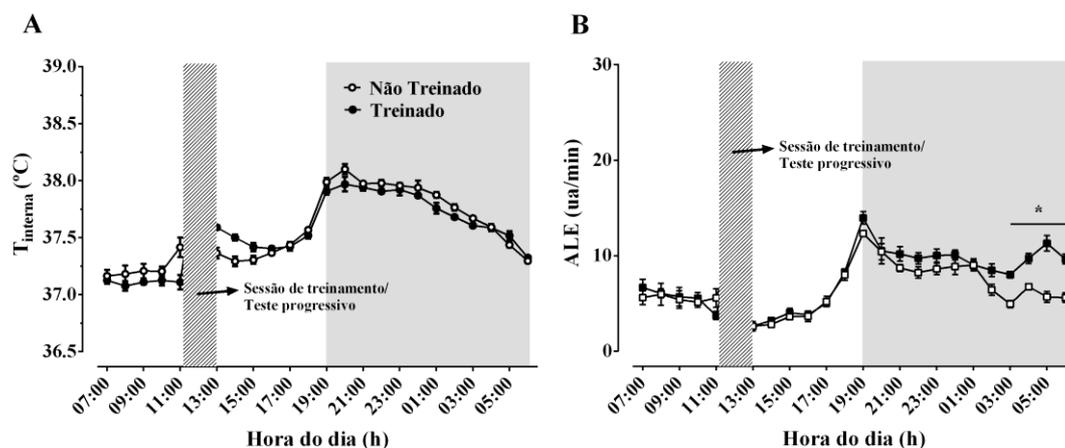


FIGURA 21. Efeito médio dos 5 dias de sessões de treinamento na temperatura interna e na atividade locomotora espontânea durante a 8ª semana experimental. O efeito do treinamento na temperatura interna (A) e na atividade locomotora espontânea (B) foi representado para a média dos 5 dias com sessões de treinamento, após se excluir os valores correspondentes às sessões de atividade em esteira. As áreas sombreadas em cinza correspondem à fase escura (19:00 às 07:00). As áreas hachuradas correspondem ao período da realização das sessões de atividade na esteira (11:00 às 13:00). Resultados expressos em média \pm epm. * indica $p < 0,05$ para comparações entre grupos. $n=7-8$ /grupo.

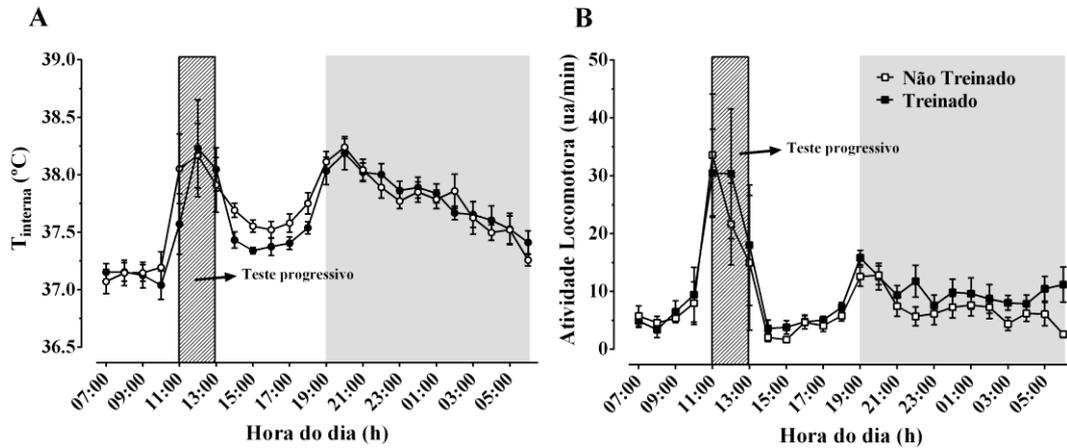


FIGURA 22. Efeito do último teste de exercício progressivo até a fadiga na temperatura interna e na atividade locomotora espontânea durante a 8ª semana experimental. O efeito do treinamento na temperatura interna (**A**) e na atividade locomotora espontânea (**B**) foi representado para o dia do teste progressivo, após se excluir os valores correspondentes às sessões de atividade em esteira para a análise. As áreas sombreadas em cinza correspondem à fase escura (19:00 às 07:00). As áreas hachuradas correspondem ao período da realização das sessões de atividade na esteira (11:00 às 13:00). Resultados expressos em média \pm epm. $n=7-8$ /grupo.

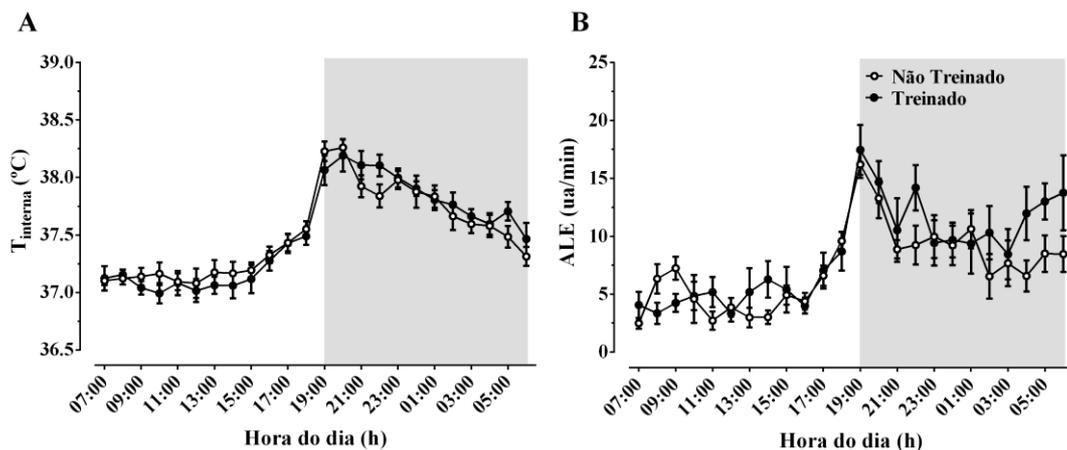


FIGURA 23. Efeito do treinamento físico na variação diária basal da temperatura interna e da atividade locomotora espontânea durante a 8ª semana experimental. O efeito do treinamento na temperatura interna (**A**) e na atividade locomotora espontânea (**B**) foi representado para o dia sem atividade na esteira. As áreas sombreadas em cinza correspondem à fase escura (19:00 às 07:00). Resultados expressos em média \pm epm. * indica $p<0,05$ para comparações entre grupos. $n=7-8$ /grupo.

A avaliação da relação entre $ALE/T_{interna}$ (FIG 23) ao longo da oitava semana de treinamento revelou que o padrão rítmico da relação entre as duas variáveis ($F_{23, 264}=25,86$, $p<0,0001$) foi alterado pelo treinamento de 8 semanas ($F_{1, 264}=33,35$, $p<0,0001$) através de um aumento no “custo locomotor” durante os momentos finais da fase escura, possivelmente para manter a estabilidade da oscilações diárias da temperatura interna.

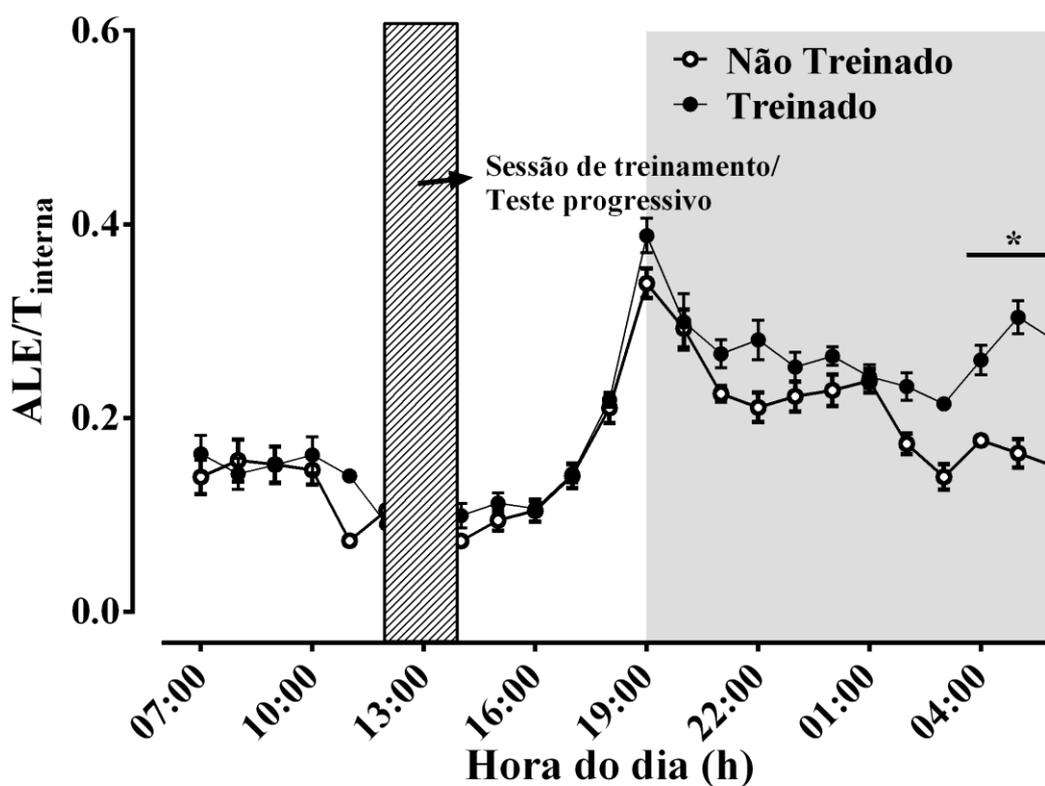


FIGURA 24. Efeito do treinamento físico na razão entre atividade locomotora espontânea e temperatura interna ao longo da última semana experimental. O efeito do treinamento na razão entre a atividade locomotora espontânea e a temperatura interna foi representado para a média dos 7 dias de registro, após se excluir os valores correspondentes às sessões de atividade em esteira para a análise. As áreas sombreadas em cinza correspondem à fase escura (19:00 às 07:00). As áreas hachuradas correspondem ao período da realização das sessões de atividade na esteira (11:00 às 13:00). Resultados expressos em média \pm epm. * indica $p<0,05$ para comparações entre grupos. $n=7-8$ /grupo.

A dissociação relativa entre atividade locomotora espontânea e temperatura interna, as alterações ocorreram independentemente de mudanças no padrão alimentar (FIG. 25). Os hábitos noturnos de alimentação não foram afetados pela prática regular de exercício de corrida em esteira durante a fase de repouso (efeito da fase do dia; $F_{1,16}=1357$, $p<0,0001$; efeito do treinamento: $F_{1,16}=2,074$, $p=0,169$). O mesmo foi observado para os hábitos de ingestão hídrica (efeito da fase do dia; $F_{1,8}=440,5$, $p<0,0001$; efeito do treinamento: $F_{1,8}=0,001$, $p=0,970$).

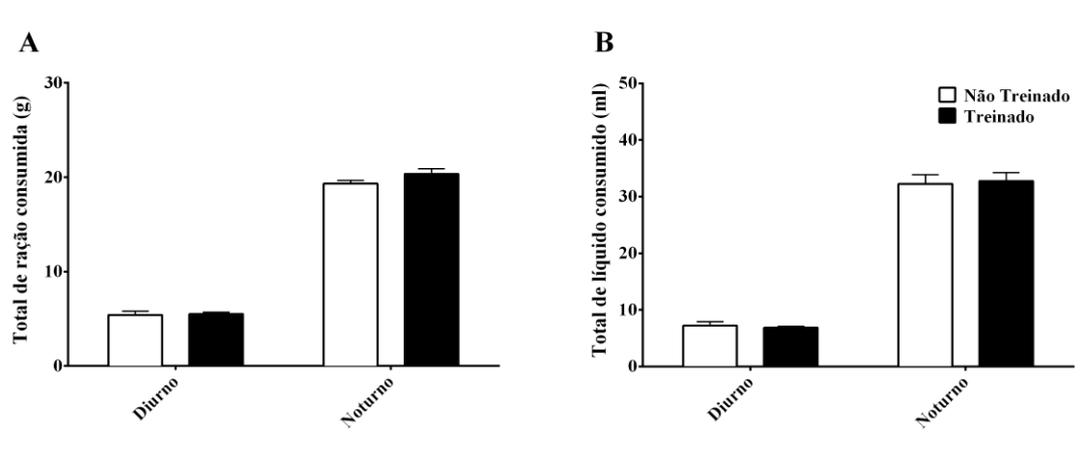


FIGURA 25. Efeito do treinamento físico no padrão diário de ingestão alimentar e hídrica durante a 8ª semana de treinamento. A ingestão alimentar média (A) e a ingestão hídrica média (B) durante 5 dias consecutivos ao longo da 8ª semana de treinamento foram apresentadas em função da média \pm epm, para animais treinados (Barras pretas) e não treinados (Barras brancas). A quantidade de alimento ingerido foi calculada com base na diferença entre os valores medidos no início da fase clara e no final da fase escura. * indica $p<0,05$ para comparações entre grupos. $n=7-8$ /grupo.

5.2.4 Efeito do treinamento físico na variação diária dos níveis plasmáticos de corticosterona

A variação diária nos níveis de corticosterona plasmática ($F_{4,39}=8,115$, $p<0,0001$; FIG 26) não foi afetada pelo treinamento ($F_{4,39}=0,731$, $p=0,398$). Os menores valores de corticosterona plasmática foram encontrados no ZT 4 (11:00) enquanto os maiores valores foram observados após a mudança de fase, no ZT 12 (19:00).

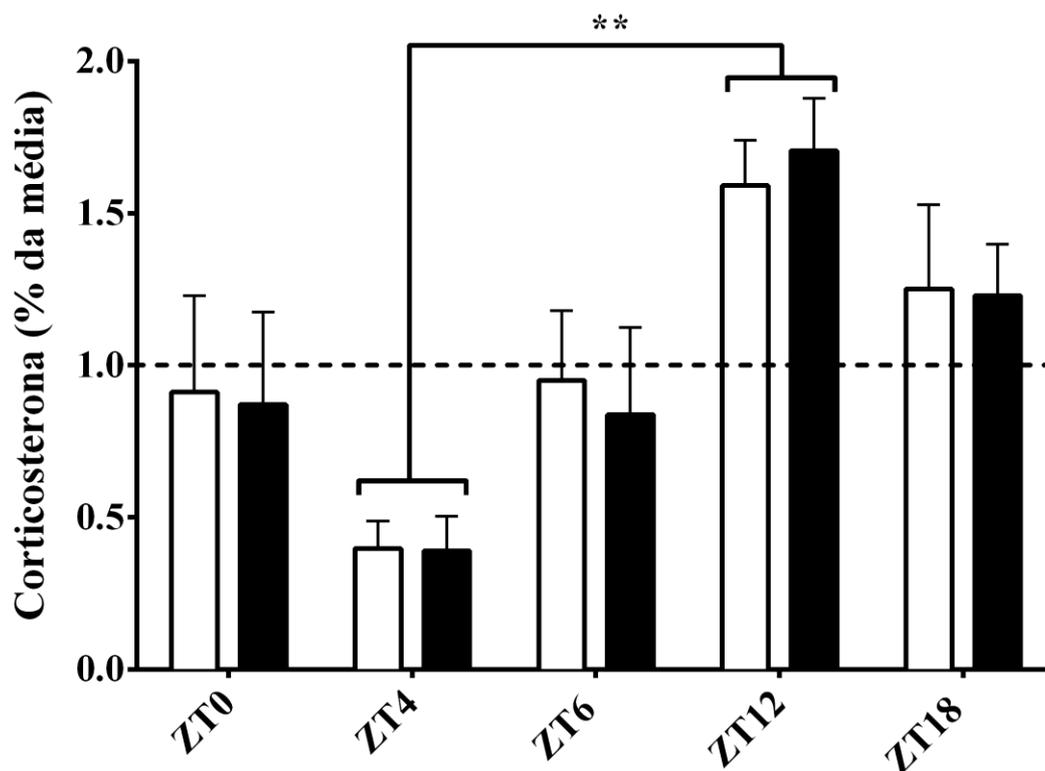


FIGURA 26. Efeito do treinamento físico na variação diária de corticosterona plasmática após, no mínimo, 48 horas o último teste progressivo. Após o teste máximo realizado no sexto dia da 8ª semana de treinamento, os animais foram sacrificados em 5 momentos do dia: ZT0 (07:00 – luzes acesas), ZT4 (11:00 – horário usual do início do exercício regular), ZT6 (13:00), ZT 12 (19:00 – luzes apagadas) e ZT18 (01:00). A linha pontilhada representa a média diária da população avaliada. Resultados expressos em média \pm epm. * indica $p<0,05$ para comparações entre grupos. $n=4-5/\text{grupo/ZT}$.

5.2.5 Efeito do treinamento físico na variação diária da expressão dos genes do relógio no músculo esquelético

Observou-se um efeito do treinamento na transcrição de PER1 através da alteração da ritmicidade da expressão do gene especialmente durante a transição do escuro para o claro.

A expressão do gene PER1 no músculo gastrocnêmio (FIG 27, A) não mostrou a variação diária característica, com nadir em ZT0 (07:00) e pico em ZT12 (19:00), após 8 semanas de treinamento de corrida (ANOVA *one way* – fator tempo; NT: $F_{4,15}=3,347$, $p<0,05$; T: $F_{4,14}=2,34$, $p=0,106$). A análise de variância em relação à interação entre os efeitos do treinamento e do horário do dia (ANOVA *two-way*) não detectou um efeito claro desses dois fatores (TreinamentoXhorário do dia: $F_{4,29}=2,494$, $p=0,065$). Interessante notar que, no momento da mudança de fase (escuro – claro), ocorreu um pico de transcrição de PER1 nos animais treinados (múltiplos testes *t*, $p<0,05$). Por sua vez, além de não apresentar um perfil oscilatório bem definido (NT: $F_{4,15}=1,944$, $p=0,155$; T: $F_{4,14}=0,554$, $p=0,699$) a expressão do gene BMAL1 (FIG 27, B) não foi afetada pelo treinamento em nenhum momento do dia.

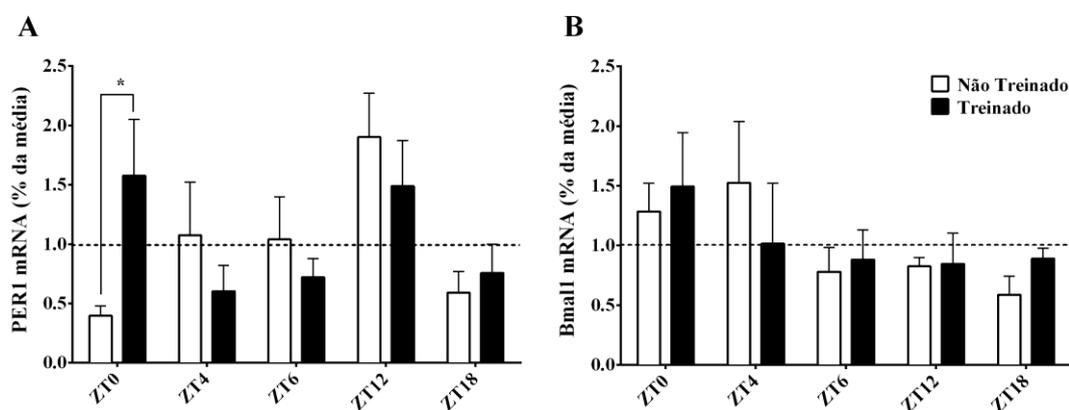


FIGURA 27. Efeito do treinamento físico na variação diária da expressão dos genes do relógio PER1 (A) e BMAL1 (B) no músculo gastrocnêmio. Após o teste máximo realizado no sexto dia da 8ª semana de treinamento, os animais foram sacrificados em 5 momentos do dia: ZT0 (07:00 – luzes acesas), ZT4 (11:00 – horário usual do início do exercício regular), ZT6 (13:00), ZT 12 (19:00 – luzes apagadas) e ZT18 (01:00). A linha pontilhada representa a média diária da população avaliada. Resultados expressos em média \pm epm; * indica $p<0,05$ para comparações entre grupos. n=4-5/grupo/ZT.

5.2.6 Efeito do treinamento físico na variação diária de atividade monoaminérgica no sistema nervoso central

Striatum/caudado putamen. Observou-se um alto nível de dopamina (DA) e seu metabólito (DOPAC) (FIG 28, A e B, respectivamente). O treinamento físico aumentou a taxa de renovação dopaminérgica (DOPAC/DA; $F_{1,33}=60,50$, $p<0,0001$; FIG. 28, C) e mostrou uma oscilação diária no grupo T ($F_{4,17}=3,331$, $p<0,05$), mas não no grupo NT ($F_{4,16}=0,841$, $p=0,519$). Os níveis de serotonina (5-HT) e seu metabólito (5HIAA), bem como a taxa de renovação serotoninérgica (5HIAA/5-HT) (FIG 28, D a F), ao contrário do sistema dopaminérgico, não apresentaram variação diária ou efeito do treinamento. Interessante notar que os níveis de noradrenalina (NORA) detectados foram muito baixos (sendo detectados em apenas 9 de um total de 44 amostras), apesar de maiores nos animais treinados ($F_{1,45}=7,640$, $p<0,01$; FIG 31, A).

Área pré-óptica. O treinamento físico aumentou a quantidade de NORA (FIG 31, B) na região ($F_{1,39}=7,048$, $p<0,05$), sobretudo no ZT4 (11:00) e ZT12 (19:00). Em contraposição ao observado para a NORA, o treinamento atenuou tanto a atividade dopaminérgica quanto a serotoninérgica (DOPAC/DA: $F_{1,39}=5,658$, $p<0,05$; FIG 29, C; 5HIAA/5-HT: $F_{1,39}=4,357$, $p<0,05$; FIG 29, F), sendo tal efeito acentuado no ZT6 ($p<0,05$).

Núcleo paraventricular do hipotálamo. Os níveis absolutos de DA, DOPAC, 5-HT, 5HIAA (FIG 30, A, B, D e E, respectivamente) e NORA (FIG 31, C) foram pouco afetados pelo treinamento físico. Entretanto, a razão 5HIAA/5-HT (FIG 30, F) apresentou uma interação entre horário e treinamento ($F_{4,40}=2,649$, $p<0,05$), com diferenças marcantes ($p<0,05$) entre os grupos nos momentos de mudança de fase (ZT0 e ZT12). Por sua vez, a razão DOPAC/DA (FIG 30, C) foi atenuada pelo treinamento no ZT12 ($p<0,01$).

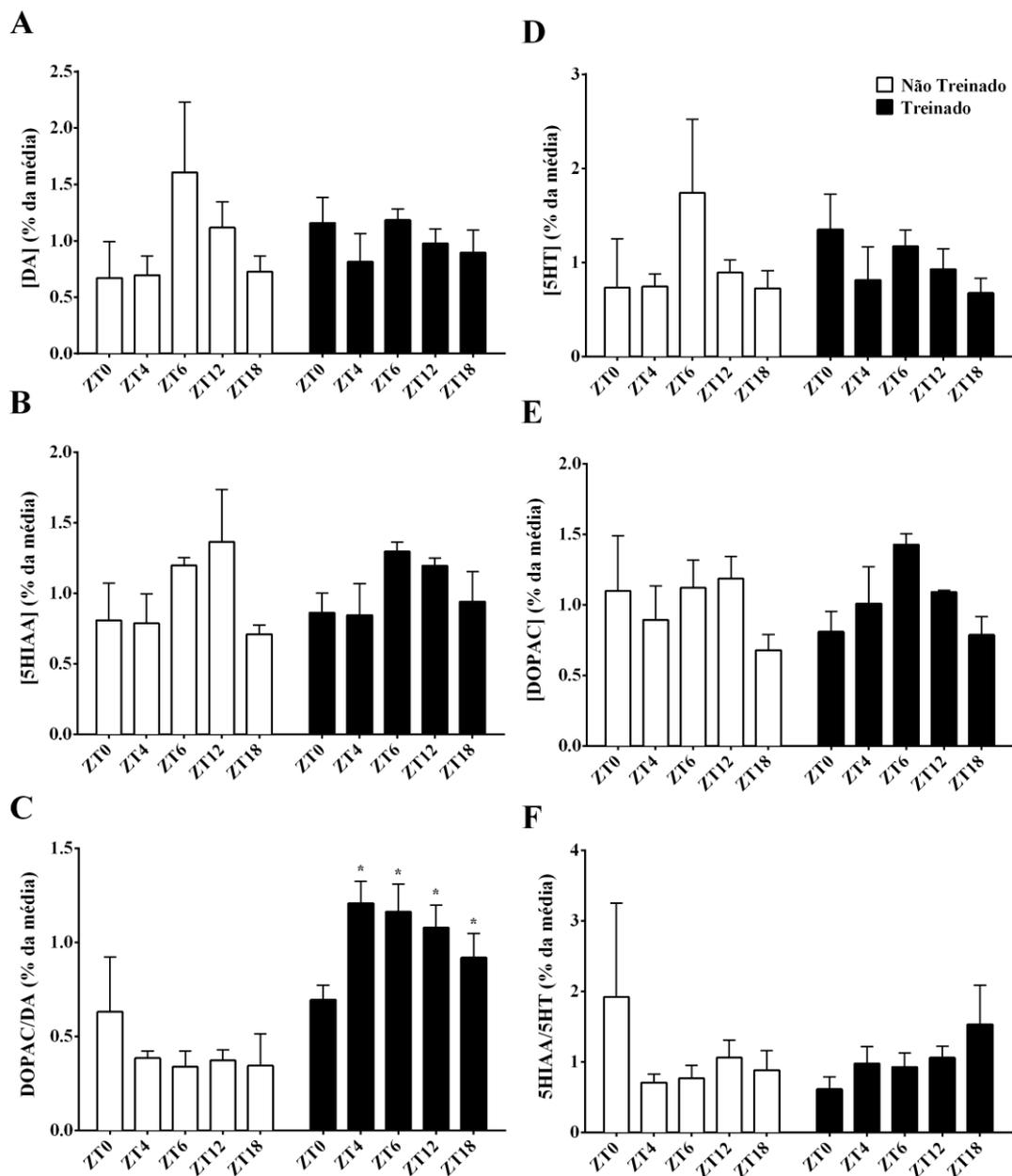


FIGURA 28. Efeito do treinamento físico na variação diária de atividade monoaminérgica no *striatum/caudado putamen*. DA (A), DOPAC (B), DOPAC/DA (C), 5-HT (D), 5HIAA (E) e 5HIAA/5-HT (F) foram relativizadas pela média de cada grupo. Após o teste máximo realizado no sexto dia da 8ª semana de treinamento, os animais foram sacrificados em 5 momentos do dia: ZT0 (07:00 – luzes acesas), ZT4 (11:00 – horário usual do início do exercício regular), ZT6 (13:00), ZT 12 (19:00 – luzes apagadas) e ZT18 (01:00). Resultados expressos em média \pm epm; * indica $p < 0,05$ para comparações entre grupos no mesmo ZT. $n=3-5$ /grupo/ZT.

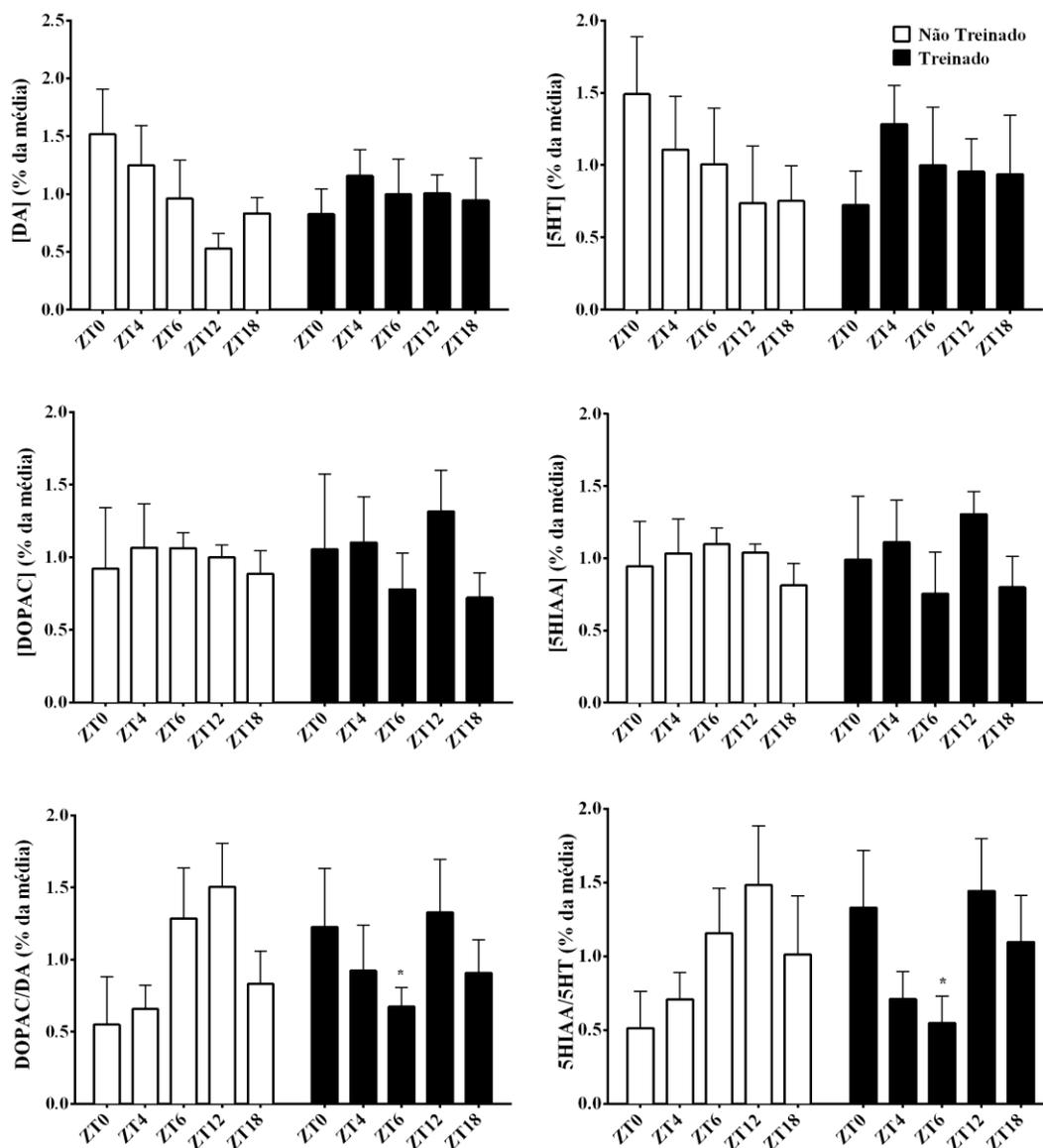


FIGURA 29. Efeito do treinamento físico na variação diária de atividade monoaminérgica na área pré-óptica (POA). DA (A), DOPAC (B), DOPAC/DA (C), 5-HT (D), 5HIAA (E) e 5HIAA/5-HT (F) foram relativizadas pela média de cada grupo. Após o teste máximo realizado no sexto dia da 8ª semana de treinamento, os animais foram sacrificados em 5 momentos do dia: ZT0 (07:00 – luzes acesas), ZT4 (11:00 – horário usual do início do exercício regular), ZT6 (13:00), ZT 12 (19:00 – luzes apagadas) e ZT18 (01:00). Resultados expressos em média \pm epm; * indica $p < 0,05$ para comparações entre grupos no mesmo ZT. $n=3-5$ /grupo/ZT.

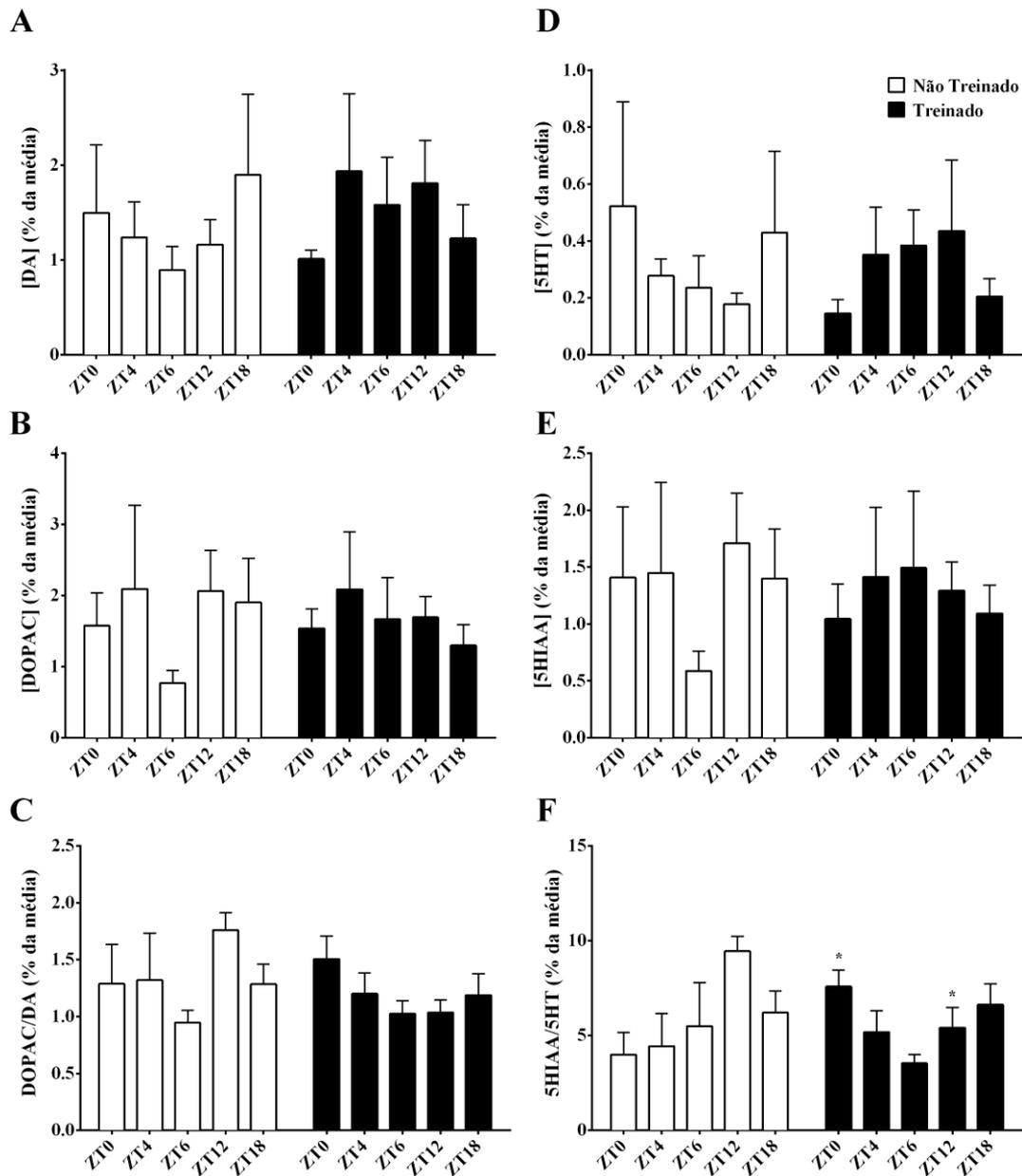


FIGURA 30. Efeito do treinamento físico na variação diária de atividade monoaminérgica no núcleo paraventricular do hipotálamo. DA (A), DOPAC (B), DOPAC/DA (C), 5-HT (D), 5HIAA (E) e 5HIAA/5-HT (F) foram relativizadas pela média de cada grupo. Após o teste máximo realizado no sexto dia da 8ª semana de treinamento, os animais foram sacrificados em 5 momentos do dia: ZT0 (07:00 – luzes acesas), ZT4 (11:00 – horário usual do início do exercício regular), ZT6 (13:00), ZT 12 (19:00 – luzes apagadas) e ZT18 (01:00). Resultados expressos em média \pm epm; * indica $p < 0,05$ para comparações entre grupos no mesmo ZT. $n=3-5/\text{grupo/ZT}$.

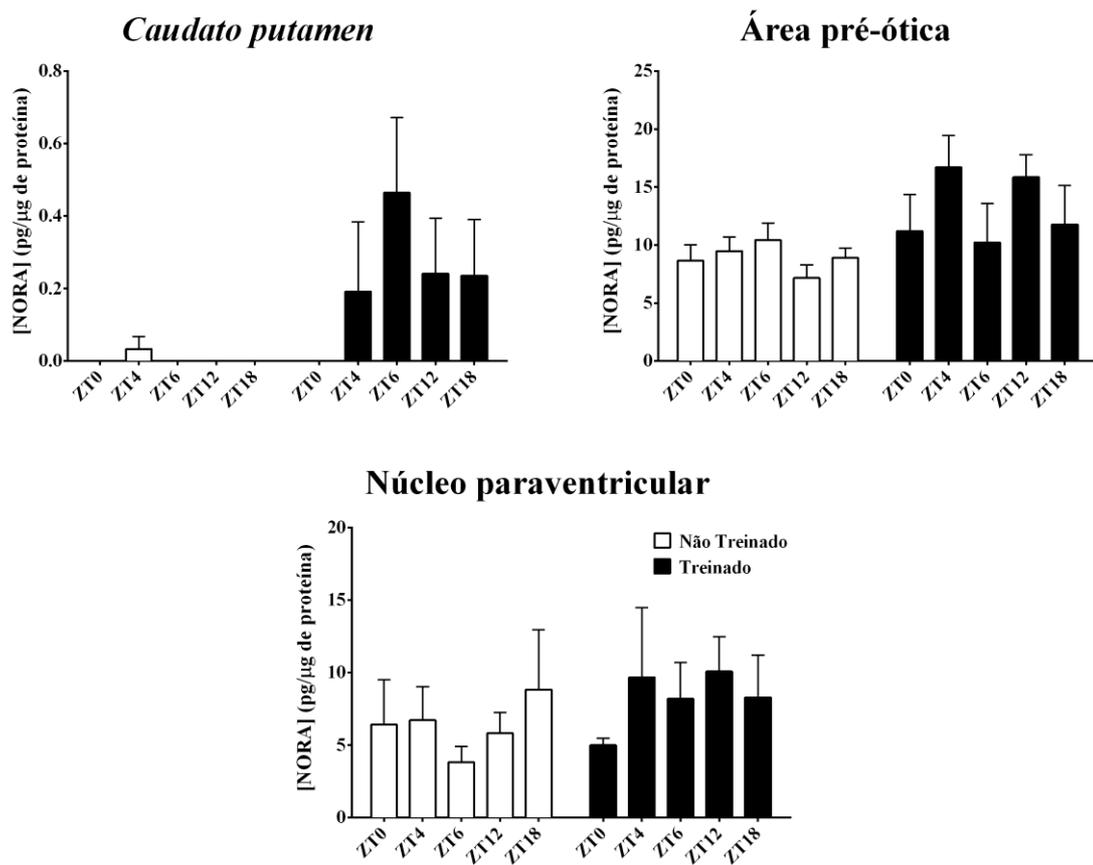


FIGURA 31. Efeito do treinamento físico na variação diária de noradrenalina no sistema nervoso central. Após o teste máximo realizado no sexto dia da 8ª semana de treinamento, os animais foram sacrificados em 5 momentos do dia: ZT0 (07:00 – luzes acesas), ZT4 (11:00 – horário usual do início do exercício regular), ZT6 (13:00), ZT 12 (19:00 – luzes apagadas) e ZT18 (01:00). Resultados expressos em média \pm epm; * indica $p < 0,05$ para comparações entre grupos no mesmo ZT. $n=3-5$ /grupo/ZT.

5.3 Efeito da exposição aguda ao frio nas respostas térmica e metabólica e na expressão de genes do relógio em diferentes horários

5.3.1 Caracterização das oscilações diárias de temperatura interna, atividade locomotora espontânea e metabolismo energético

Durante a coleta de dados para a determinação das oscilações diárias basais dos parâmetros avaliados durante a exposição ao frio, a temperatura ambiente dentro da câmara calorimétrica foi mantida em aproximadamente 22 °C (FIG 32, A). A presença ritmicidade dos parâmetros avaliados durante a exposição ao frio foi avaliada 48 horas antes da realização dos experimentos (FIG 32).

Como esperado para animais com hábitos noturnos, a temperatura interna (FIG 32, B) e a atividade locomotora espontânea (FIG 32, C) atingiram o pico no início da fase ativa. O aumento da atividade foi associado com uma maior ingestão de alimentos e água (FIG 32, D e E) e resultou em aumento do consumo de oxigênio (FIG 32, F) e gasto energético (FIG 32, G). Durante a fase ativa, a utilização do substrato foi deslocada para a oxidação de carboidratos, enquanto que, durante a fase de repouso, o metabolismo lipídico foi predominante, como pode ser observado pela redução do RER (FIG 32, H). Os níveis basais de parâmetros térmicos, comportamentais e metabólicos no início do nosso paradigma de resfriamento foram semelhantes aos observados no dia anterior e ambos apresentaram alterações relacionadas ao horário do dia.

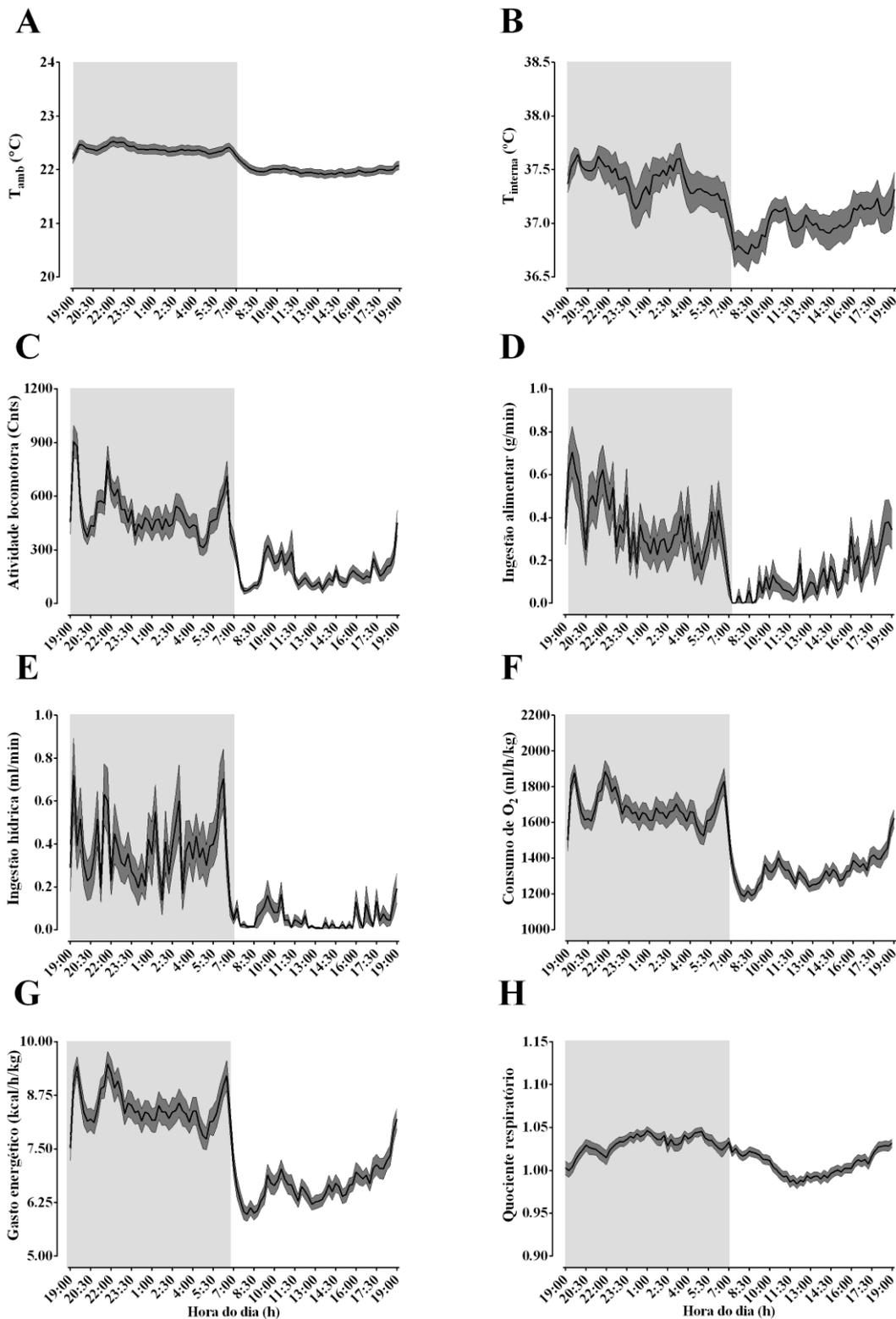


FIGURA 32. Caracterização da variação diária de parâmetros metabólicos, térmicos e comportamentais em condições constantes de temperatura ambiente. As oscilações diárias da temperatura ambiente (A), temperatura interna (B), atividade locomotora espontânea (C), ingestão de alimentos (D), ingestão hídrica (E), consumo de oxigênio (F), produção de calor (G) e taxa de troca respiratória (H) foram monitoradas por 24 horas antes dos episódios de exposição ao frio. As áreas sombreadas indicam a fase escura (19:00 às 07:00). Os resultados são apresentados como média \pm epm (n = 34-50).

5.3.2 Efeito da exposição aguda ao frio em diferentes horários no balanço energético

Nos horários estabelecidos, a temperatura ambiente foi reduzida para 4 °C. A temperatura ambiente média após 2 horas de resfriamento foi $4,01 \pm 0,07$ °C, independentemente da hora do dia.

Temperatura interna. A temperatura interna foi afetada pela exposição ao frio de uma forma dependente do horário (FIG 33, A e 34, A). Quando o resfriamento começou durante a fase clara (ZT6, 10 e 14), observou-se uma ligeira e transitória hipertermia ($p < 0,001$). Curiosamente, durante o protocolo realizado até o ZT18, a temperatura interna foi mantida elevada após 120 minutos de frio ($p < 0,001$), atenuando a diminuição geralmente descrita no parâmetro após a metade da fase escura. Além disso, os protocolos realizados até ZT2 e ZT22 não afetaram a temperatura interna durante o desafio de exposição ao frio. O efeito do horário foi ainda confirmado após a análise da ASC (FIG 34), que mostrou uma interação ($p < 0,05$) com o efeito da exposição ao frio ($p < 0,01$).

Taxa metabólica. O consumo de oxigênio aumentou durante a exposição ao frio ($p < 0,0001$, FIG 33, B), embora isso fosse independente do horário (FIG 34, B). Concomitante à redução da temperatura ambiente, o VO_2 aumentou até atingir um estado estacionário para a taxa metabólica, geralmente após 60 minutos de protocolo ($p < 0,0001$). Diretamente associado ao aumento da taxa metabólica, o gasto energético aumentou com a exposição ao frio (FIG 33, C) independentemente do horário (FIG 34, C).

Atividade locomotora. Apesar de sua relação intrínseca, as mudanças na temperatura interna não foram acompanhadas por uma variação correspondente na atividade locomotora espontânea de maneira dependente do horário (FIG 35, A e 36, A). A exposição ao frio induziu um aumento da atividade locomotora espontânea ($p < 0,001$) que interagiu com a duração do protocolo apenas nas situações realizadas até ZT2, 6, 10 e 14 ($p < 0,01$). De fato, com exceção do protocolo realizado até o ZT22, a atividade locomotora espontânea aumentou assim que a temperatura ambiente começou a cair (FIG 35, A). Apesar do efeito do frio sobre a atividade locomotora espontânea e sua interação com o horário do dia na maioria dos protocolos, essas mudanças ocorreram independentemente da fase do ciclo claro/escuro (FIG 36, A).

Ingestão. Com relação à ingestão de alimentos, a exposição ao frio induziu um aumento no parâmetro nos ZT6, 10, 14 e 22 ($p < 0,05$) com uma interação com a duração apenas nos ZT10 e 22 ($p < 0,01$), embora não houvesse efeito do horário (FIG 35, B e 36, B). Já a

ingestão de água não foi afetada pela exposição ao frio, exceto durante o ZT10 ($p < 0,001$) (FIG 35, C e 36, C).

Taxa de troca respiratória. O quociente respiratório, índice de prevalência de oxidação do substrato, foi reduzido pela interação ($p < 0,01$) entre o resfriamento ambiental ($p < 0,0001$) e a duração ($p < 0,0001$) (FIG 37, A e 38, A). A intensidade do efeito foi dependente de uma interação ($p < 0,001$) entre o horário do dia ($p < 0,05$) e a exposição ao frio ($p < 0,0001$) (FIG 37, A e 38, A).

Oxidação de carboidratos e lipídios. A oxidação de carboidratos foi distintamente afetada pela exposição ao frio dependendo do horário (Fig. 37, B e 38, B). Um aumento na oxidação de carboidratos foi observado apenas durante ZT6 e a primeira hora de ZT14 ($p < 0,001$). Em contraposição, a oxidação de carboidratos diminuiu quando a exposição ao frio foi iniciada durante a fase escura, especialmente durante os ZT18 e 22 ($p < 0,05$). Em contraste com a oxidação de carboidratos, a exposição ao frio evocou um aumento consistente na oxidação lipídica (FIG 37, C e 38, C). No entanto, a observação de que a ASC foi maior do que as condições de controle somente após os ZT10, 14, 18 e 22 ($p < 0,0001$) reforça a ideia de que essa elevação foi acentuada durante a fase escura (FIG 38, C).

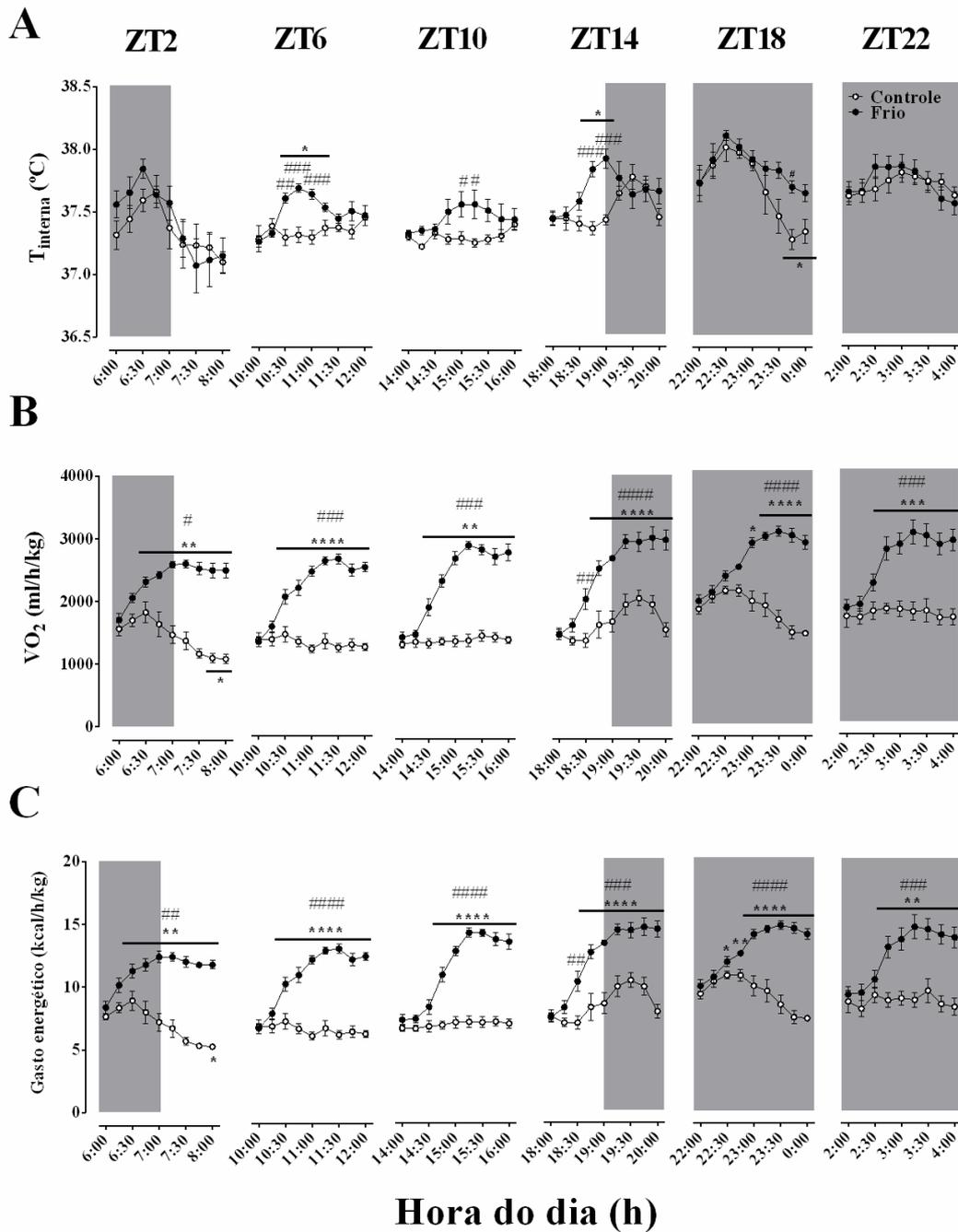


FIGURA 33. Efeito do resfriamento progressivo da temperatura ambiente em diferentes horários nos ajustes térmicos e metabólicos. Os efeitos da exposição ao frio em 6 horários do dia na temperatura interna (A), VO₂ (B) e as mudanças de gasto de energia (C) foram monitorados durante 2 horas. As áreas sombreadas indicam a fase escura (19:00 às 07:00). Os resultados são apresentados como média \pm epm. * indica $p < 0,05$ para comparações entre grupos no início da exposição ao frio. # indica $p < 0,05$ para comparações entre grupos no mesmo ZT. n=5-11/grupo/ZT.

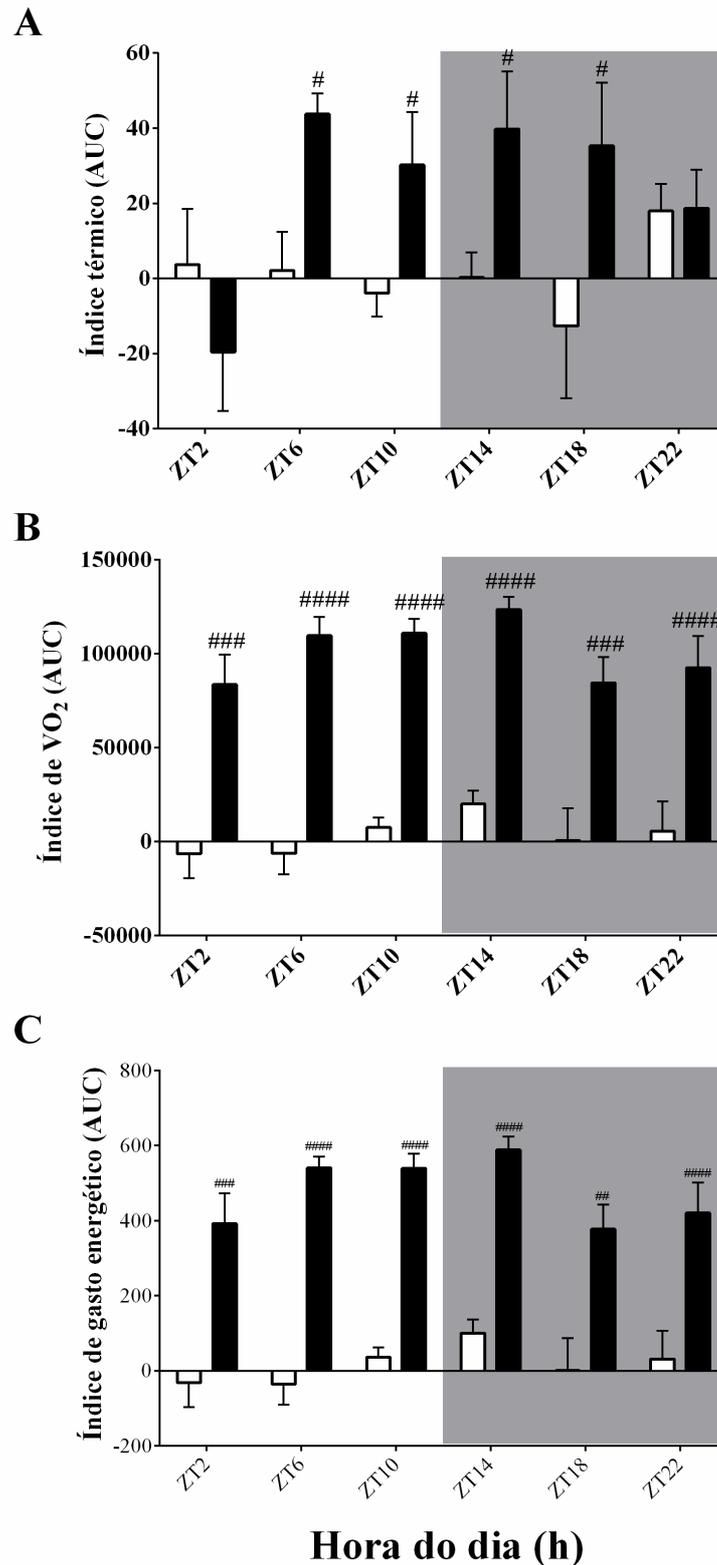


FIGURA 34. Efeito do horário do dia nas respostas térmicas e metabólicas induzidas pela exposição ao frio. Os efeitos da exposição ao frio em 6 horários do dia na temperatura interna (A), VO₂ (B) e as mudanças de gasto de energia (C) foram representados em função da área sob a curva (ASC). As barras brancas correspondem à situação de controle, as barras pretas correspondem à exposição ao frio. As áreas sombreadas indicam a fase escura (19:00 às 07:00). Os resultados são apresentados como média \pm epm. * indica $p < 0,05$ para comparações entre grupos no início da exposição ao frio. # indica $p < 0,05$ para comparações entre grupos no mesmo ZT. n=5-11/grupo/ZT.

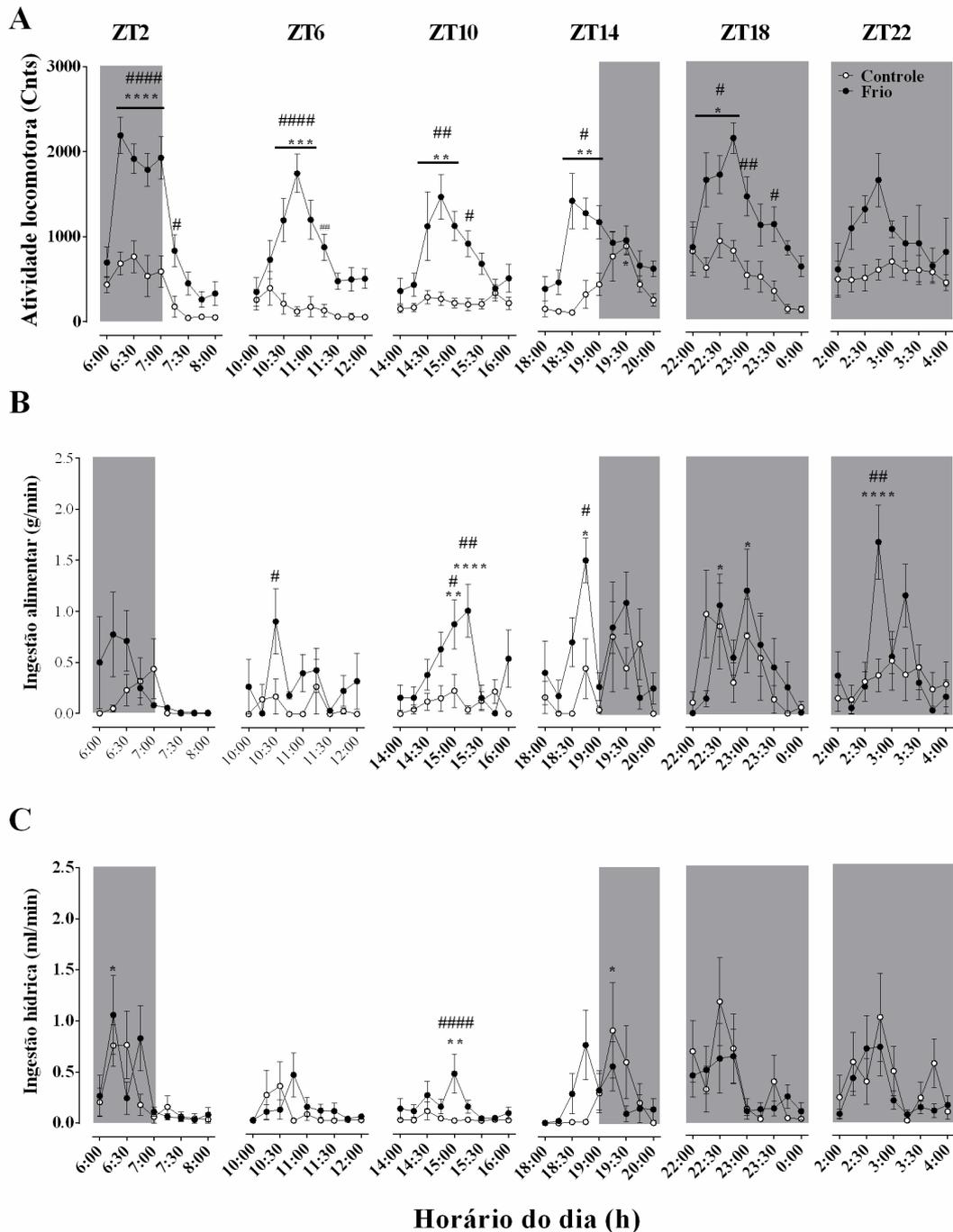


FIGURA 35. Efeito do resfriamento progressivo da temperatura ambiente em diferentes horários nos ajustes comportamentais de locomoção e ingestão. Os efeitos da exposição ao frio em 6 horários do dia na atividade locomotora espontânea (A), ingestão alimentar (B) e ingestão hídrica (C) foram monitorados durante 2 horas. As áreas sombreadas indicam a fase escura (19:00 às 07:00). Os resultados são apresentados como média \pm epm. * indica $p < 0,05$ para comparações entre grupos no início da exposição ao frio. # indica $p < 0,05$ para comparações entre grupos no mesmo ZT. $n = 5-11$ /grupo/ZT.

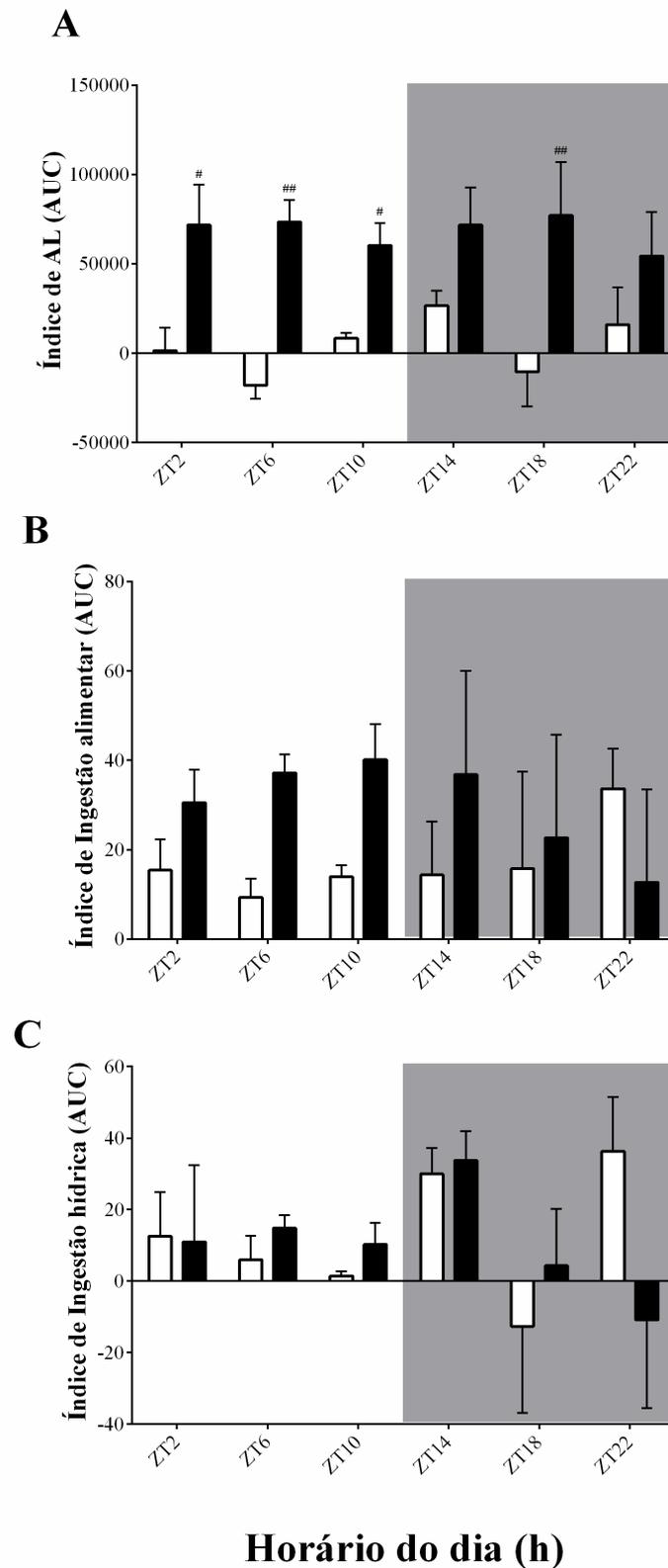


FIGURA 36. Efeito do horário do dia nos ajustes comportamentais induzidas pela exposição ao frio. Os efeitos da exposição ao frio em 6 horários do dia na atividade locomotora espontânea (A), ingestão alimentar (B) e ingestão hídrica (C) foram representados em função da área sob a curva (ASC). As barras brancas correspondem à situação de controle, as barras pretas correspondem à exposição ao frio. As áreas sombreadas indicam a fase escura (19:00 às 07:00). Os resultados são apresentados como média \pm epm. * indica $p < 0,05$ para comparações entre grupos no início da exposição ao frio. # indica $p < 0,05$ para comparações entre grupos no mesmo ZT. $n = 5-11/\text{grupo/ZT}$.

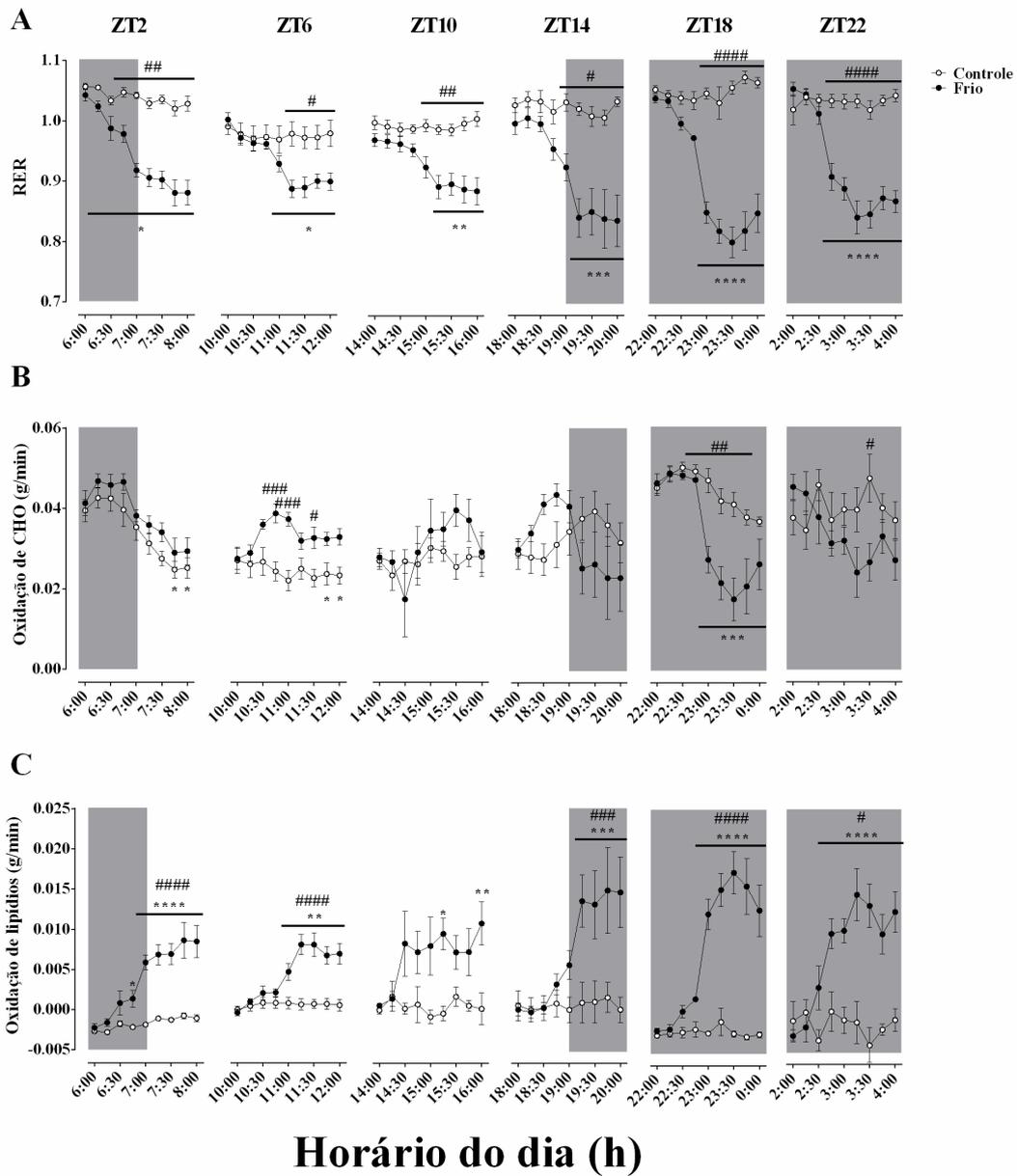


FIGURA 37. Efeito do resfriamento progressivo da temperatura ambiente em diferentes horários na oxidação de substratos energéticos. Os efeitos da exposição ao frio em 6 horários do dia no quociente respiratório (A), na oxidação de carboidratos (B) e na oxidação de lipídios (C) foram monitorados durante 2 horas. As áreas sombreadas indicam a fase escura (19:00 às 07:00). Os resultados são apresentados como média \pm epm. * indica $p < 0,05$ para comparações entre grupos no início da exposição ao frio. # indica $p < 0,05$ para comparações entre grupos no mesmo ZT. $n = 5-11$ /grupo/ZT.

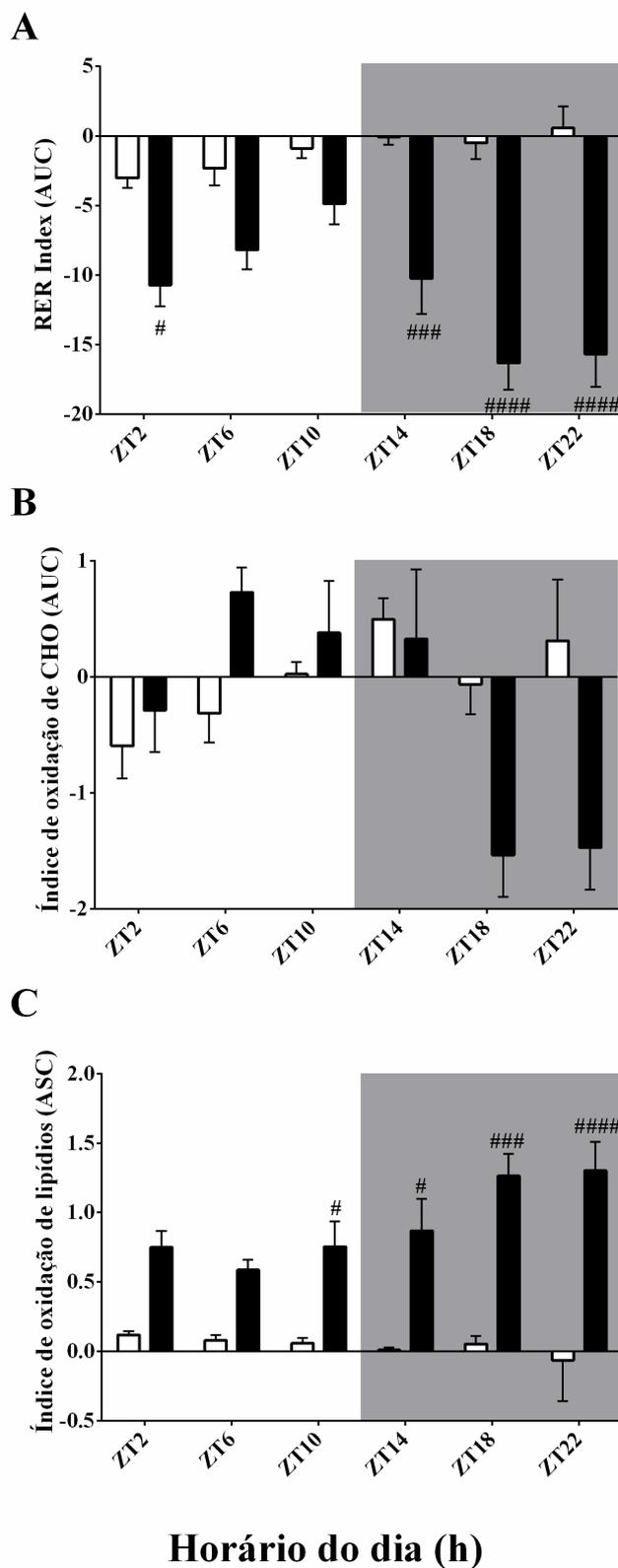


FIGURA 38. Efeito do horário do dia na oxidação de substratos energéticos durante exposição ao frio. Os efeitos da exposição ao frio em 6 horários do dia no quociente respiratório (A), na oxidação de carboidratos (B) e na oxidação de lipídios (C) foram representados em função da área sob a curva (ASC). As barras brancas correspondem à situação de controle, as barras pretas correspondem à exposição ao frio. As áreas sombreadas indicam a fase escura (19:00 às 07:00). Os resultados são apresentados como média \pm epm. * indica $p < 0,05$ para comparações entre grupos no início da exposição ao frio. # indica $p < 0,05$ para comparações entre grupos no mesmo ZT. $n = 5-11/\text{grupo/ZT}$.

5.3.3 Efeito da exposição aguda ao frio em diferentes horários do dia na expressão de genes do relógio

A expressão de mRNA de genes de relógio (BMAL-1, CLOCK, PER1, PER2, CRY1 e CRY2) e de genes controlados pelo relógio (DBP e REV-ERB α) foi investigada tanto no músculo esquelético sóleo (FIG 39) quanto no tecido adiposo marrom (TAM) (FIG 40).

Conforme esperado, no músculo sóleo (FIG 39), o horário do dia afetou a expressão de 6 dos 8 genes relacionados ao relógio (BMAL-1, PER1, PER2, CRY1, DBP e REV-ERB α) ($p < 0,001$). Os picos de expressão nos genes da alça negativa (PER1, PER2 e CRY1) observados na fase escura e nos genes da alça positiva (BMAL-1) e dos genes controlados pelo relógio (DBP e REV-ERB α) observados na fase clara correspondem ao descrito na literatura. No TAM (FIG 40), o horário do dia afetou 5 dos 8 genes relacionados ao relógio (BMAL-1, PER2, CRY1, DBP e REV-ERB α) ($p < 0,001$). Os picos de expressão dos genes da alça positiva (BMAL-1) e negativa (PER2 e CRY1), bem como dos genes controlados pelo relógio (DBP e REV-ERB α) também correspondem ao descrito na literatura.

No músculo sóleo (FIG 34), a exposição ao frio aumentou a expressão em metade dos genes relacionados ao relógio avaliados no músculo sóleo ($p < 0,001$), especificamente, aqueles genes que constituem a alça negativa do relógio molecular (PER1, PER2, CRY1 e CRY2). Dos genes afetados pelo frio, PER2, CRY1 e CRY2 apresentaram uma interação entre o efeito da exposição aguda ao frio e o horário do dia ($p < 0,05$). Nesses casos, a maior expressão dos genes em resposta ao frio foi observada no ZT 10 (PER2 e CRY2) e ZT 18 (CRY1). Por outro lado, REV-ERB α , apesar de não apresentar um efeito evidente da exposição ao frio, demonstrou uma interação da exposição aguda ao frio com o horário do dia ($p < 0,05$). De fato, a expressão de mRNA de REV-ERB α foi atenuada pela exposição ao frio em todos os horários avaliados, exceto o ZT 6.

No TAM (FIG 40), a exposição ao frio afetou 7 dos 8 genes relacionados ao relógio (BMAL-1, CLOCK, PER1, PER2, CRY1, CRY2 e DBP) ($p < 0,01$). A expressão dos genes da alça positiva (BMAL-1 e CLOCK) e da negativa (PER1, PER2, CRY1 e CRY2) aumentou em resposta ao frio, exceção ao gene regulado pelo relógio DBP, cuja expressão foi atenuada pela exposição ao frio. Por outro lado, o horário do dia pouco afetou o efeito do frio na expressão desses genes, uma vez que apenas DBP e REV-ERB α apresentaram uma interação entre os dois fatores avaliados ($p < 0,01$). De fato, com exceção do protocolo realizado em ZT6, a expressão de DBP e REV-ERB α foi atenuada pela exposição ao frio, sobretudo após o ZT10 ($p < 0,0001$).

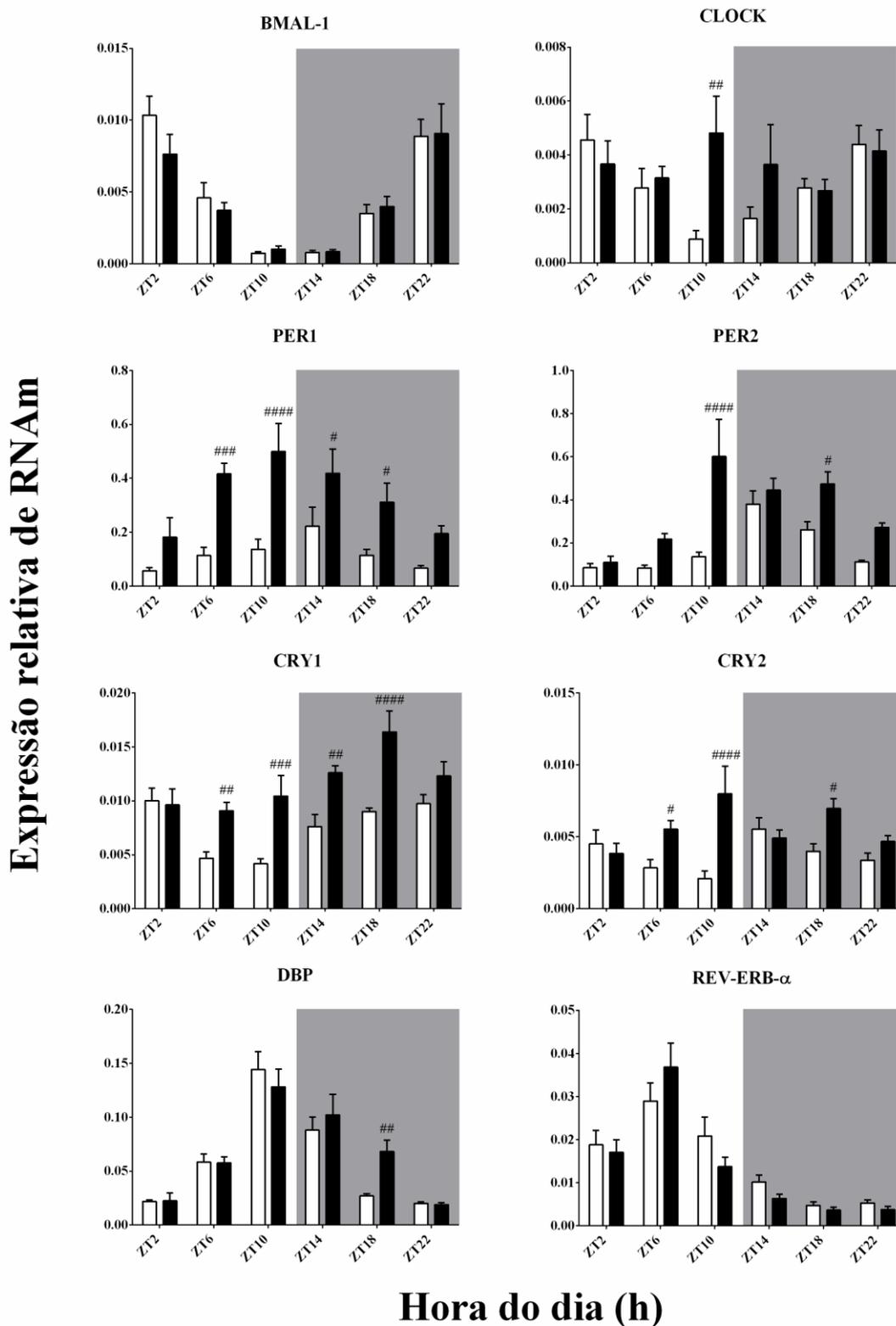


FIGURA 39. Efeito da exposição ao frio em diferentes horários na expressão gênica do relógio biológico no músculo sóleo. Os efeitos da exposição ao frio em 6 horários do dia na expressão de genes do relógio (BMAL-1, CLOCK, PER1, PER2, CRY1 e CRY2) e controlados pelo relógio (DBP e REV-ERB α) foram representados para o músculo sóleo. As barras brancas correspondem à situação de controle, as barras pretas correspondem à exposição ao frio. As áreas sombreadas indicam a fase escura (19:00 às 07:00). Os resultados são apresentados como média \pm epm. * indica $p < 0,05$ para comparações entre grupos no início da exposição ao frio. # indica $p < 0,05$ para comparações entre grupos no mesmo ZT. $n = 5-7$ /grupo/ZT.

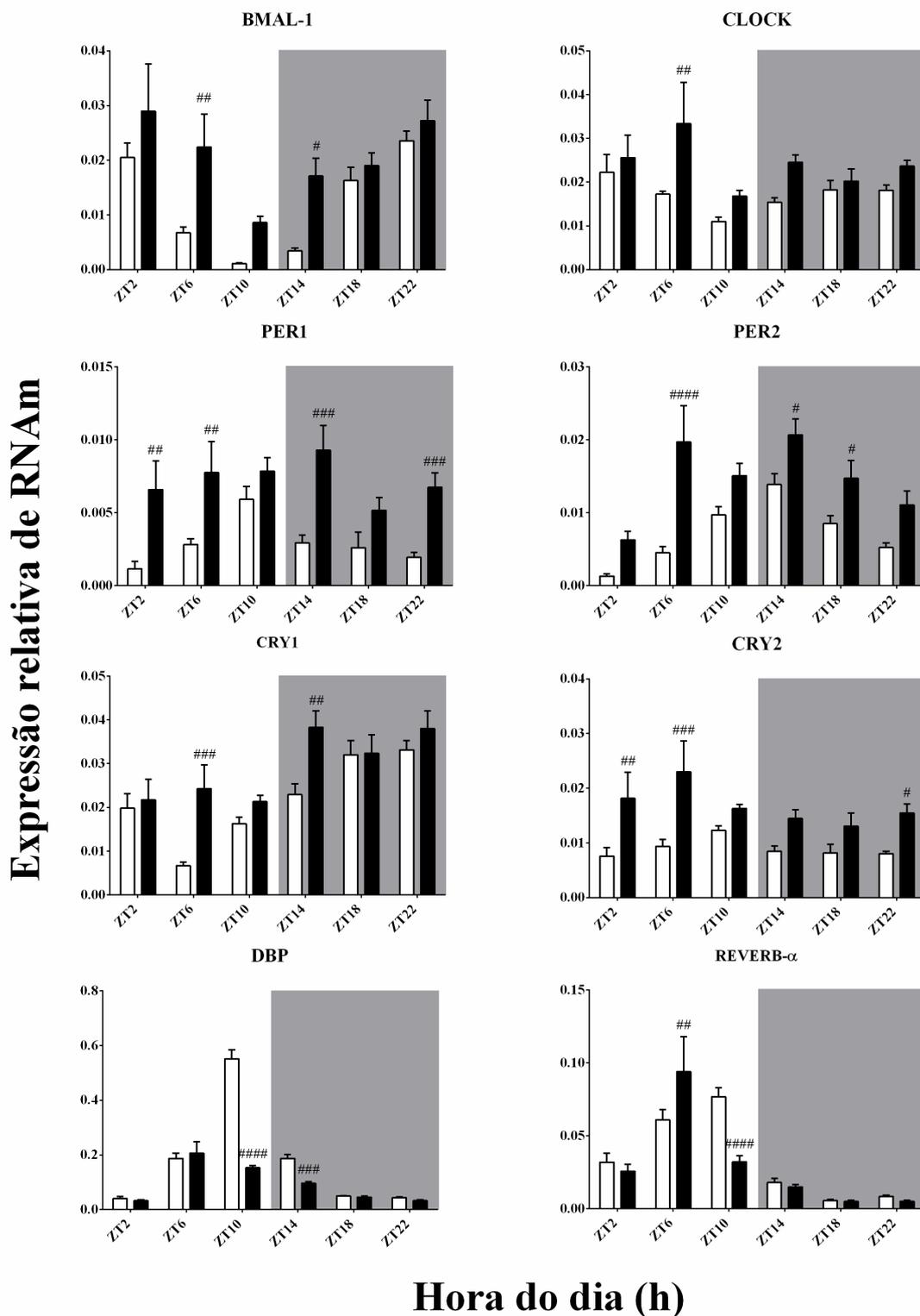


FIGURA 40. Efeito da exposição ao frio em diferentes horários na expressão gênica do relógio biológico no tecido adiposo marrom (TAM). Os efeitos da exposição ao frio em 6 horários do dia na expressão de genes do relógio (BMAL-1, CLOCK, PER1, PER2, CRY1 e CRY2) e controlados pelo relógio (DBP e REV-ERB α) foram representados para o TAM. As barras brancas correspondem à situação de controle, as barras pretas correspondem à exposição ao frio. As áreas sombreadas indicam a fase escura (19:00 às 07:00). Os resultados são apresentados como média \pm epm. * indica $p < 0,05$ para comparações entre grupos no início da exposição ao frio. # indica $p < 0,05$ para comparações entre grupos no mesmo ZT. $n = 5-7$ /grupo/ZT.

5.3.4 Efeito da exposição aguda ao frio em diferentes horários do dia na expressão de genes envolvidos no controle do metabolismo no músculo esquelético e no tecido adiposo marrom

No músculo sóleo, avaliou-se a expressão de 23 genes direta ou indiretamente relacionados com o metabolismo ou equilíbrio térmico (FIG 41 e TAB A do Anexo). Genes que participam diretamente de atividades com regulação circadiana apresentaram variações ao longo do dia (PGC1- α , PPAR- α , HSP90, UCP3, CPT1- α , GLUT4 e ADR- β 2) ($p < 0,05$). Por sua vez, a exposição ao frio exerceu efeitos significativos na expressão de 17 dos 23 genes investigados. Genes diretamente envolvidos com o metabolismo de lipídios (LPL, HSL, CPT1- α e PPAR- α) ou indiretamente (GR) apresentaram efeito marcante do frio em ZT 10 ($p < 0,001$). Durante a fase escura observou-se o aumento de expressão de GLUT4, CD36 e HSP90, sobretudo no ZT 18 ($p < 0,05$). A expressão dos genes PGC1- α e ADR β 2 aumentou de forma marcante nos ZTs 10, 14 e 18, sobretudo na fase escura ($p < 0,01$). A expressão de AMPK aumentou apenas no ZT 10 e 18 ($p < 0,01$).

No TAM, avaliou-se a expressão de 18 genes direta ou indiretamente relacionados com o metabolismo ou equilíbrio térmico (FIG 42 e TAB B do Anexo). Genes que participam diretamente de atividades com regulação circadiana apresentaram variações ao longo do dia (PGC1- α , PPAR- α , UCP1, CIRP, AMPK e HSL) ($p < 0,05$). A exposição ao frio aumentou a expressão de 11 dos 18 genes avaliados no TAM (CREB, PGC1- α , HSP90, UCP1, CPT1- β , AMPK, CD36, GLUT4, HSL, LPL e ACC1) e reduziu a expressão de CIRP e ADR β 3. Apenas 3 dos 18 genes afetados pelo frio mostraram interação significativa entre exposição ao frio e horário do dia (PGC1- α , HSP90, CIRP). De fato, em resposta ao frio, a expressão de PGC1- α aumentou de forma marcante durante a fase clara do ciclo ($p < 0,001$). Já a expressão de HSP90 foi acentuada nos ZTs 6, 10 e 14 ($p < 0,001$). Por sua vez, a expressão de CIRP foi reduzida nos ZTs 10 e 14 ($p < 0,05$).

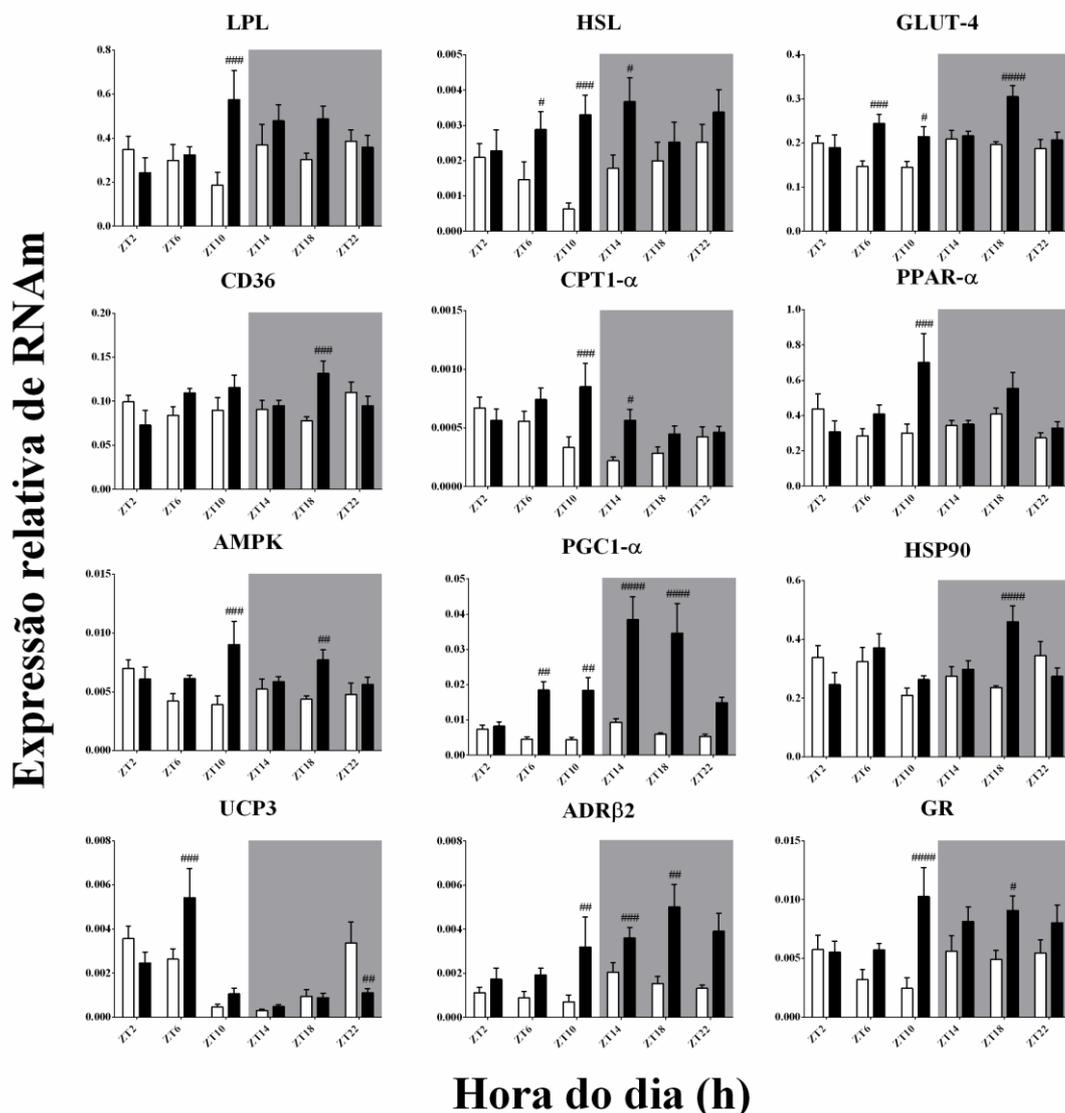


FIGURA 41. Efeito da exposição ao frio em diferentes horários na expressão gênica no músculo sóleo. Os efeitos da exposição ao frio em 6 horários do dia na expressão de genes de interesse foram representados para o músculo sóleo. As barras brancas correspondem à situação de controle, as barras pretas correspondem à exposição ao frio. As áreas sombreadas indicam a fase escura (19:00 às 07:00). Os resultados são apresentados como média \pm epm. # indica $p < 0,05$ para comparações entre grupos no mesmo ZT. $n = 5-7$ /grupo/ZT. Para CREB, PGC1- β , PPAR- γ , UCP2, CIRP, CPT1- β , NAMPT-1, FOXO-1, ACC2, mTOR e CAMK2 α , ver Tabela A do Anexo.

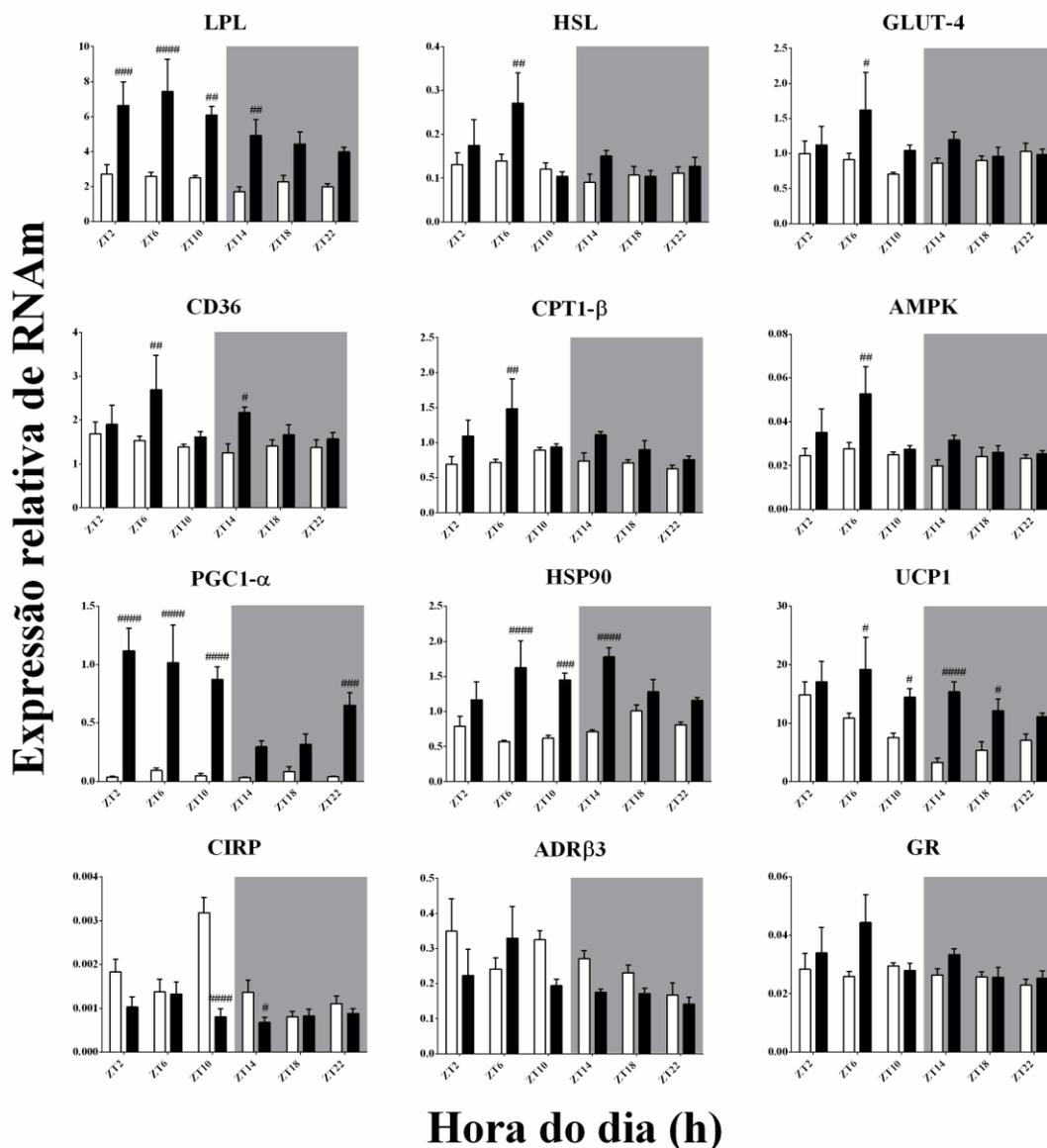


FIGURA 36. Efeito da exposição ao frio em diferentes horários na expressão gênica no tecido adiposo marrom (TAM). Os efeitos da exposição ao frio em 6 horários do dia na expressão de genes de interesse foram representados para o TAM. As barras brancas correspondem à situação de controle, as barras pretas correspondem à exposição ao frio. As áreas sombreadas indicam a fase escura (19:00 às 07:00). Os resultados são apresentados como média \pm epm. # indica $p < 0,05$ para comparações entre grupos no mesmo ZT. $n = 5-7$ /grupo/ZT. Para CREB, PGC1- β , PPAR- α , PPAR- γ , ACC1 e ACC2, ver Tabela B do Anexo.

6 DISCUSSÃO

O presente trabalho demonstrou que o exercício físico, aguda ou cronicamente, influencia o sistema circadiano de controle temporal modulando periféricamente a atividade de genes do relógio no músculo gastrocnêmio e promovendo ajustes na variação diária de atividade monoaminérgica basal em áreas diretamente envolvidas no controle da temperatura interna. Além disso, a exposição ao frio afeta de maneira tecido-específica a expressão de genes do relógio e genes controlados pelo relógio no músculo sóleo e no tecido adiposo marrom. Adicionalmente, demonstrou-se que essas especificidades em nível molecular são acompanhadas por modificações na utilização de substratos energéticos, sobretudo quando o resfriamento ocorre durante a fase clara do ciclo claro/escuro, caracterizando a importância do horário do dia e do próprio relógio interno como fator determinante da intensidade dos ajustes metabólicos ao ambiente frio.

6.1 Efeito do exercício agudo no balanço térmico circadiano e na expressão dos genes do relógio

6.1.1 A concentração de corticosterona é dependente da carga de trabalho em resposta ao exercício

A realização de exercício físico em esteira constitui um desafio multifatorial para a homeostase. No presente trabalho, demonstrou-se que o tipo de exercício de corrida em esteira (submáximo ou progressivo) e a carga de trabalho realizado afetam a concentração de corticosterona circulante. Conforme observado, animais que realizaram exercício com carga constante a 40% ou 70% da sua velocidade máxima apresentaram concentrações plasmáticas de corticosterona diretamente proporcionais à carga de trabalho. Em contrapartida, animais submetidos a teste de exercício progressivo até a fadiga apresentaram concentração de corticosterona plasmático sem uma relação de dependência com a carga de trabalho.

As diferenças na concentração de corticosterona em resposta às diferentes intensidades e tipos de exercício de corrida em esteira evidenciam diferentes formas de ativação do sistema nervoso central em resposta ao exercício. Em resposta ao estímulo psicofísico com potencial estressor representado pelo exercício físico, o sistema nervoso central promove uma série de ajustes dinâmicos em diversos sistemas fisiológicos (Noakes, 2011). Dessa forma, proporcionalmente ao desafio induzido pelo estímulo, ocorre não apenas um aumento de taxa metabólica, da frequência cardíaca, da pressão de perfusão,

da temperatura interna e cutânea, mas também uma redistribuição do aporte sanguíneo para os sistemas em maior atividade.

O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal participa diretamente nesse sistema complexo (Mastorakos *et al.*, 2005; Soya *et al.*, 2007; Yanagita *et al.*, 2007; Stranahan *et al.*, 2008; Campbell *et al.*, 2009; Barna *et al.*, 2012; Sasaki *et al.*, 2016). Quanto maior a intensidade de um estímulo, maior seria a atividade de neurônios CRH do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), o que resultaria em maior secreção de ACTH pela hipófise anterior e, conseqüentemente, em maior liberação de corticosterona para modular tanto a atividade metabólica sistêmica, quanto a atividade neural no próprio SNC (Soya *et al.*, 2007; Campbell *et al.*, 2009; Barna *et al.*, 2012; Machado *et al.*, 2016; Sasaki *et al.*, 2016).

Apesar da caracterização da relação de dependência entre a concentração de corticosterona e a carga de trabalho para o exercício de corrida submáximo (40% e 70%) por 60 minutos, não se observou um aumento de corticosterona circulante após o teste progressivo. De fato, o teste progressivo inicia com uma velocidade relativa abaixo de 40% do máximo. Durante exercício de baixa intensidade, não há liberação significativa de ACTH em relação a intensidades mais elevadas (Soya *et al.*, 2007). No grupo EPF, o tempo de exercício em intensidades altas (acima de 70% do máximo) corresponde a cerca de 56% do tempo total de exercício ($53 \pm 3,77$ min). Corroborando essa percepção, a concentração de corticosterona plasmática aumentariam após cerca de 30 – 45 minutos após o início do exercício (Pacák *et al.*, 1995). Dessa maneira, a menor duração do exercício em intensidade superior a 70% representaria uma menor ativação cumulativa do eixo HPA.

Em síntese, os resultados relativos à concentração de corticosterona em resposta ao exercício reforçam a concepção de que a estimulação do eixo HPA depende tanto da intensidade quanto da duração do exercício.

6.1.2 O efeito do exercício físico em PERI é inversamente dependente da carga de trabalho realizado

A ativação do eixo HPA decorrente da realização do exercício físico com diferente organização da carga de trabalho poderia contribuir para o potencial sincronizador do exercício, uma vez que glicocorticoides influenciam diretamente a atividade do relógio biológico (Edgar e Dement, 1991; Edgar *et al.*, 1997; Atkinson *et al.*, 2007; Ottawa *et al.*, 2007; Harrington, 2012; Hughes e Piggins, 2012; Schroeder *et al.*, 2012; Wolff e Esser, 2012; Pastore e Hood, 2013; Pendergast *et al.*, 2014; Mayeuf-Louchart *et al.*, 2015;

Sasaki *et al.*, 2016; Tahara *et al.*, 2017). Dessa forma, avaliou-se a expressão do gene do relógio - PER1 – em dois tecidos potencialmente ativos durante a atividade física: as adrenais, como fonte primária de corticosterona e o músculo esquelético gastrocnêmio, essencial para o exercício de corrida em esteira.

Nas adrenais, a transcrição de PER1, expressa em termos de quantidade de mRNA encontrada na amostra, não foi alterada em nenhum dos modelos de exercício empregados (E40%, E70% e EPF). De fato, não foram encontradas correlações entre a expressão de PER1 tanto com os componentes da carga de exercício quanto com a concentração de corticosterona em resposta ao estímulo. As adrenais estão sob o controle direto do SCN por meio de eferências autonômicas na região sub-PVN e indireto, por meio da modulação indireta da atividade dos neurônios CRH do PVN, controlando a liberação de ACTH e, conseqüentemente, de corticosterona (Mastorakos *et al.*, 2005). Durante o exercício submáximo, observou-se um aumento de corticosterona dependente da carga de trabalho, intensidade e volume do exercício, possivelmente refletindo uma maior atividade secretora da glândula adrenal. Com base nos relatos encontrados na literatura demonstrando a susceptibilidade do relógio molecular das adrenais à regulação noradrenérgica e por corticosterona e ACTH (Kalsbeek *et al.*, 2003; Otawa *et al.*, 2007; Campbell *et al.*, 2009; Sasaki *et al.*, 2016), trabalhou-se com a hipótese de que o exercício agudo promoveria alterações no núcleo do componente molecular do relógio das adrenais. Entretanto esse efeito não foi observado, o que sugere uma resiliência da fase do relógio interno das adrenais imediatamente após a realização do exercício de corrida em esteira.

O presente estudo revelou que em resposta ao exercício, a transcrição de PER1 no músculo gastrocnêmio (essencial para atividade de corrida) foi inversamente proporcional à carga de trabalho realizado em cada protocolo de exercício. Em contrapartida, a expressão de mRNA foi maior na situação em que os animais foram mantidos na esteira sem que essa fosse ligada para a realização do exercício físico.

A musculatura esquelética exerce papel central na prática de qualquer atividade física. A regulação circadiana da atividade locomotora espontânea e, conseqüentemente, dos ciclos de sono e vigília ocorre por meio de um complexo sistema abarcando tanto componentes centrais, quanto periféricos (Hughes e Piggins, 2012). Centralmente, projeções do tronco encefálico (sobretudo da Rafe), do hipotálamo lateral e do ramo intergeniculado lateral, para o SCN, modulam a atividade do relógio central. Conseqüentemente, a corrida em esteira, como manifestação de atividade locomotora, poderia constituir informação temporal interpretada pelo sistema e retransmitida para outros componentes.

Tanto a exposição do animal à esteira quanto o próprio exercício poderiam induzir mudanças de fase imediatas na regulação da transcrição de PER1. A realização do exercício poderia modular a atividade do gene de uma maneira dependente da intensidade do esforço (Freyssenet, 2007; Nickerson *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2009; Wolff e Esser, 2012; Pastore e Hood, 2013; Schroder e Esser, 2013; Woldt *et al.*, 2013; Dyar *et al.*, 2015; Mayeuf-Louchart *et al.*, 2015; Yamanaka *et al.*, 2016; Aoyama e Shibata, 2017). Dessa forma, com o presente trabalho, demonstrou-se que a expressão de mRNA de genes do relógio em um músculo em maior atividade durante o exercício de corrida em esteira é afetada pela intensidade da atividade física. Tal resultado reforça o potencial do exercício como agente sincronizador de componentes periféricos do sistema circadiano de controle temporal. De fato, essa foi a primeira vez em que se demonstrou um efeito imediato do exercício físico no relógio endógeno muscular, uma vez que estudos anteriores demonstraram efeitos crônicos do treinamento físico ou da atividade física regular na fase de genes do relógio.

6.1.3 As alterações da relação entre atividade locomotora espontânea e temperatura interna após o exercício resultam do processo de recuperação

Tendo em vista o observado em relação à transcrição dos genes do relógio na musculatura em maior atividade durante o exercício, buscou-se avaliar se tais alterações moleculares poderiam ser acompanhadas por mudanças na atividade locomotora espontânea e na temperatura interna. Os resultados do presente estudo demonstraram um descompasso transitório, restrito aos dias nos quais os protocolos de exercício físico eram realizados, entre as variáveis em resposta à realização do exercício físico em esteira.

Em resposta ao exercício, houve um aumento de temperatura interna induzida pela maior produção de calor decorrente das contrações musculares. Esse aumento de temperatura interna poderia atuar localmente no músculo esquelético em atividade durante o exercício sinalizando para o relógio molecular a necessidade de um reajuste de fase, em função do aumento dos níveis de atividade física. Entretanto, essa hipótese não pôde ser diretamente comprovada com o presente protocolo de exercício agudo. No entanto, a aparente inibição da indução de transcrição de PER1 induzida pela introdução ao novo ambiente (protocolo de repouso em esteira) pela intensidade do exercício físico, fornece importantes indícios de interação entre sinais térmicos e o relógio biológico muscular. Por analogia, a hipertermia possivelmente induzida pelo exercício contribuiria para a inibição da transcrição de PER1.

Em geral, o aumento circadiano de PER1 ocorre durante a fase de atividade do animal, à noite (Balsalobre, 2002; Brown *et al.*, 2002; Cailotto *et al.*, 2009; Buhr *et al.*, 2010; Tamaru *et al.*, 2011; Schroeder *et al.*, 2012; Wolff e Esser, 2012; Gerhart-Hines *et al.*, 2013; Westfall *et al.*, 2013; Dyar *et al.*, 2014). Nessa fase, ocorre o aumento concomitante de atividade locomotora, taxa metabólica e temperatura interna. Esse aumento de temperatura sinalizaria a fase do sistema circadiano para os tecidos periféricos, aumentando os níveis de PER em diversos modelos experimentais (Brown *et al.*, 2002; Rensing e Ruoff, 2002; Buhr *et al.*, 2010; Tamaru *et al.*, 2011; Saini *et al.*, 2012; Gerhart-Hines *et al.*, 2013; Sladek e Sumova, 2013; Kidd *et al.*, 2015; Gotic e Schibler, 2017). Demonstrou-se que culturas de pulmão e hipófise de camundongos PER2::*luc* podem ser sincronizadas tanto pela oscilação circadiana de temperatura interna quanto por pulsos de hipertermia de até 38,5 °C (Buhr *et al.*, 2010). Observação semelhante foi encontrada em culturas de fibroblastos e de hepatócitos submetidos a diferentes ciclos de temperatura na faixa de oscilação circadiana (Brown *et al.*, 2002; Tamaru *et al.*, 2011; Saini *et al.*, 2012; Sladek e Sumova, 2013; Gotic e Schibler, 2017). Interessante notar que, em ambos os trabalhos, a acrófase de mRNA de PER2 ocorreria na primeira metade da fase escura/ativa e, aparentemente, seria responsiva à inversão de ciclos de temperatura. Logo, no presente estudo, inibição da expressão de PER1 dependente da intensidade do exercício de corrida em esteira poderia resultar em um primeiro reajuste do relógio muscular em resposta ao aumento de atividade física.

Se, por um lado, a resposta local observada no músculo esquelético poderia estar relacionada diretamente com sinais periféricos de aumento de temperatura e maior demanda metabólica, potencialmente desencadeando um desacoplamento de fase do relógio molecular muscular em relação ao central, por outro lado, o processo de desacoplamento entre temperatura interna e atividade locomotora espontânea deveria ser avaliado sob uma perspectiva da regulação homeostática central que se sobrepõem a mecanismos circadianos. A adoção de estratégias que favorecem a perda de calor após o exercício físico demanda uma regulação a médio prazo para produzir o efeito de redução da temperatura interna. Essas estratégias constituem elementos de regulação homeostática que se sobrepõem aos mecanismos de ajuste circadianos. Nesse sentido, foi demonstrado que o horário do dia pouco influencia o processo de perda de calor 30 minutos após o exercício progressivo até a fadiga. Dessa forma, sugere-se que o desacoplamento (estimado por meio da comparação entre as restas de regressão linear para cada dia de

análise) observado entre os dois parâmetros resulta do processo de recuperação após o exercício físico.

Em síntese, as alterações observadas na temperatura interna nas 6 horas subsequentes ao exercício não foram acompanhadas por alterações nos níveis de atividade locomotora. Esses resultados corroboram a ideia de manutenção da fase do relógio central em resposta ao exercício agudo. Logo, centralmente, o exercício agudo mascararia o ritmo biológico. Em contrapartida, periféricamente, com a observação de um efeito do exercício na em um dos componentes do relógio biológico molecular na musculatura esquelética, pode-se sugerir que, agudamente, o exercício promoveria um desarranjo transitório de fases dentro do sistema circadiano. Dessa forma, reforça-se o papel do exercício como *zeitgeber* autônomo para o sistema e seu potencial estratégico para ações não farmacológicas de regulação dos seus componentes periféricos.

6.2 Efeito do treinamento físico na variação diária da expressão dos genes do relógio, corticosterona, catecolaminas e do balanço térmico

O experimento 2 mostrou que o treinamento físico realizado durante a fase clara provocou alterações em diversos níveis do sistema circadiano de controle temporal. A prática regular de exercícios físicos de intensidade moderada/alta alterou o balanço térmico diário, expresso em função da relação entre atividade locomotora espontânea e temperatura interna. Se, por um lado, o treinamento físico aumentou a atividade locomotora, sobretudo na fase escura, pelo outro, a despeito dos episódios hipertérmicos induzidos pelas sessões de treinamento, a temperatura interna diária média permaneceu inalterada. Tal alteração no balanço diário entre atividade locomotora espontânea e temperatura interna sugere um novo estado de equilíbrio no sistema circadiano de controle temporal.

De fato, pela primeira vez, observou-se que o treinamento físico afetou tanto a atividade diária monoaminérgica no sistema nervoso central quanto a variação diária do gene do relógio PER1 na musculatura esquelética. Periféricamente, no músculo gastrocnêmio, observou-se um segundo pico de PER1 no início da fase clara, indicando um reajuste do relógio biológico. Centralmente, o treinamento físico promoveu diferentes mudanças em regiões relacionadas ao controle motor, à regulação de temperatura e à resposta a desafios a homeostase. Em conjunto, tais alterações apontam na direção de descompasso entre adaptações temporais do sistema circadiano e adaptações homeostáticas, normalmente benéficas, desencadeadas pelo treinamento físico.

6.2.1 O treinamento físico promove alterações no balanço térmico diário

O treinamento físico desencadeia alterações reconhecidas no sistema de controle de temperatura e do metabolismo energético (Thompson *et al.*, 2001; Smith e Zigmond, 2003; Pastore e Hood, 2013; Santiago *et al.*, 2016). Via-de-regra, o aumento do desempenho físico é acompanhado por melhoras na eficiência energética e também na capacidade termorregulatória (Gleeson, 1998; Thompson *et al.*, 2001; Smith e Zigmond, 2003; Campbell *et al.*, 2009; Michelini e Stern, 2009; Pastore e Hood, 2013; Santiago *et al.*, 2016). No presente trabalho, o modelo empregado de treinamento foi adequado tanto para aumentar o desempenho físico quanto para aprimorar o balanço térmico, uma vez que a taxa de acúmulo de calor durante o exercício progressivo até a fadiga e a perda de calor corporal durante a recuperação do exercício progressivo foram aperfeiçoadas após 8 semanas de treinamento.

As alterações no balanço térmico diário, independentes das sessões de exercício propriamente ditas, reforçam a ideia de adaptação na eficiência térmica. Tanto a capacidade de dissipar calor quanto a eficiência termorregulatória parecem ter sido afetadas pelo programa de 8 semanas de treinamento. Primeiramente, conforme observado ao longo da 8ª semana de treinamento, nos momentos imediatamente anteriores às sessões de exercício, a temperatura da pele da cauda elevou-se, o que sinalizaria o início da sessão de treinamento. Adicionalmente, a relação entre atividade locomotora espontânea e temperatura interna foi aumentada durante a fase escura do ciclo claro/escuro, sugerindo uma redução do “custo energético” da atividade locomotora espontânea (Machado *et al.*, 2015; Machado *et al.*, 2016). Dessa forma, a repetição da prática de exercícios físicos nos mesmos horários desencadearia tanto adaptações temporalmente delimitadas quanto adaptações gerais nos sistemas de controle de temperatura e fornecimento energético, preparando o indivíduo para desempenhar uma atividade regular com horário determinado que tenha sido incorporada a seu cotidiano.

Nesse sentido, foi interessante constatar que, a despeito dos episódios de hipertermia induzida pelo exercício físico, a variação diária da temperatura interna permaneceu estável ao longo da 8ª semana de treinamento. Esse resultado confirma a importância da estabilidade do ritmo de temperatura interna para a manutenção da homeostase (Webb, 1995; Briese, 1998; Romanovsky, 2007; Morrison e Nakamura, 2011). Na presença de um ciclo regular de claro/escuro, o ritmo de temperatura interna dificilmente seria afetado por um agente sincronizador secundário (Wachulec *et al.*, 1997; Salgado-Delgado *et al.*, 2008; Kalsbeek, Liu, *et al.*, 2012; Sasaki *et al.*, 2016). O ciclo claro/escuro, predominante

para o sistema circadiano de mamíferos em geral, proporciona um sinal temporal que mascara alterações potenciais em efetores gerais do sistema circadiano, como a temperatura interna. Exposições agudas a agentes sincronizadores secundários em horários inadequados ou não usuais, poderiam afetar o sistema em níveis distintos, dependendo da relação entre o estímulo e a função biológica estimulada. Nesse sentido, a atividade locomotora espontânea na caixa (avaliada no presente trabalho), parece ser mais reativa a procedimentos que envolvam um aumento da atividade física geral (Edgar e Dement, 1991; Wachulec *et al.*, 1997; Salgado-Delgado *et al.*, 2008; Salgado-Delgado, Angeles-Castellanos, *et al.*, 2010; Harrington, 2012; Kalsbeek, Liu, *et al.*, 2012; Schroeder *et al.*, 2012; Wolff e Esser, 2012; Pastore e Hood, 2013; Pendergast *et al.*, 2014; Ramkisoensing e Meijer, 2015; Yasumoto *et al.*, 2015; Sasaki *et al.*, 2016).

Em contrapartida à estabilidade da variação diária de temperatura interna, no presente trabalho, observou-se um aumento da atividade locomotora espontânea em resposta ao treinamento, sobretudo na fase de atividade dos animais. Esse aumento de atividade ocorreu independentemente de alterações na quantidade de alimento ingerido em cada fase do ciclo claro/escuro ou na temperatura interna, como discutido anteriormente. Durante a segunda metade da fase escura do ciclo, a atividade locomotora espontânea foi maior nos animais treinados. Esse aumento de atividade locomotora espontânea representaria uma redistribuição temporal do padrão de ingestão alimentar, em resposta a maior demanda energética estabelecida pela regularidade do programa de treinamento. Observações semelhantes têm sido observadas em modelos de sincronização do relógio biológico diferentes do empregado no presente trabalho (Salgado-Delgado *et al.*, 2008; Salgado-Delgado, Angeles-Castellanos, *et al.*, 2010; Salgado-Delgado, Nadia, *et al.*, 2010; Angeles-Castellanos *et al.*, 2011; Pendergast *et al.*, 2014). Definindo dois episódios de busca e consumo de alimentos ao longo da fase escura, o atenderia à demanda elevada durante o início da fase de repouso. Em condições regulares, os animais buscam o alimento nos momentos iniciais da fase escura, resultando em um estado prolongado de jejum no momento da sessão de exercício (ZT4-6). Com a regularidade do ciclo, o sistema se reajustaria para atender às características temporais do ambiente da forma mais eficiente possível, com menores distúrbios para a homeostase.

A alteração na atividade locomotora espontânea poderia refletir uma alteração no padrão temporal de ingestão alimentar, como afirmado anteriormente, e a alteração na relação entre atividade locomotora espontânea e a temperatura interna pelo treinamento poderia fortalecer essa hipótese. De fato, na segunda metade da fase escura, independentemente

de alterações na temperatura interna, a relação entre as variáveis permaneceu elevada. Uma maior relação atividade locomotora/temperatura interna sugere um menor efeito da atividade locomotora espontânea na temperatura interna. Entretanto, em sistemas de registro de telemetria ou mesmo em ambientes de monitoramento independente dessas variáveis, episódios de ingestão alimentar encontram-se associados a episódios de aumento de atividade locomotora, o que dificulta a caracterização desse efeito com os procedimentos utilizados no presente estudo (Virtue *et al.*, 2012; Abreu-Vieira *et al.*, 2015). No presente experimento, esse aparente descompasso entre atividade locomotora espontânea e temperatura interna poderia ser atribuído tanto à maior eficiência energética do sistema, resultando em maiores níveis de atividade locomotora espontânea para um mesmo nível de temperatura interna, quanto à redistribuição do padrão temporal de ingestão alimentar.

6.2.2. O treinamento físico promove alterações na expressão de genes do relógio no músculo esquelético

O treinamento físico durante a fase clara promoveu um desequilíbrio em um dos componentes do relógio biológico (PER1) na musculatura esquelética. Ao término das 8 semanas de treinamento, os animais treinados apresentaram dois picos na expressão de PER1. Normalmente, este componente central da alça negativa do mecanismo canônico do relógio biológico molecular apresenta um pico no início da fase escura (ZT12), encontrado em ambos os grupos. Entretanto, no grupo treinado, um novo pico foi identificado no início da fase clara (ZT0). Usualmente, o aumento de PER1 e PER2 está associado a momentos de atividade de um sistema, normalmente durante a fase ativa do ciclo de repouso/atividade. No presente modelo experimental, os episódios de aumento de atividade locomotora espontânea observados durante a segunda metade da fase escura poderiam desencadear alterações na expressão de PER1 na musculatura esquelética como forma de promover reajustes no relógio periférico. Nesse sentido, o relógio periférico sinalizaria a ocorrência de um fenômeno com alta demanda energética, como seria o caso da sessão de treinamento. Tal hipótese ganharia respaldo ao ser comparada com o resultado encontrado na situação experimental 1, em que animais não treinados realizaram exercício ou permaneceram na esteira durante o mesmo horário da sessão de treinamento. Naquele experimento observou-se que a exposição de ratos à esteira desencadeou um aumento na expressão de PER1 e que esse aumento na transcrição de PER1 foi atenuado ou inibido pelo exercício de corrida em esteira. Em conjunto com os dados obtidos em condições basais nos animais treinados, percebe-se que a alça negativa

de retroalimentação do relógio biológico muscular estaria parcialmente associada a um mecanismo de antecipação a momentos de maior atividade locomotora.

Tal sinalização temporal poderia estar vinculada a episódios de aumentos na secreção de corticosterona, uma vez que glicocorticoides são potentes agentes endógenos de modulação da atividade do relógio biológico periférico (Balsalobre *et al.*, 2000; Balsalobre, 2002; Ottawa *et al.*, 2007; Stranahan *et al.*, 2008; Campbell *et al.*, 2009; So *et al.*, 2009; Chung *et al.*, 2011; Kalsbeek, Van Der Spek, *et al.*, 2012; Sasaki *et al.*, 2016) e, como observado no experimento 1, podem ser secretados durante atividade de corrida em esteira com duração e intensidade acima de 70% do máximo. De fato, Sasaki e colaboradores (2016) demonstraram que o exercício forçado, na roda ou esteira, na fase de repouso promove avanços de fase em tecidos periféricos e nos níveis de corticosterona. Esses autores também demonstraram que os efeitos periféricos seriam dependentes da ação conjunta da corticosterona e da sinalização noradrenérgica (Sasaki *et al.*, 2016). Em consonância com trabalhos anteriores, observou-se que tais alterações ocorreram independentemente da ação do SCN (Schroeder *et al.*, 2012; Wolff e Esser, 2012; Yamanaka *et al.*, 2016). Entretanto, no presente trabalho, a variação diária de corticosterona não foi afetado pelo programa de treinamento empregado. Consequentemente, esse reajuste temporalmente delimitado na expressão de PER1 no relógio muscular esquelético ocorreria mediante adaptações na atividade de regiões do SNC que participariam do controle motor e do balanço energético. Avaliado em conjunto com experimentos de outros grupos, poder-se-ia supor que o processo de adaptação do relógio periférico ocorre inicialmente com a participação da corticosterona e a manutenção do estímulo de natureza cíclica, com a predominância de um componente neural. Nesse sentido, é importante notar que, apesar de apresentarem hiperatividade do eixo HPA (secreção de corticosterona em resposta à infusão de ACTH) nas primeiras semanas de treinamento, ao término das 8 semanas de treinamento, a reatividade do eixo HPA encontrava-se restaurada em ratos submetidos a roda de atividade por 8 semanas (Ottawa *et al.*, 2007; Campbell *et al.*, 2009; Yasumoto *et al.*, 2015). De fato, os níveis de corticosterona circulante constituem apenas um dos componentes de sinalização de fase sob controle da atividade do marca-passo central do sistema circadiano (Kalsbeek, Van Der Spek, *et al.*, 2012).

Atividade locomotora espontânea (Hughes e Piggins, 2012) e a temperatura interna (Brown *et al.*, 2002; Buhr *et al.*, 2010; Saini *et al.*, 2012; Chappuis *et al.*, 2013; Gerhart-Hines *et al.*, 2013; Sladek e Sumova, 2013; Lee *et al.*, 2016; Gotic e Schibler, 2017) são

agentes sincronizadores com forte componente endógeno. No presente trabalho, a despeito dos episódios de hipertermia associados às sessões de treinamento, os níveis basais de temperatura interna e corticosterona não foram alterados pelo programa de treinamento. A atividade locomotora, sob influência do SCN, está funcionalmente associada com a atividade da musculatura esquelética (Schaap e Meijer, 2001; Houben *et al.*, 2009; Hughes e Piggins, 2012). Consequentemente, as alterações observadas na atividade locomotora espontânea e na expressão de PER1 apontariam para um provável reajuste diário no sistema de sinalização temporal muscular, diretamente afetado pelo treinamento físico durante a fase de repouso.

Considerados conjuntamente, os resultados obtidos reforçam a hipótese de que o treinamento físico promove alterações no balanço energético e térmico durante o exercício, favorecendo o aumento no desempenho físico. Além disso, ao ser realizado durante a fase clara, o treinamento físico desencadearia adaptações comportamentais em resposta aos novos hábitos determinados pela imposição de uma nova rotina.

6.2.3 Efeito do treinamento físico na atividade monoaminérgica basal no caudado putamen, área pré-óptica e hipotálamo paraventricular

Tendo em vista o aumento de atividade locomotora espontânea diária basal restrito à fase escura e ao aumento na expressão de PER1 no tecido muscular esquelético no início da fase clara, passou-se a considerar a possibilidade de que ajustes no sistema circadiano, independentes do relógio central, poderiam estar associados a mudanças na atividade monoaminérgica central de áreas que participam do controle motor, da termorregulação e da ativação do eixo HPA.

No presente trabalho, observou-se que o treinamento físico durante a fase clara promoveu uma acentuação da atividade dopaminérgica no CPU. Um aumento da atividade dopaminérgica no CPU ou *striatum* tem sido associado a uma maior sinalização dopaminérgica proveniente da *substantia nigra pars compacta* (Foley *et al.*, 2006) e também ao aumento da capacidade física (Hasegawa *et al.*, 2005; Foley *et al.*, 2006; Balthazar *et al.*, 2009; Balthazar *et al.*, 2010; Zheng e Hasegawa, 2016). De fato, animais com maior capacidade aeróbica intrínseca possuem maiores quantidades e atividade de DA nessas regiões diretamente envolvidas com o controle motor, estando associadas à facilitação do início da atividade locomotora espontânea (Rhodes *et al.*, 2005; Mathes *et al.*, 2010; Waters *et al.*, 2013; Rabelo *et al.*, 2015; Saul *et al.*, 2017). Nesse sentido, foi interessante observar que o pico de atividade dopaminérgica, expresso em função da razão DOPAC/DA ocorreu imediatamente antes do início da sessão de exercício. Por sua

vez, o pico do metabólito da DA, DOPAC, ocorreu em ZT6, horário final para realização das sessões de treinamento. Dessa maneira, pode-se concluir que o treinamento físico realizado durante a fase clara pode desencadear tanto o aumento de atividade dopaminérgica na via nigroestriatal normalmente associada com o aumento da capacidade de resistir à fadiga (Foley *et al.*, 2006) quanto um ajuste temporal no nível de atividade dopaminérgica, facilitando o início da sessão de treinamento.

Adicionalmente, observou-se que o programa de treinamento proposto atenuou tanto a atividade dopaminérgica quanto a serotoninérgica na POA em condições basais. Interessante ainda a constatação de que os as variações diárias de atividade foram afetadas. De fato, nos animais não treinados, a atividade monoaminérgica na POA aumenta ao longo da fase clara, atingindo um pico de atividade da segunda metade da fase clara até o início da fase escura. Tal redução da atividade monoaminérgica na POA durante a primeira metade da fase clara pode estar associada a um aumento da inibição proveniente da MnPO (Guzman-Ruiz *et al.*, 2015). A mudança de fase desencadearia uma inibição da atividade de MnPO, resultando em aumento da atividade monoaminérgica na POA, modulando a temperatura interna e, conseqüentemente, o próprio estado de ativação do sistema durante a fase ativa do ciclo. Com o treinamento físico regular durante a fase clara, o sistema de controle de temperatura aparentemente alcançou um novo estado de equilíbrio circadiano.

Por sua vez, o programa de treinamento físico utilizado no presente estudo pouco afetou a atividade de DA e 5-HT no PVN. A única alteração significativa foi observada na atividade serotoninérgica diária. Se, nos animais não treinados a razão 5-HIAA/5-HT exibiu um pico no início da fase de atividade, nos animais treinados, o pico ocorreu no início da fase clara (ZT0) e o nadir foi deslocado para a metade da fase de repouso (ZT6). Essa relação temporal se assemelha àquela observada para os níveis de atividade locomotora espontânea no final da fase escura e no segundo pico de expressão de PER1 em ZT0. Nesse sentido, reconhece-se que o PVN constituiria um importante local de integração para a resposta a diferentes estímulos ambientais (Edgar *et al.*, 1997; Fetissov *et al.*, 2000; Kalsbeek *et al.*, 2004; Kalsbeek, Van Der Spek, *et al.*, 2012; Leite *et al.*, 2012). Interessante notar que esse núcleo hipotalâmico recebe diversas projeções noradrenérgicas do *locus coeruleus* no tronco encefálico, um núcleo diretamente relacionado com a modulação do sistema de alerta (Mastorakos *et al.*, 2005). Também recebe input serotoninérgico da *raphe* e de outras regiões que participam dessa modulação do estado de atividade (Hughes e Piggins, 2012). Dessa forma, sugere-se que a alteração

da variação diária de atividade serotoninérgica no PVN configure um forte indício de que esse núcleo constitua parte do eixo de controle extra-SCN da atividade locomotora. Esse papel do PVN é reforçado tanto pela sua participação direta na modulação da resposta de glicocorticoides ao exercício, quanto na sua modulação da atividade locomotora espontânea via inervações pré-autonômicas.

6.3 Efeito da exposição aguda ao frio em diferentes horários do dia nos genes do relógio e nas respostas térmica e metabólica

O experimento 3 revelou pela primeira vez a exposição ao frio em diferentes horários do dia modifica a mobilização e a oxidação de substratos energéticos e promove alterações na expressão gênica de tecidos particularmente ativos durante o protocolo experimental. No músculo sóleo, que participaria da termogênese com tremor, a exposição ao frio aumentou a expressão dos genes que compõem a alça negativa do relógio biológico (PER/CRY). No tecido adiposo marrom, maior responsável pela termogênese sem tremor, a exposição ao frio aumentou a expressão de genes da alça positiva (BMAL-1/CLOCK) e negativa (PER/CRY), além de inibir a expressão de genes controlados pelo relógio, como DBP e REV-ERB α . Tais resultados proporcionam evidências indiretas de que o funcionamento do relógio biológico seria tecido-dependente. Essa modulação poderia ocorrer em função da atuação direta do relógio central na ativação inicial do tecido, ou indiretamente, tanto por sinais do sistema nervoso central independentes do relógio central quanto por sinais gerados periféricamente em resposta a diferentes estímulos ambientais.

6.3.1 *A exposição aguda ao frio em diferentes horários afeta o balanço térmico e a oxidação de substratos*

Os ajustes térmicos e metabólicos induzidos por uma exposição aguda a um ambiente frio são bem conhecidos em modelos experimentais com camundongos (Tokizawa *et al.*, 2009; Virtue *et al.*, 2012; Uchida *et al.*, 2014; Abreu-Vieira *et al.*, 2015; Sato *et al.*, 2015; Tokizawa *et al.*, 2015), com ratos (Davis *et al.*, 1960; Morimoto *et al.*, 1986; Gautier, 2000; Vaillancourt *et al.*, 2009; Nakamura e Morrison, 2011) e também com humanos (Lennon *et al.*, 1967; Weber e Haman, 2005; Haman, 2006; Wijers *et al.*, 2008; Morrison e Nakamura, 2011). De fato, o protocolo de resfriamento empregado no presente estudo também aumentou a produção de calor, principalmente através da modulação conjugada entre os efeitos comportamentais (atividade locomotora, alimentação e ingestão de água), térmicos e metabólicos (T_{interna} , VO_2 , RER, gasto energético e oxidação de substratos).

Decréscimos significativos da temperatura ambiente representam uma ameaça primitiva para o equilíbrio térmico. Com o presente experimento, observou-se que a T_{interna} é resiliente a um estímulo temporalmente limitado de temperatura ambiente reduzida. De fato, após 120 min de resfriamento ambiental, o balanço térmico foi preservado, independentemente do horário da exposição ao frio. Detectou-se um aumento da T_{interna} especialmente quando os animais foram desafiados com um ambiente frio apresentado durante a fase clara. Tal elevação foi restrita aos primeiros 60 minutos de resfriamento ambiental e poderia representar o início da produção de calor induzida pela repentina exposição ao frio.

No modelo utilizado no presente estudo, a transição da fase escura para a fase clara caracteriza-se pelo aumento da perda de calor através da vasodilatação da cauda e pela diminuição do gasto energético (Fuller *et al.*, 1985; Gordon *et al.*, 2002; Refinetti, 2003; 2010). Esse estado inicial de T_{interna} pode representar uma maior sensibilidade desse parâmetro às alterações da atividade locomotora espontânea e metabólica (Machado *et al.*, 2015), resultando em aumento da temperatura interna na primeira hora de exposição ao frio. Já durante a fase escura, a T_{interna} é ligeiramente aumentada em função do aumento do gasto energético e do ritmo circadiano (Refinetti, 2010).

Um impacto imediato do aumento da taxa metabólica induzida pelo frio na T_{interna} pode ser menos perceptível durante a fase escura. Essa suposição pode ser endossada pela observação de um índice térmico aumentado quando a exposição ao frio ocorreu durante a segunda metade da fase escura. De fato, o aumento da produção de calor induzida pela exposição ao frio contrabalanceou a diminuição de T_{interna} dependente do momento do dia. Tal aumento na T_{interna} já foi relatado por outros grupos (Morimoto *et al.*, 1986; Ishiwata *et al.*, 2002; Ishiwata *et al.*, 2004; Nakamura e Morrison, 2011; Mohammed *et al.*, 2016). Nesse sentido, inicialmente, a produção de calor aumentada eleva a T_{interna} de modo a contrabalancear o calor perdido para o ambiente mais frio (Nakamura e Morrison, 2011). À medida que a exposição é sustentada, a perda e a produção de calor atingem um estado de equilíbrio no qual a T_{interna} pode ser preservada com sucesso. Logo, como observado anteriormente com outros agentes potencialmente estressores (Wachulec *et al.*, 1997; Kalsbeek, Liu, *et al.*, 2012; Machado *et al.*, 2015; Machado *et al.*, 2016), parece que o efeito do horário sobre a temperatura interna refletiria uma perturbação transitória nos mecanismos de perda, bem como naqueles de produção de calor. Essa perturbação seria induzida por sinais ambíguos advindos do tempo biológico interno e das vias termorregulatórias que participam nas respostas homeostáticas.

Em conformidade com essa perspectiva, verificou-se que o aumento da taxa metabólica e da atividade locomotora espontânea se baseariam mais na intensidade dos estímulos (representada pelo gradiente de temperatura ambiente) do que no horário. A atividade locomotora espontânea aumentou acentuadamente durante a primeira hora do protocolo de resfriamento e diminuiu nos momentos subsequentes de exposição ao frio. Resultados semelhantes foram descritos por outros autores (Finger, 1976; Ishiwata *et al.*, 2005; Mohammed *et al.*, 2016), sugerindo que isso refletiria mais um comportamento de fuga frente ao frio do que de um mecanismo termogênico direto. De fato, à medida que o ambiente fica mais frio, os animais diminuem a sua atividade locomotora espontânea sem atenuar a taxa metabólica e o gasto energético, o que aponta para uma maior atividade das vias efetoras termogênicas. Além disso, tanto o consumo de oxigênio quanto o gasto energético atingiram estados estáveis de atividade aumentada, independentemente do horário. Isto está de acordo com trabalhos anteriores, quando, em camundongos, se evidenciou que as alterações relativas na taxa metabólica foram semelhantes quando o protocolo de resfriamento começou no início das fases clara e escura (Abreu-Vieira *et al.*, 2015; Tokizawa *et al.*, 2015). Curiosamente, Tokizawa e colaboradores (2015) observaram que os limiares para o aumento da produção de calor foram elevados em fase escura, enquanto que o *curling* comportamental foi antecipado durante a fase clara. Por sua vez, em ratos, observou-se efeito similar do horário nos limiares termorregulatórios durante o exercício (Machado *et al.*, 2016). Esta seria a primeira vez que um efeito do horário em mecanismos de defesa contra o frio foi experimentalmente relatado para o rato. Os resultados apontam para uma modulação dos limiares termogênicos de atividade efetora dependentes do horário, reforçando nossa hipótese de que o sistema circadiano modula os ajustes iniciais necessários para minimizar ou mesmo neutralizar o desafio físico sobre a homeostase térmica provocado pela temperatura ambiente reduzida.

Adicionalmente, embora o equilíbrio térmico tenha sido defendido com sucesso durante a exposição ao frio, independentemente do horário, a utilização de lipídios e carboidratos foi afetada tanto pela duração quanto pelo horário da exposição ao frio. Anteriormente, determinou-se que o resfriamento ambiental fornece um sinal chave para a mudança na predominância da utilização de substratos energéticos para a termogênese com tremor (contração involuntária da musculatura esquelética) e para a sem tremor (decorrente do gradiente de prótons gerado pela atividade oxidativa mitocondrial e controlado pela ação de proteínas desacopladoras no tecido adiposo marrom) (Davis *et al.*, 1960; Banet *et al.*, 1978; Vaillancourt *et al.*, 2009; Nakamura e Morrison, 2011). A aclimação a condições ambientais abaixo da termoneutralidade associada à intensidade da exposição aguda ao

frio determinariam a magnitude da taxa metabólica e a prevalência da via termogênica ativada para gerar calor (Gordon, 1990; Nakamura e Morrison, 2011). Vaillancourt e colaboradores (2009) mostraram que, embora afetando o gasto energético total, abaixo da termoneutralidade (~ 15 °C), as taxas relativas de oxidação de carboidratos, lipídios e proteínas são menos afetadas pela intensidade do resfriamento ambiental. O presente trabalho, foi um dos primeiros a relatar um claro efeito do horário sobre a utilização de substratos energéticos durante a exposição ao frio.

Curiosamente, observou-se que, durante a fase de atividade do ciclo, a exposição ao frio exacerbou a oxidação lipídica e diminuiu a oxidação de carboidratos para um nível similar ao da fase de repouso. O início do resfriamento ambiental durante a fase clara induziu um aumento transitório nas taxas de oxidação de carboidratos. Isso espelharia o primeiro estágio de ação de mecanismos de defesa contra o frio, nos quais o tremor do músculo esquelético consumiria ATP oriundo sobretudo da via glicolítica a fim produzir calor em função da baixa eficiência energética acoplada a hidrólise de ATP para a contração muscular (Gordon, 1990; Adan *et al.*, 1995). À medida que a exposição ao frio persiste, a participação da termogênese com tremor no equilíbrio térmico diminui e um papel primário passa a ser desempenhado pela termogênese sem tremor, com aumento da absorção e da oxidação de lipídios, predominantemente pelo tecido adiposo marrom (Adan *et al.*, 1995; Wijers *et al.*, 2008). Portanto, o horário influencia o equilíbrio entre a utilização de carboidratos e lipídios durante a exposição ao frio, fornecendo mais evidências de que o relógio interno pode também influenciar os ajustes metabólicos em tecidos geradores de calor.

6.3.2 A exposição aguda ao frio em diferentes horários afeta a expressão de genes do relógio de forma tecido-específica

O aumento da produção de calor metabólico, através da atividade muscular involuntária e da termogênese sem tremor durante a exposição a uma temperatura ambiente mais baixa são intensificadas num processo mediado por vias interdependentes no sistema nervoso central (Nakamura e Morrison, 2011). No presente estudo, observou-se que, após 3 horas de exposição ao frio, 13/18 (~72%) e 17/23 (~73%) dos genes avaliados potencialmente envolvidos nos ajustes metabólicos necessários para o aumento da produção de calor induzido pelo frio foram afetados pelo nosso protocolo frio no tecido adiposo marrom e no músculo esquelético sóleo, respectivamente.

Além dos efeitos no metabolismo, também se observou que a exposição ao frio afetou a expressão de genes do relógio e de genes controlados pelo relógio tanto no tecido adiposo

marrom quanto no músculo sóleo. A expressão dos genes do relógio seria modulada por múltiplos fatores, como atividade neuronal (Slat *et al.*, 2013), corticosterona (Balsalobre *et al.*, 2000; Kalsbeek, Van Der Spek, *et al.*, 2012), temperatura interna (Brown *et al.*, 2002; Buhr *et al.*, 2010) e atividade locomotora espontânea (Hughes e Piggins, 2012; Wolff e Esser, 2012). No presente estudo, observou-se que após a exposição ao frio o relógio molecular periférico pode ser influenciado de diferentes formas. No tecido adiposo marrom, 7 dos 8 genes de relógio estudados foram alterados pela menor temperatura ambiental. Especificamente, 5 desses genes foram regulados positivamente após a exposição ao frio, sem uma clara influência do horário sobre esta resposta. Outros já implicaram PER1, PER2, CRY1 e CRY2 na exposição ao frio no tecido adiposo marrom (Chappuis *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2013). Curiosamente, um relógio funcional medeia ajustes moleculares no programa de atividade mitocondrial (Chappuis *et al.*, 2013; Gerhart-Hines *et al.*, 2013; Woldt *et al.*, 2013). No entanto, esta foi a primeira vez que essa regulação positiva da atividade de TAM durante a exposição ao frio foi mostrada em diferentes momentos do dia, reforçando nossa hipótese inicial de que o programa termogênico, que é entrelaçado com a maquinaria do relógio celular (Gerhart-Hines e Lazar, 2015) dependeria da relação entre intensidade do estímulo e o horário do dia.

Apenas 2 desses genes, DBP e REV-ERB α mostraram uma expressão regulada negativamente associada com uma interação com o horário. A atividade de REV-ERB α também seria atenuada após o aumento das demandas energéticas. Importante ainda seria o seu reconhecimento como agente repressor da atividade mitocondrial (Delezie *et al.*, 2012; Gerhart-Hines *et al.*, 2013; Woldt *et al.*, 2013). De fato, observou-se que a expressão reduzida de REV-ERB α é acompanhada por uma expressão aumentada de BMAL1 e PGC1- α , especialmente durante a fase clara, o que aponta para uma mudança dependente do horário na atividade mitocondrial do tecido adiposo marrom em resposta à alteração inesperada da temperatura ambiente.

Em relação ao músculo sóleo, observou-se que metade da expressão dos genes de relógio (PER1, PER2, CRY1 E CRY2) foi afetada pela exposição ao frio. Curiosamente, esses foram os genes da alça negativa do mecanismo canônico central do relógio biológico molecular. Nesse sentido, reajustes do relógio periférico pela exposição a frio (Chappuis *et al.*, 2013) e exercício (Wolff e Esser, 2012) parecem ser dependentes da expressão de PER1/2 (Tahara *et al.*, 2017). Além disso, PER parece ser mais sensível às flutuações de glicocorticoides e ao consequente reajuste do sistema circadiano periférico (Balsalobre *et al.*, 2000). De fato, a exposição ao frio alterou os receptores GR e ADR β tanto no

músculo sóleo quanto no tecido adiposo marrom. Tal achado reforça a ideia que associa a exposição ao frio a reajustes no relógio periférico através de alterações no estado metabólico, uma vez que os genes que codificam a atividade mitocondrial, como CPT1, PGC1 α e PPAR, foram afetados. Além disso, os genes que regulam a captação de substrato (LPL e GLUT4), o estado energético celular (AMPK) e a atividade mitocondrial (CPT1, NAMPT, PGC1 α e PPARs) mostraram uma interação com o horário, sugerindo que componentes-chave do balanço energético celular são relativamente dependentes de informações temporais para determinar a magnitude dos ajustes que favoreçam a sobrevivência em um ambiente frio. Dessa maneira, o presente trabalho não apenas demonstrou efeitos diretos da exposição ao frio no relógio muscular, como também demonstrou que o horário da exposição pode ser um fator limitante para a adaptação muscular inicial à temperatura ambiente mais baixa.

No músculo esquelético, a expressão aumentada de LPL, HSL e FAT/CD36 aponta para uma captação e utilização aumentada de lipídios, o que é corroborado por dados fisiológicos e de expressão molecular de outros (Koonen *et al.*, 2004). Por sua vez, a captação de glicose também foi elevada pela exposição ao frio, como inferido pelo aumento da expressão de GLUT4 no presente trabalho e aqueles realizados por outros (Oliveira *et al.*, 2004; Hanssen *et al.*, 2015). Avaliados conjuntamente, os aumentos da absorção de lipídios e de glicose sugerem uma elevação do estado oxidativo dos substratos energéticos musculares. Reforçando essa avaliação, a expressão de reguladores-chave para o metabolismo intracelular, tais como AMPK, CamK2 α e NAMPT, também aumentou após a exposição ao frio. Acredita-se que a ativação da AMPK face a maiores demandas energéticas (elevação na razão ADP/ATP) regularia os transportadores mitocondriais limitantes para a β -oxidação, CPT1 α/β , bem como fatores de transcrição essenciais para a atividade mitocondrial, tais como PPARs, PGC1 α e FOXO1 (Freyssenet, 2007; Nickerson *et al.*, 2007; Rohas *et al.*, 2007; Schiaffino *et al.*, 2007; Lee e Kim, 2013). De fato, todos esses genes associados com a atividade mitocondrial foram positivamente regulados no músculo esquelético. Os resultados da presente expressão gênica reforçam o papel do músculo esquelético na produção de calor metabólico. Isso é reforçado pelo aumento da expressão do mRNA do HSP90, o que pode estar relacionado com uma maior atividade oxidativa, exigindo mais conteúdo de proteína chaperone para a estabilização das proteínas (Matz *et al.*, 1995).

Apesar de uma forte indicação de atividade metabólica aumentada no músculo sóleo, não se observou um efeito claro da exposição ao frio na atividade da UCP3, isoforma

predominante de proteína desacopladora encontrada no músculo esquelético. Acredita-se que a UCP3 poderia estar diretamente envolvida na produção de calor muscular independente do tremor (Schrauwen e Hesselink, 2003; Wijers *et al.*, 2008). Em linha com nossos resultados, outros demonstraram que a atividade muscular de UCP3 pode não estar envolvida na produção de calor metabólico induzida pelo frio, constituindo um sistema de tamponamento dos ácidos graxos livres intramusculares em abundância durante a exposição ao frio, pelo menos no modelo murino (Boss *et al.*, 1998; Lin *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2013). Ademais, observou-se uma possível influência da estimulação neuronal e hormonal nesses ajustes moleculares, uma vez que a expressão de $ADR\beta_2$ e GR foram reguladas positivamente após a exposição ao frio, o que aponta para uma modulação por vias dependentes desses fatores nos ajustes induzidos pelo frio e no equilíbrio homeostático (Navegantes *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2013; Khan *et al.*, 2016).

No tecido adiposo marrom, os programas de mobilização e de captação dos substratos energéticos foram positivamente regulados pela exposição ao frio como pode-se inferir da expressão aumentada do mRNA de LPL, de FAT/CD36 e de GLUT4. A transcrição de enzimas-chave para a β -oxidação, tal como CPT1 β e ACC1, também foi regulada positivamente pela exposição ao frio. Alinhado com esse achado, a atividade mitocondrial e a biogênese, expressas em função do fator de transcrição essencial PGC1 α , foram aumentadas pela exposição ao frio. A atividade de AMPK, que desempenharia um papel chave na mediação do fluxo metabólico celular, foi ainda estimulada pela exposição ao frio. Esse estado de atividade mitocondrial aumentada seria reforçado pela maior expressão de UCP1 e HSP90 (Matz *et al.*, 1995) concomitantes à menor expressão de CIRPB (Kornmann *et al.*, 2007) após a exposição ao frio. O aumento da atividade termogênica no tecido adiposo marrom é amplamente validado por estudos anteriores e o acúmulo de evidências implica tanto a oxidação de glicose como a oxidação de lipídios na termogênese sem tremor (Puigserver *et al.*, 1998; Puigserver e Spiegelman, 2003; Bezaire *et al.*, 2007; Azzu *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2016).

7 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que a tanto a prática de exercício físico quanto a exposição aguda ao frio afetam o relógio biológico de diferentes formas. Cronicamente, o exercício físico promove adaptações duradouras em diversos níveis do relógio interno. No sistema nervoso central, demonstrou-se pela primeira vez que modula a atividade diária de serotonina e dopamina em núcleos de controle da temperatura interna, de controle motor e do sistema de alarme. Periféricamente, não apenas modifica a expressão diária de PER1 no músculo gastrocnêmio, essencial para a atividade de corrida em esteira, como também aumenta a atividade locomotora espontânea durante a fase escura do ciclo claro/escuro. Dessa maneira, demonstrou-se que o sistema circadiano de controle temporal pode reagir de diferentes formas a diferentes agentes sincronizadores, aplicados aguda ou cronicamente, como o exercício físico e o frio.

Com a realização dos experimentos descritos na presente tese, demonstrou-se que, tanto aguda, quanto cronicamente, a atividade física durante a fase clara do ciclo de sono/vigília modifica os níveis de atividade locomotora espontânea na fase escura. Mesmo em condições de incidência do *zeitgeber* principal do sistema, o exercício regular, provoca ajustes diários no balanço térmico. Esses ajustes refletiriam uma compensação diária do relógio interno frente a hipertermia induzida pelas sessões de treinamento persistente ao longo do restante da fase clara, reforçando a propriedade de arrastamento do relógio biológico. O aumento na transcrição de PER1 observado no início da fase clara nos animais treinados configuraria uma antecipação de uma demanda regular por maior atividade, como acontece normalmente na transição da fase clara para a escura. Esse resultado configura uma forte evidência de que a adaptação temporal à nova rotina ocorreria por uma via parcialmente dependente de regulação neural como depreendido das alterações na variação diária dos balanços dopaminérgico e serotoninérgico na área pré-óptica e no núcleo paraventricular do hipotálamo.

Complementarmente, o presente trabalho demonstrou que há uma interação de natureza recíproca entre o horário do dia e os ajustes desencadeados pela exposição aguda ao ambiente frio. Essa foi a primeira vez que se demonstrou efeitos tecido-específicos da exposição ao frio na expressão de genes do relógio e também de genes controlados pelo relógio biológico. Se, no músculo sóleo, a expressão dos componentes essenciais da alça negativa do relógio molecular (PER/CRY) é aumentada, no tecido adiposo marrom, a alça positiva (BMAL-1/CLOCK) também é afetada. A expressão de genes essenciais para

atividade mitocondrial (PGC1- α) e para a utilização de substratos (tais como, HSL, LPL, UCPs, AMPK, GLUT4, CD36) também foi afetada de formas diferentes nos dois tecidos investigados. Essas mudanças na expressão gênica foram ainda acompanhadas pela modulação da intensidade da mudança na predominância da oxidação de substratos energéticos pelo horário do dia.

Em conjunto, o presente trabalho demonstrou que diferentes agentes sincronizadores influenciam o sistema circadiano de controle temporal em diversos níveis. Como demonstrado para o exercício físico em esteira, a regularidade e a rotina conduzem o sistema a um novo estado de equilíbrio, configurando uma importante ferramenta para regulação não farmacológica e não fótica de distúrbios usualmente associados com o desequilíbrio do relógio biológico.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU-VIEIRA, G. et al. Integration of body temperature into the analysis of energy expenditure in the mouse. *Mol Metab*, v. 4, n. 6, p. 461-70, Jun 2015. ISSN 2212-8778.

ADAN, C. et al. Hindleg muscle energy and substrate balances in cold-exposed rats. *J Exp Biol*, v. 198, n. Pt 6, p. 1243-51, Jun 1995. ISSN 0022-0949 (Print).

ALBRECHT, U. Timing to perfection: the biology of central and peripheral circadian clocks. *Neuron*, v. 74, n. 2, p. 246-60, Apr 2012. ISSN 1097-4199.

ANGELES-CASTELLANOS, M. et al. Scheduled food hastens re-entrainment more than melatonin does after a 6-h phase advance of the light-dark cycle in rats. *J Biol Rhythms*, v. 26, n. 4, p. 324-34, Aug 2011. ISSN 0748-7304.

AOYAMA, S.; SHIBATA, S. The Role of Circadian Rhythms in Muscular and Osseous Physiology and Their Regulation by Nutrition and Exercise. *Front Neurosci*, v. 11, p. 63, 2017. ISSN 1662-4548 (Print)1662-453x.

ASCHOFF, J. Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, v. 25, p. 11-28, 1960. ISSN 0091-7451 (Print)0091-7451.

ASCHOFF, J.; WEVER, R. Human circadian rhythms: a multioscillatory system. *Fed Proc*, v. 35, n. 12, p. 236-32, Oct 1976. ISSN 0014-9446 (Print)0014-9446.

ATKINSON, G. et al. Exercise as a synchroniser of human circadian rhythms: an update and discussion of the methodological problems. *Eur J Appl Physiol*, v. 99, n. 4, p. 331-41, Mar 2007. ISSN 1439-6319.

AZZU, V. et al. The regulation and turnover of mitochondrial uncoupling proteins. *Biochim Biophys Acta*, v. 1797, n. 6-7, p. 785-91, Jun-Jul 2010. ISSN 0006-3002 (Print).

BAILEY, S. P.; DAVIS, J. M.; AHLBORN, E. N. Neuroendocrine and substrate responses to altered brain 5-HT activity during prolonged exercise to fatigue. *J Appl Physiol* (1985), v. 74, n. 6, p. 3006-12, Jun 1993a. ISSN 8750-7587 (Print)0161-7567.

_____. Serotonergic agonists and antagonists affect endurance performance in the rat. *Int J Sports Med*, v. 14, n. 6, p. 330-3, Aug 1993b. ISSN 0172-4622 (Print)0172-4622.

BALSALOBRE, A. Clock genes in mammalian peripheral tissues. *Cell Tissue Res*, v. 309, n. 1, p. 193-9, Jul 2002. ISSN 0302-766X (Print)0302-766x.

BALSALOBRE, A. et al. Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science*, v. 289, n. 5488, p. 2344-7, Sep 29 2000. ISSN 0036-8075 (Print).

BALTHAZAR, C. H. et al. Effects of blockade of central dopamine D1 and D2 receptors on thermoregulation, metabolic rate and running performance. *Pharmacol Rep*, v. 62, n. 1, p. 54-61, 2010 Jan-Feb 2010. ISSN 1734-1140.

_____. Performance-enhancing and thermoregulatory effects of intracerebroventricular dopamine in running rats. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 93, n. 4, p. 465-9, Oct 2009. ISSN 1873-5177.

BANET, M.; HENSEL, H.; LIEBERMANN, H. The central control of shivering and non-shivering thermogenesis in the rat. *J Physiol*, v. 283, p. 569-84, Oct 1978. ISSN 0022-3751 (Print).

BARNA, B. F.; TAKAKURA, A. C.; MOREIRA, T. S. Pontomedullary and hypothalamic distribution of Fos-like immunoreactive neurons after acute exercise in rats. *Neuroscience*, v. 212, p. 120-30, Jun 2012. ISSN 1873-7544.

BEZAIRE, V.; SEIFERT, E. L.; HARPER, M. E. Uncoupling protein-3: clues in an ongoing mitochondrial mystery. *Faseb j*, v. 21, n. 2, p. 312-24, Feb 2007. ISSN 0892-6638.

BOSS, O. et al. Uncoupling protein-3 expression in rodent skeletal muscle is modulated by food intake but not by changes in environmental temperature. *J Biol Chem*, v. 273, n. 1, p. 5-8, Jan 02 1998. ISSN 0021-9258 (Print).

BRIESE, E. Normal body temperature of rats: the setpoint controversy. *Neurosci Biobehav Rev*, v. 22, n. 3, p. 427-36, May 1998. ISSN 0149-7634.

BROWN, S. A. et al. Rhythms of mammalian body temperature can sustain peripheral circadian clocks. *Curr Biol*, v. 12, n. 18, p. 1574-83, Sep 2002. ISSN 0960-9822.

BUHR, E. D.; YOO, S. H.; TAKAHASHI, J. S. Temperature as a universal resetting cue for mammalian circadian oscillators. *Science*, v. 330, n. 6002, p. 379-85, Oct 2010. ISSN 1095-9203.

BUIJS, R. M.; KALSBECK, A. Hypothalamic integration of central and peripheral clocks. *Nat Rev Neurosci*, v. 2, n. 7, p. 521-6, Jul 2001. ISSN 1471-003X (Print).

BUIJS, R. M. et al. Suprachiasmatic nucleus lesion increases corticosterone secretion. *Am J Physiol*, v. 264, n. 6 Pt 2, p. R1186-92, Jun 1993. ISSN 0002-9513 (Print)0002-9513.

BÜTTNER, D.; WOLLNIK, F. Spontaneous short-term fluctuations in the daily pattern of heart rate, body temperature and locomotor activity in the laboratory rat. *Lab Anim*, v. 16, n. 4, p. 319-26, Oct 1982. ISSN 0023-6772.

CAILOTTO, C. et al. The suprachiasmatic nucleus controls the daily variation of plasma glucose via the autonomic output to the liver: are the clock genes involved? *Eur J Neurosci*, v. 22, n. 10, p. 2531-40, Nov 2005. ISSN 0953-816X (Print)0953-816x.

_____. Effects of nocturnal light on (clock) gene expression in peripheral organs: a role for the autonomic innervation of the liver. *PLoS One*, v. 4, n. 5, p. e5650, May 21 2009. ISSN 1932-6203.

CAMPBELL, J. E. et al. Voluntary wheel running initially increases adrenal sensitivity to adrenocorticotrophic hormone, which is attenuated with long-term training. *J Appl Physiol* (1985), v. 106, n. 1, p. 66-72, Jan 2009. ISSN 8750-7587 (Print).

CHAPPUIS, S. et al. Role of the circadian clock gene *Per2* in adaptation to cold temperature. *Mol Metab*, v. 2, n. 3, p. 184-93, 2013. ISSN 2212-8778.

CHEUNG, S. S.; SLEIVERT, G. G. Multiple triggers for hyperthermic fatigue and exhaustion. *Exerc Sport Sci Rev*, v. 32, n. 3, p. 100-6, Jul 2004. ISSN 0091-6331.

CHUNG, S.; SON, G. H.; KIM, K. Adrenal peripheral oscillator in generating the circadian glucocorticoid rhythm. *Ann N Y Acad Sci*, v. 1220, p. 71-81, Mar 2011. ISSN 0077-8923.

CLARK, P. J. et al. Running Reduces Uncontrollable Stress-Evoked Serotonin and Potentiates Stress-Evoked Dopamine Concentrations in the Rat Dorsal Striatum. *PLoS One*, v. 10, n. 11, p. e0141898, 2015. ISSN 1932-6203.

CORDEIRO, L. M. et al. Inhibition of tryptophan hydroxylase abolishes fatigue induced by central tryptophan in exercising rats. *Scand J Med Sci Sports*, v. 24, n. 1, p. 80-8, Feb 2014. ISSN 0905-7188.

DALLMANN, R.; MROSOVSKY, N. Scheduled wheel access during daytime: A method for studying conflicting zeitgebers. *Physiol Behav*, v. 88, n. 4-5, p. 459-65, Jul 30 2006. ISSN 0031-9384 (Print)0031-9384.

DAVIS, T. R. et al. Regulation of shivering and non-shivering heat production during acclimation of rats. *Am J Physiol*, v. 198, p. 471-5, Mar 1960. ISSN 0002-9513 (Print).

DE VISSER, L.; VAN DEN BOS, R.; SPRUIJT, B. M. Automated home cage observations as a tool to measure the effects of wheel running on cage floor locomotion. *Behav Brain Res*, v. 160, n. 2, p. 382-8, May 28 2005. ISSN 0166-4328 (Print)0166-4328.

DELEZIE, J. et al. The nuclear receptor REV-ERB α is required for the daily balance of carbohydrate and lipid metabolism. *Faseb j*, v. 26, n. 8, p. 3321-35, Aug 2012. ISSN 0892-6638.

DEURVEILHER, S.; SEMBA, K. Indirect projections from the suprachiasmatic nucleus to the median preoptic nucleus in rat. *Brain Res*, v. 987, n. 1, p. 100-6, Oct 10 2003. ISSN 0006-8993 (Print).

DIBNER, C.; SCHIBLER, U.; ALBRECHT, U. The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annu Rev Physiol*, v. 72, p. 517-49, 2010. ISSN 0066-4278.

DYAR, K. A. et al. The calcineurin-NFAT pathway controls activity-dependent circadian gene expression in slow skeletal muscle. *Mol Metab*, v. 4, n. 11, p. 823-33, Nov 2015. ISSN 2212-8778.

_____. Muscle insulin sensitivity and glucose metabolism are controlled by the intrinsic muscle clock. *Mol Metab*, v. 3, n. 1, p. 29-41, Feb 2014. ISSN 2212-8778.

EDGAR, D. M.; DEMENT, W. C. Regularly scheduled voluntary exercise synchronizes the mouse circadian clock. *Am J Physiol*, v. 261, n. 4 Pt 2, p. R928-33, Oct 1991. ISSN 0002-9513 (Print)0002-9513.

EDGAR, D. M. et al. Influence of running wheel activity on free-running sleep/wake and drinking circadian rhythms in mice. *Physiol Behav*, v. 50, n. 2, p. 373-8, Aug 1991. ISSN 0031-9384 (Print)0031-9384.

EDGAR, D. M.; REID, M. S.; DEMENT, W. C. Serotonergic afferents mediate activity-dependent entrainment of the mouse circadian clock. *Am J Physiol*, v. 273, n. 1 Pt 2, p. R265-9, Jul 1997. ISSN 0002-9513 (Print)0002-9513.

ESCOBAR, C. et al. Circadian disruption leads to loss of homeostasis and disease. *Sleep Disord*, v. 2011, p. 964510, 2011. ISSN 2090-3545 (Print).

FETISSOV, S. O. et al. Synchronized release of dopamine and serotonin in the medial and lateral hypothalamus of rats. *Neuroscience*, v. 101, n. 3, p. 657-63, 2000. ISSN 0306-4522 (Print).

FINGER, F. W. Relation of general activity in rats to environmental temperature. *Percept Mot Skills*, v. 43, n. 3 pt. 1, p. 875-90, Dec 1976. ISSN 0031-5125 (Print).

FOLEY, T. E.; FLESHNER, M. Neuroplasticity of dopamine circuits after exercise: implications for central fatigue. *Neuromolecular Med*, v. 10, n. 2, p. 67-80, 2008. ISSN 1535-1084 (Print)1535-1084.

FOLEY, T. E. et al. Elevated central monoamine receptor mRNA in rats bred for high endurance capacity: implications for central fatigue. *Behav Brain Res*, v. 174, n. 1, p. 132-42, Nov 01 2006. ISSN 0166-4328 (Print)0166-4328.

FORBES-ROBERTSON, S. et al. Circadian disruption and remedial interventions: effects and interventions for jet lag for athletic peak performance. *Sports Med*, v. 42, n. 3, p. 185-208, Mar 01 2012. ISSN 0112-1642.

FOSTER, R. G.; WULFF, K. The rhythm of rest and excess. *Nat Rev Neurosci*, v. 6, n. 5, p. 407-14, May 2005. ISSN 1471-003X (Print)1471-003x.

FREYSSENET, D. Energy sensing and regulation of gene expression in skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985), v. 102, n. 2, p. 529-40, Feb 2007. ISSN 8750-7587 (Print).

FULLER, A.; CARTER, R. N.; MITCHELL, D. Brain and abdominal temperatures at fatigue in rats exercising in the heat. *J Appl Physiol* (1985), v. 84, n. 3, p. 877-83, Mar 1998. ISSN 8750-7587.

FULLER, C. A.; SULZMAN, F. M.; MOORE-EDE, M. C. Role of heat loss and heat production in generation of the circadian temperature rhythm of the squirrel monkey. *Physiol Behav*, v. 34, n. 4, p. 543-6, Apr 1985. ISSN 0031-9384 (Print).

GARLAND, T., JR. et al. The biological control of voluntary exercise, spontaneous physical activity and daily energy expenditure in relation to obesity: human and rodent perspectives. *J Exp Biol*, v. 214, n. Pt 2, p. 206-29, Jan 15 2011. ISSN 0022-0949.

GAUTIER, H. Body temperature regulation in the rat. *J Therm Biol*, v. 25, n. 4, p. 273-279, Aug 01 2000. ISSN 0306-4565 (Print).

GERHART-HINES, Z. et al. The nuclear receptor Rev-erb α controls circadian thermogenic plasticity. *Nature*, v. 503, n. 7476, p. 410-3, Nov 21 2013. ISSN 0028-0836.

GERHART-HINES, Z.; LAZAR, M. A. Circadian metabolism in the light of evolution. *Endocr Rev*, v. 36, n. 3, p. 289-304, Jun 2015. ISSN 0163-769x.

GLEESON, M. Temperature regulation during exercise. *Int J Sports Med*, v. 19 Suppl 2, p. S96-9, Jun 1998. ISSN 0172-4622.

GONZÁLEZ-ALONSO, J. et al. Influence of body temperature on the development of fatigue during prolonged exercise in the heat. *J Appl Physiol* (1985), v. 86, n. 3, p. 1032-9, Mar 1999. ISSN 8750-7587.

GORDON, C. J. Thermal biology of the laboratory rat. *Physiol Behav*, v. 47, n. 5, p. 963-91, May 1990. ISSN 0031-9384 (Print).

_____. 24-hour control of body temperature in rats. I. Integration of behavioral and autonomic effectors. *Am J Physiol*, v. 267, n. 1 Pt 2, p. R71-7, Jul 1994. ISSN 0002-9513 (Print)0002-9513.

GORDON, C. J.; PUCKETT, E.; PADNOS, B. Rat tail skin temperature monitored noninvasively by radiotelemetry: characterization by examination of vasomotor responses to thermomodulatory agents. *J Pharmacol Toxicol Methods*, v. 47, n. 2, p. 107-14, Mar-Apr 2002. ISSN 1056-8719 (Print).

GOTIC, I.; SCHIBLER, U. Posttranscriptional mechanisms controlling diurnal gene expression cycles by body temperature rhythms. *RNA Biol*, p. 1-5, Mar 02 2017. ISSN 1547-6286.

GUZMAN-RUIZ, M. A. et al. Role of the Suprachiasmatic and Arcuate Nuclei in Diurnal Temperature Regulation in the Rat. *J Neurosci*, v. 35, n. 46, p. 15419-29, Nov 18 2015. ISSN 0270-6474.

HAMAN, F. Shivering in the cold: from mechanisms of fuel selection to survival. *J Appl Physiol* (1985), v. 100, n. 5, p. 1702-8, May 2006. ISSN 8750-7587 (Print).

HANSSEN, M. J. et al. Short-term cold acclimation improves insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes mellitus. *Nat Med*, v. 21, n. 8, p. 863-5, Aug 2015. ISSN 1078-8956.

HARRINGTON, M. E. Exercise strengthens circadian clocks. *J Physiol*, v. 590, n. 23, p. 5929, Dec 01 2012. ISSN 0022-3751.

HASEGAWA, H. et al. Acute dopamine/norepinephrine reuptake inhibition increases brain and core temperature in rats. *J Appl Physiol* (1985), v. 99, n. 4, p. 1397-401, Oct 2005. ISSN 8750-7587 (Print).

_____. Continuous monitoring of hypothalamic neurotransmitters and thermoregulatory responses in exercising rats. *J Neurosci Methods*, v. 202, n. 2, p. 119-23, Nov 15 2011. ISSN 0165-0270.

HASTINGS, M. H.; REDDY, A. B.; MAYWOOD, E. S. A clockwork web: circadian timing in brain and periphery, in health and disease. *Nat Rev Neurosci*, v. 4, n. 8, p. 649-61, Aug 2003. ISSN 1471-003X (Print)1471-003x.

HOLSCHNEIDER, D. P. et al. Reorganization of functional brain maps after exercise training: Importance of cerebellar-thalamic-cortical pathway. *Brain Res*, v. 1184, p. 96-107, Dec 12 2007. ISSN 0006-8993 (Print)0006-8993.

HOUBEN, T. et al. Correlation with behavioral activity and rest implies circadian regulation by SCN neuronal activity levels. *J Biol Rhythms*, v. 24, n. 6, p. 477-87, Dec 2009. ISSN 0748-7304.

HSIEH, W. H. et al. Simulated shift work in rats perturbs multiscale regulation of locomotor activity. *J R Soc Interface*, v. 11, n. 96, Jul 06 2014. ISSN 1742-5662.

HUGHES, A. T.; PIGGINS, H. D. Feedback actions of locomotor activity to the circadian clock. *Prog Brain Res*, v. 199, p. 305-36, 2012. ISSN 0079-6123.

ISHIWATA, T. et al. Functional role of the preoptic area and anterior hypothalamus in thermoregulation in freely moving rats. *Neurosci Lett*, v. 325, n. 3, p. 167-70, Jun 14 2002. ISSN 0304-3940 (Print).

_____. Changes of body temperature and thermoregulatory responses of freely moving rats during GABAergic pharmacological stimulation to the preoptic area and anterior hypothalamus in several ambient temperatures. *Brain Res*, v. 1048, n. 1-2, p. 32-40, Jun 28 2005. ISSN 0006-8993 (Print).

_____. Changes of body temperature and extracellular serotonin level in the preoptic area and anterior hypothalamus after thermal or serotonergic pharmacological stimulation of freely moving rats. *Life Sci*, v. 75, n. 22, p. 2665-75, Oct 15 2004. ISSN 0024-3205 (Print).

KALSBECK, A. et al. Suprachiasmatic GABAergic inputs to the paraventricular nucleus control plasma glucose concentrations in the rat via sympathetic innervation of the liver. *J Neurosci*, v. 24, n. 35, p. 7604-13, Sep 01 2004. ISSN 0270-6474.

_____. Differential involvement of the suprachiasmatic nucleus in lipopolysaccharide-induced plasma glucose and corticosterone responses. *Chronobiol Int*, v. 29, n. 7, p. 835-49, Aug 2012. ISSN 1525-6073.

_____. SCN outputs and the hypothalamic balance of life. *J Biol Rhythms*, v. 21, n. 6, p. 458-69, Dec 2006. ISSN 0748-7304 (Print)0748-7304.

_____. The diurnal modulation of hormonal responses in the rat varies with different stimuli. *J Neuroendocrinol*, v. 15, n. 12, p. 1144-55, Dec 2003. ISSN 0953-8194 (Print)0953-8194.

_____. Circadian rhythms in the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. *Mol Cell Endocrinol*, v. 349, n. 1, p. 20-9, Feb 2012. ISSN 1872-8057.

KHAN, M. M. et al. Sympathetic innervation controls homeostasis of neuromuscular junctions in health and disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 113, n. 3, p. 746-50, Jan 19 2016. ISSN 0027-8424.

KIDD, P. B.; YOUNG, M. W.; SIGGIA, E. D. Temperature compensation and temperature sensation in the circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 112, n. 46, p. E6284-92, Nov 17 2015. ISSN 0027-8424.

KOONEN, D. P. et al. Different mechanisms can alter fatty acid transport when muscle contractile activity is chronically altered. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, v. 286, n. 6, p. E1042-9, Jun 2004. ISSN 0193-1849 (Print).

KORNMANN, B. et al. System-driven and oscillator-dependent circadian transcription in mice with a conditionally active liver clock. *PLoS Biol*, v. 5, n. 2, p. e34, Feb 2007. ISSN 1544-9173.

KOTZ, C. M.; TESKE, J. A.; BILLINGTON, C. J. Neuroregulation of nonexercise activity thermogenesis and obesity resistance. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 294, n. 3, p. R699-710, Mar 2008. ISSN 0363-6119.

KRIEGSFELD, L. J.; SILVER, R. The regulation of neuroendocrine function: Timing is everything. *Horm Behav*, v. 49, n. 5, p. 557-74, May 2006. ISSN 0018-506X.

LAMBERT, E. V.; ST CLAIR GIBSON, A.; NOAKES, T. D. Complex systems model of fatigue: integrative homeostatic control of peripheral physiological systems during exercise in humans. *Br J Sports Med*, v. 39, n. 1, p. 52-62, Jan 2005. ISSN 1473-0480.

LEASURE, J. L.; JONES, M. Forced and voluntary exercise differentially affect brain and behavior. *Neuroscience*, v. 156, n. 3, p. 456-65, Oct 15 2008. ISSN 0306-4522 (Print)0306-4522.

LEE, P. et al. Brown Adipose Tissue Exhibits a Glucose-Responsive Thermogenic Biorhythm in Humans. *Cell Metab*, v. 23, n. 4, p. 602-9, Apr 12 2016. ISSN 1550-4131.

LEE, Y.; KIM, E. K. AMP-activated protein kinase as a key molecular link between metabolism and clockwork. *Exp Mol Med*, v. 45, p. e33, Jul 26 2013. ISSN 1226-3613.

LEHMAN, M. N. et al. Circadian rhythmicity restored by neural transplant. Immunocytochemical characterization of the graft and its integration with the host brain. *J Neurosci*, v. 7, n. 6, p. 1626-38, Jun 1987. ISSN 0270-6474.

LEITE, L. H. et al. Contribution of the paraventricular nucleus in autonomic adjustments to heat stress. *Exp Biol Med (Maywood)*, v. 237, n. 5, p. 570-7, May 2012. ISSN 1535-3699.

LENNON, J. A.; BRECH, W. J.; GORDON, E. S. Effect of a short period of cold exposure on plasma FFA level in lean and obese humans. *Metabolism*, v. 16, n. 6, p. 503-6, Jun 1967. ISSN 0026-0495 (Print).

LI, S. et al. The biological clock is regulated by adrenergic signaling in brown fat but is dispensable for cold-induced thermogenesis. *PLoS One*, v. 8, n. 8, p. e70109, 2013. ISSN 1932-6203.

LIMA, P. M.; MACHADO, F. S.; COIMBRA, C. C. A study of the reciprocal relationship between the thermal and behavioral effects mediated by anandamide. *Behav Brain Res*, v. 268, p. 111-6, Jul 2014. ISSN 1872-7549.

LIN, B.; COUGHLIN, S.; PILCH, P. F. Bidirectional regulation of uncoupling protein-3 and GLUT-4 mRNA in skeletal muscle by cold. *Am J Physiol*, v. 275, n. 3 Pt 1, p. E386-91, Sep 1998. ISSN 0002-9513 (Print).

LOWELL, B. B.; SPIEGELMAN, B. M. Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature*, v. 404, n. 6778, p. 652-60, Apr 06 2000. ISSN 0028-0836 (Print).

MACHADO, F. S. et al. Influence of Time-of-Day on Maximal Exercise Capacity Is Related to Daily Thermal Balance but Not to Induced Neuronal Activity in Rats. *Front Physiol*, v. 7, p. 464, 2016. ISSN 1664-042x.

MACHADO, F. S.; RODOVALHO, G. V.; COIMBRA, C. C. The time of day differently influences fatigue and locomotor activity: is body temperature a key factor? *Physiol Behav*, v. 140, p. 8-14, Mar 01 2015. ISSN 0031-9384.

MARCHANT, E. G.; MISTLBERGER, R. E. Entrainment and phase shifting of circadian rhythms in mice by forced treadmill running. *Physiol Behav*, v. 60, n. 2, p. 657-63, Aug 1996. ISSN 0031-9384 (Print)0031-9384.

MASTORAKOS, G. et al. Exercise and the stress system. *Hormones (Athens)*, v. 4, n. 2, p. 73-89, 2005 Apr-Jun 2005. ISSN 1109-3099.

MATHES, W. F. et al. Dopaminergic dysregulation in mice selectively bred for excessive exercise or obesity. *Behav Brain Res*, v. 210, n. 2, p. 155-63, Jul 11 2010. ISSN 0166-4328.

MATZ, J. M. et al. Characterization and regulation of cold-induced heat shock protein expression in mouse brown adipose tissue. *Am J Physiol*, v. 269, n. 1 Pt 2, p. R38-47, Jul 1995. ISSN 0002-9513 (Print).

MAYEUF-LOUCHART, A.; STAELS, B.; DUEZ, H. Skeletal muscle functions around the clock. *Diabetes Obes Metab*, v. 17 Suppl 1, p. 39-46, Sep 2015. ISSN 1462-8902.

MAYWOOD, E. S. et al. Rapid down-regulation of mammalian period genes during behavioral resetting of the circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 96, n. 26, p. 15211-6, Dec 21 1999. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424.

MEEUSEN, R. et al. Central fatigue: the serotonin hypothesis and beyond. *Sports Med*, v. 36, n. 10, p. 881-909, 2006. ISSN 0112-1642 (Print).

_____. Brain neurotransmitters in fatigue and overtraining. *Appl Physiol Nutr Metab*, v. 32, n. 5, p. 857-64, Oct 2007. ISSN 1715-5312 (Print).

MENAKER, M.; VOGELBAUM, M. A. Mutant circadian period as a marker of suprachiasmatic nucleus function. *J Biol Rhythms*, v. 8 Suppl, p. S93-8, 1993. ISSN 0748-7304 (Print)0748-7304.

MICHELINI, L. C.; STERN, J. E. Exercise-induced neuronal plasticity in central autonomic networks: role in cardiovascular control. *Exp Physiol*, v. 94, n. 9, p. 947-60, Sep 2009. ISSN 0958-0670.

MOHAMMED, M. et al. Attenuated cold defense responses in orexin neuron-ablated rats. *Temperature (Austin)*, v. 3, n. 3, p. 465-475, 2016. ISSN 2332-8940 (Print).

MOORE, R. Y.; EICHLER, V. B. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res*, v. 42, n. 1, p. 201-6, Jul 13 1972. ISSN 0006-8993 (Print)0006-8993.

MORIMOTO, A. et al. Suppression of non-shivering thermogenesis in the rat by heat-seeking behaviour during cold exposure. *J Physiol*, v. 380, p. 541-9, Nov 1986. ISSN 0022-3751 (Print).

MORRISON, S. F. Central neural control of thermoregulation and brown adipose tissue. *Auton Neurosci*, v. 196, p. 14-24, Apr 2016. ISSN 1566-0702.

MORRISON, S. F.; NAKAMURA, K. Central neural pathways for thermoregulation. *Front Biosci (Landmark Ed)*, v. 16, p. 74-104, 2011. ISSN 1093-4715.

MROSOVSKY, N. Locomotor activity and non-photic influences on circadian clocks. *Biol Rev Camb Philos Soc*, v. 71, n. 3, p. 343-72, Aug 1996. ISSN 1464-7931 (Print)0006-3231.

MROSOVSKY, N.; SALMON, P. A. A behavioural method for accelerating re-entrainment of rhythms to new light-dark cycles. *Nature*, v. 330, n. 6146, p. 372-3, Nov 26-Dec 2 1987. ISSN 0028-0836 (Print)0028-0836.

NAGASHIMA, K. et al. Neuronal circuitries involved in thermoregulation. *Auton Neurosci*, v. 85, n. 1-3, p. 18-25, Dec 2000. ISSN 1566-0702.

NAKAMURA, K.; MORRISON, S. F. Central efferent pathways for cold-defensive and febrile shivering. *J Physiol*, v. 589, n. Pt 14, p. 3641-58, Jul 15 2011. ISSN 0022-3751.

NAVEGANTES, L. C. et al. Catecholamines inhibit Ca(2+)-dependent proteolysis in rat skeletal muscle through beta(2)-adrenoceptors and cAMP. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, v. 281, n. 3, p. E449-54, Sep 2001. ISSN 0193-1849 (Print).

NICKERSON, J. G. et al. Protein-mediated fatty acid uptake: regulation by contraction, AMP-activated protein kinase, and endocrine signals. *Appl Physiol Nutr Metab*, v. 32, n. 5, p. 865-73, Oct 2007. ISSN 1715-5312 (Print).

NOAKES, T. D. Time to move beyond a brainless exercise physiology: the evidence for complex regulation of human exercise performance. *Appl Physiol Nutr Metab*, v. 36, n. 1, p. 23-35, Feb 2011. ISSN 1715-5312 (Print)1715-5312.

OLIVEIRA, R. L. et al. Cold-induced PGC-1alpha expression modulates muscle glucose uptake through an insulin receptor/Akt-independent, AMPK-dependent pathway. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, v. 287, n. 4, p. E686-95, Oct 2004. ISSN 0193-1849 (Print).

OTAWA, M.; ARAI, H.; ATOMI, Y. Molecular aspects of adrenal regulation for circadian glucocorticoid synthesis by chronic voluntary exercise. *Life Sci*, v. 80, n. 8, p. 725-31, Jan 30 2007. ISSN 0024-3205 (Print)0024-3205.

PACÁK, K. et al. Effects of various stressors on in vivo norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus and on the pituitary-adrenocortical axis. *Ann N Y Acad Sci*, v. 771, p. 115-30, Dec 1995. ISSN 0077-8923.

PALKOVITS, M. Isolated removal of hypothalamic or other brain nuclei of the rat. *Brain Res*, v. 59, p. 449-50, Sep 14 1973. ISSN 0006-8993 (Print)0006-8993.

PASTORE, S.; HOOD, D. A. Endurance training ameliorates the metabolic and performance characteristics of circadian Clock mutant mice. *J Appl Physiol* (1985), v. 114, n. 8, p. 1076-84, Apr 2013. ISSN 0161-7567.

PENDERGAST, J. S. et al. Wheel-running activity modulates circadian organization and the daily rhythm of eating behavior. *Front Psychol*, v. 5, p. 177, 2014. ISSN 1664-1078.

PETZINGER, G. M. et al. The Effects of Exercise on Dopamine Neurotransmission in Parkinson's Disease: Targeting Neuroplasticity to Modulate Basal Ganglia Circuitry. *Brain Plast*, v. 1, n. 1, p. 29-39, 2015. ISSN 2213-6304 (Print).

PITTENDRIGH, C. S. Temporal organization: reflections of a Darwinian clock-watcher. *Annu Rev Physiol*, v. 55, p. 16-54, 1993. ISSN 0066-4278.

PUIGSERVER, P.; SPIEGELMAN, B. M. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr Rev*, v. 24, n. 1, p. 78-90, Feb 2003. ISSN 0163-769X (Print).

PUIGSERVER, P. et al. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell*, v. 92, n. 6, p. 829-39, Mar 20 1998. ISSN 0092-8674 (Print).

RABELO, P. C. et al. Intrinsic exercise capacity is related to differential monoaminergic activity in the rat forebrain. *Brain Res Bull*, v. 112, p. 7-13, Mar 2015. ISSN 0361-9230.

RAMKISOENSING, A.; MEIJER, J. H. Synchronization of Biological Clock Neurons by Light and Peripheral Feedback Systems Promotes Circadian Rhythms and Health. *Front Neurol*, v. 6, p. 128, 2015. ISSN 1664-2295. REFINETTI, R. Metabolic heat production, heat loss and the circadian rhythm of body temperature in the rat. *Exp Physiol*, v. 88, n. 3, p. 423-9, May 2003. ISSN 0958-0670.

_____. The circadian rhythm of body temperature. *Front Biosci (Landmark Ed)*, v. 15, p. 564-94, Jan 01 2010. ISSN 1093-4715.

RENSING, L.; RUOFF, P. Temperature effect on entrainment, phase shifting, and amplitude of circadian clocks and its molecular bases. *Chronobiol Int*, v. 19, n. 5, p. 807-64, Sep 2002. ISSN 0742-0528.

REPPERT, S. M.; WEAVER, D. R. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*, v. 418, n. 6901, p. 935-41, Aug 29 2002. ISSN 0028-0836 (Print).

RHODES, J. S.; GAMMIE, S. C.; GARLAND, T., JR. Neurobiology of Mice Selected for High Voluntary Wheel-running Activity. *Integr Comp Biol*, v. 45, n. 3, p. 438-55, Jun 2005. ISSN 1540-7063 (Print).

RODRIGUES, L. O. et al. Heat storage rate and acute fatigue in rats. *Braz J Med Biol Res*, v. 36, n. 1, p. 131-5, Jan 2003. ISSN 0100-879X.

ROELANDS, B. et al. Performance and thermoregulatory effects of chronic bupropion administration in the heat. *Eur J Appl Physiol*, v. 105, n. 3, p. 493-8, Feb 2009. ISSN 1439-6319.

_____. The effects of acute dopamine reuptake inhibition on performance. *Med Sci Sports Exerc*, v. 40, n. 5, p. 879-85, May 2008. ISSN 0195-9131 (Print).

ROHAS, L. M. et al. A fundamental system of cellular energy homeostasis regulated by PGC-1 α . *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 104, n. 19, p. 7933-8, May 08 2007. ISSN 0027-8424 (Print).

ROMANOVSKY, A. A. Thermoregulation: some concepts have changed. Functional architecture of the thermoregulatory system. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 292, n. 1, p. R37-46, Jan 2007. ISSN 0363-6119.

SAINI, C. et al. Simulated body temperature rhythms reveal the phase-shifting behavior and plasticity of mammalian circadian oscillators. *Genes Dev*, v. 26, n. 6, p. 567-80, Mar 15 2012. ISSN 0890-9369.

SALGADO-DELGADO, R. et al. Internal desynchronization in a model of night-work by forced activity in rats. *Neuroscience*, v. 154, n. 3, p. 922-31, Jun 26 2008. ISSN 0306-4522 (Print).

_____. Food intake during the normal activity phase prevents obesity and circadian desynchrony in a rat model of night work. *Endocrinology*, v. 151, n. 3, p. 1019-29, Mar 2010. ISSN 0013-7227.

_____. In a rat model of night work, activity during the normal resting phase produces desynchrony in the hypothalamus. *J Biol Rhythms*, v. 25, n. 6, p. 421-31, Dec 2010. ISSN 1552-4531.

_____. Disruption of circadian rhythms: a crucial factor in the etiology of depression. *Depress Res Treat*, v. 2011, p. 839743, 2011. ISSN 2090-1321.

SANTIAGO, H. P. et al. The improvement of exercise performance by physical training is related to increased hypothalamic neuronal activation. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, v. 43, n. 1, p. 116-24, Jan 2016. ISSN 1440-1681.

SAPER, C. B. The central circadian timing system. *Curr Opin Neurobiol*, v. 23, n. 5, p. 747-51, Oct 2013. ISSN 1873-6882.

SASAKI, H. et al. Forced rather than voluntary exercise entrains peripheral clocks via a corticosterone/noradrenaline increase in PER2::LUC mice. *Sci Rep*, v. 6, p. 27607, Jun 08 2016. ISSN 2045-2322.

SATINOFF, E. et al. Do the suprachiasmatic nuclei oscillate in old rats as they do in young ones? *Am J Physiol*, v. 265, n. 5 Pt 2, p. R1216-22, Nov 1993. ISSN 0002-9513.

SATO, N. et al. Cold exposure and/or fasting modulate the relationship between sleep and body temperature rhythms in mice. *Physiol Behav*, v. 149, p. 69-75, Oct 01 2015. ISSN 0031-9384.

SAUL, M. C. et al. High motivation for exercise is associated with altered chromatin regulators of monoamine receptor gene expression in the striatum of selectively bred mice. *Genes Brain Behav*, v. 16, n. 3, p. 328-341, Mar 2017. ISSN 1601-183x.

SCHAAP, J.; MEIJER, J. H. Opposing effects of behavioural activity and light on neurons of the suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci*, v. 13, n. 10, p. 1955-62, May 2001. ISSN 0953-816X (Print)0953-816x.

SCHEER, F. A. et al. Impact of the human circadian system, exercise, and their interaction on cardiovascular function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 107, n. 47, p. 20541-6, Nov 23 2010. ISSN 0027-8424.

_____. Environmental light and suprachiasmatic nucleus interact in the regulation of body temperature. *Neuroscience*, v. 132, n. 2, p. 465-77, 2005. ISSN 0306-4522.

SCHIAFFINO, S.; SANDRI, M.; MURGIA, M. Activity-dependent signaling pathways controlling muscle diversity and plasticity. *Physiology (Bethesda)*, v. 22, p. 269-78, Aug 2007. ISSN 1548-9213 (Print).

SCHIBLER, U.; RIPPERGER, J.; BROWN, S. A. Peripheral circadian oscillators in mammals: time and food. *J Biol Rhythms*, v. 18, n. 3, p. 250-60, Jun 2003. ISSN 0748-7304 (Print)0748-7304.

SCHRAUWEN, P.; HESSELINK, M. Uncoupling protein 3 and physical activity: the role of uncoupling protein 3 in energy metabolism revisited. *Proc Nutr Soc*, v. 62, n. 3, p. 635-43, Aug 2003. ISSN 0029-6651 (Print).

SCHRODER, E. A.; ESSER, K. A. Circadian rhythms, skeletal muscle molecular clocks, and exercise. *Exerc Sport Sci Rev*, v. 41, n. 4, p. 224-9, Oct 2013. ISSN 0091-6331.

SCHROEDER, A. M.; COLWELL, C. S. How to fix a broken clock. *Trends Pharmacol Sci*, v. 34, n. 11, p. 605-19, Nov 2013. ISSN 0165-6147.

SCHROEDER, A. M. et al. Voluntary scheduled exercise alters diurnal rhythms of behaviour, physiology and gene expression in wild-type and vasoactive intestinal peptide-deficient mice. *J Physiol*, v. 590, n. 23, p. 6213-26, Dec 01 2012. ISSN 0022-3751.

SLADEK, M.; SUMOVA, A. Entrainment of spontaneously hypertensive rat fibroblasts by temperature cycles. *PLoS One*, v. 8, n. 10, p. e77010, 2013. ISSN 1932-6203.

SLAT, E.; FREEMAN, G. M., JR.; HERZOG, E. D. The clock in the brain: neurons, glia, and networks in daily rhythms. *Handb Exp Pharmacol*, n. 217, p. 105-23, 2013. ISSN 0171-2004 (Print)

SMITH, A. D.; ZIGMOND, M. J. Can the brain be protected through exercise? Lessons from an animal model of parkinsonism. *Exp Neurol*, v. 184, n. 1, p. 31-9, Nov 2003. ISSN 0014-4886 (Print).

SO, A. Y. et al. Glucocorticoid regulation of the circadian clock modulates glucose homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 106, n. 41, p. 17582-7, Oct 13 2009. ISSN 0027-8424.

SOARES, D. D.; COIMBRA, C. C.; MARUBAYASHI, U. Tryptophan-induced central fatigue in exercising rats is related to serotonin content in preoptic area. *Neurosci Lett*, v. 415, n. 3, p. 274-8, Mar 30 2007. ISSN 0304-3940 (Print).

SOYA, H. et al. Threshold-like pattern of neuronal activation in the hypothalamus during treadmill running: establishment of a minimum running stress (MRS) rat model. *Neurosci Res*, v. 58, n. 4, p. 341-8, Aug 2007. ISSN 0168-0102.

STEPHAN, F. K.; NUNEZ, A. A. Elimination of circadian rhythms in drinking, activity, sleep, and temperature by isolation of the suprachiasmatic nuclei. *Behav Biol*, v. 20, n. 1, p. 1-61, May 1977. ISSN 0091-6773 (Print)0091-6773.

STEPHAN, F. K.; SWANN, J. M.; SISK, C. L. Entrainment of circadian rhythms by feeding schedules in rats with suprachiasmatic lesions. *Behav Neural Biol*, v. 25, n. 4, p. 545-54, Apr 1979. ISSN 0163-1047.

STEPHAN, F. K.; ZUCKER, I. Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 69, n. 6, p. 1583-6, Jun 1972. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424.

STRANAHAN, A. M.; LEE, K.; MATTSON, M. P. Central mechanisms of HPA axis regulation by voluntary exercise. *Neuromolecular Med*, v. 10, n. 2, p. 118-27, 2008. ISSN 1535-1084 (Print)1535-1084.

TAHARA, Y.; AOYAMA, S.; SHIBATA, S. The mammalian circadian clock and its entrainment by stress and exercise. *J Physiol Sci*, v. 67, n. 1, p. 1-10, Jan 2017. ISSN 1880-6546.

TAKAHASHI, M. et al. Positive association between physical activity and PER3 expression in older adults. *Sci Rep*, v. 7, p. 39771, Jan 03 2017. ISSN 2045-2322.

TAMARU, T. et al. Synchronization of circadian Per2 rhythms and HSF1-BMAL1:CLOCK interaction in mouse fibroblasts after short-term heat shock pulse. *PLoS One*, v. 6, n. 9, p. e24521, 2011. ISSN 1932-6203.

THOMPSON, P. D. et al. The acute versus the chronic response to exercise. *Med Sci Sports Exerc*, v. 33, n. 6 Suppl, p. S438-45; discussion S452-3, Jun 2001. ISSN 0195-9131 (Print)0195-9131.

TOKIZAWA, K.; UCHIDA, Y.; NAGASHIMA, K. Thermoregulation in the cold changes depending on the time of day and feeding condition: physiological and anatomical analyses of involved circadian mechanisms. *Neuroscience*, v. 164, n. 3, p. 1377-86, Dec 15 2009. ISSN 0306-4522.

TOKIZAWA, K. et al. Estimation of the core temperature control during ambient temperature changes and the influence of circadian rhythm and metabolic conditions in mice. *J Therm Biol*, v. 51, p. 47-54, Jul 2015. ISSN 0306-4565 (Print).

UCHIDA, Y.; TOKIZAWA, K.; NAGASHIMA, K. Characteristics of activated neurons in the suprachiasmatic nucleus when mice become hypothermic during fasting and cold exposure. *Neurosci Lett*, v. 579, p. 177-82, Sep 05 2014. ISSN 0304-3940.

VAILLANCOURT, E.; HAMAN, F.; WEBER, J. M. Fuel selection in Wistar rats exposed to cold: shivering thermogenesis diverts fatty acids from re-esterification to oxidation. *J Physiol*, v. 587, n. Pt 17, p. 4349-59, Sep 01 2009. ISSN 0022-3751.

VIRTUE, S.; EVEN, P.; VIDAL-PUIG, A. Below thermoneutrality, changes in activity do not drive changes in total daily energy expenditure between groups of mice. *Cell Metab*, v. 16, n. 5, p. 665-71, Nov 07 2012. ISSN 1550-4131.

VOGELBAUM, M. A.; GALEF, J.; MENAKER, M. Factors determining the restoration of circadian behavior by hypothalamic transplants. *J Neural Transplant Plast*, v. 4, n. 4, p. 239-56, Oct-Dec 1993. ISSN 0792-8483 (Print)0792-8483.

VOGELBAUM, M. A.; MENAKER, M. Temporal chimeras produced by hypothalamic transplants. *J Neurosci*, v. 12, n. 9, p. 3619-27, Sep 1992. ISSN 0270-6474 (Print)0270-6474.

WACHULEC, M. et al. Suprachiasmatic nuclei lesions do not eliminate homeostatic thermoregulatory responses in rats. *J Biol Rhythms*, v. 12, n. 3, p. 226-34, Jun 1997. ISSN 0748-7304 (Print).

WALTERS, T. J. et al. Exercise in the heat is limited by a critical internal temperature. *J Appl Physiol* (1985), v. 89, n. 2, p. 799-806, Aug 2000. ISSN 8750-7587.

WATERS, R. P. et al. Selection for increased voluntary wheel-running affects behavior and brain monoamines in mice. *Brain Res*, v. 1508, p. 9-22, May 01 2013. ISSN 0006-8993.

WEBB, P. The physiology of heat regulation. *Am J Physiol*, v. 268, n. 4 Pt 2, p. R838-50, Apr 1995. ISSN 0002-9513 (Print)0002-9513.

WEBER, J. M.; HAMAN, F. Fuel selection in shivering humans. *Acta Physiol Scand*, v. 184, n. 4, p. 319-29, Aug 2005. ISSN 0001-6772 (Print).

WEINERT, D.; WATERHOUSE, J. Diurnally changing effects of locomotor activity on body temperature in laboratory mice. *Physiol Behav*, v. 63, n. 5, p. 837-43, Mar 1998. ISSN 0031-9384.

WERME, M. et al. Delta FosB regulates wheel running. *J Neurosci*, v. 22, n. 18, p. 8133-8, Sep 15 2002. ISSN 0270-6474.

WESTFALL, S. et al. Time-dependent effects of localized inflammation on peripheral clock gene expression in rats. *PLoS One*, v. 8, n. 3, p. e59808, 2013. ISSN 1932-6203.

WIJERS, S. L. et al. Human skeletal muscle mitochondrial uncoupling is associated with cold induced adaptive thermogenesis. *PLoS One*, v. 3, n. 3, p. e1777, Mar 12 2008. ISSN 1932-6203.

WOLDT, E. et al. Rev-erb-alpha modulates skeletal muscle oxidative capacity by regulating mitochondrial biogenesis and autophagy. *Nat Med*, v. 19, n. 8, p. 1039-46, Aug 2013. ISSN 1078-8956.

WOLFF, G.; ESSER, K. A. Scheduled exercise phase shifts the circadian clock in skeletal muscle. *Med Sci Sports Exerc*, v. 44, n. 9, p. 1663-70, Sep 2012. ISSN 1530-0315.

YAMADA, N. et al. Free-access to a running wheel shortens the period of free-running rhythm in blinded rats. *Physiol Behav*, v. 42, n. 1, p. 87-91, 1988. ISSN 0031-9384 (Print)0031-9384.

_____. Relationship between free-running period and motor activity in blinded rats. *Brain Res Bull*, v. 25, n. 1, p. 115-9, Jul 1990. ISSN 0361-9230 (Print)0361-9230.

YAMANAKA, Y.; HONMA, S.; HONMA, K. Scheduled exposures to a novel environment with a running-wheel differentially accelerate re-entrainment of mice peripheral clocks to new light-dark cycles. *Genes Cells*, v. 13, n. 5, p. 497-507, May 2008. ISSN 1356-9597.

_____. Daily exposure to a running wheel entrains circadian rhythms in mice in parallel with development of an increase in spontaneous movement prior to running-wheel access. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 305, n. 11, p. R1367-75, Dec 2013. ISSN 0363-6119.

_____. Mistimed wheel running interferes with re-entrainment of circadian *Per1* rhythms in the mouse skeletal muscle and lung. *Genes Cells*, v. 21, n. 3, p. 264-74, Mar 2016. ISSN 1356-9597.

YAMAZAKI, S. et al. Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science*, v. 288, n. 5466, p. 682-5, Apr 28 2000. ISSN 0036-8075 (Print)0036-8075.

YANAGITA, S. et al. Effects of spontaneous and forced running on activation of hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurons in rats. *Life Sci*, v. 80, n. 4, p. 356-63, Jan 2007. ISSN 0024-3205.

YANNIELLI, P. C.; MCKINLEY BREWER, J.; HARRINGTON, M. E. Is novel wheel inhibition of *per1* and *per2* expression linked to phase shift occurrence? *Neuroscience*, v. 112, n. 3, p. 677-85, 2002. ISSN 0306-4522 (Print)0306-4522.

YASUMOTO, Y.; NAKAO, R.; OISHI, K. Free access to a running-wheel advances the phase of behavioral and physiological circadian rhythms and peripheral molecular clocks in mice. *PLoS One*, v. 10, n. 1, p. e0116476, 2015. ISSN 1932-6203.

ZHANG, X.; DUBE, T. J.; ESSER, K. A. Working around the clock: circadian rhythms and skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985), v. 107, n. 5, p. 1647-54, Nov 2009. ISSN 0161-7567.

ZHENG, X.; HASEGAWA, H. Central dopaminergic neurotransmission plays an important role in thermoregulation and performance during endurance exercise. *Eur J Sport Sci*, v. 16, n. 7, p. 818-28, Oct 2016. ISSN 1536-7290.

ANEXOS

TABELA A. Níveis de significância na expressão dos genes de interesse no TAM observados com a ANOVA *two way* para o horário do dia, exposição ao frio e interação.

| | n | Horário | Exposição ao frio | Interação |
|-----------------------------------|----------|----------------|--------------------------|------------------|
| BMAL-1 | 80 | <0.0001**** | 0.0002*** | 0.4584 |
| CLOCK | 79 | 0.0542 | 0.0018** | 0.4676 |
| PER1 | 82 | 0.0657 | <0.0001**** | 0.4003 |
| PER2 | 80 | <0.0001**** | <0.0001**** | 0.1492 |
| CRY1 | 82 | 0.0003*** | <0.0001**** | 0.0580 |
| CRY2 | 83 | 0.2550 | <0.0001**** | 0.3824 |
| DBP | 82 | <0.0001*** | <0.0001**** | <0.0001**** |
| REV-ERBα | 80 | <0.0001*** | 0.3983 | 0.0018** |
| CREB | 83 | 0.3688 | 0.0010** | 0.2376 |
| PGC1-α | 83 | 0.0022** | <0.0001**** | 0.0024** |
| PGC1-β | 81 | 0.0673 | 0.8981 | 0.0568 |
| PPAR-α | 82 | 0.0196* | 0.3069 | 0.0592 |
| PPAR-γ | 83 | 0.1241 | 0.1606 | 0.1145 |
| HSP90 | 83 | 0.5366 | <0.0001**** | 0.0321* |
| UCP1 | 82 | 0.0043** | <0.0001**** | 0.3767 |
| CIRP | 81 | <0.0001**** | <0.0001**** | <0.0001**** |
| CPT1-β | 81 | 0.2195 | 0.0011** | 0.2755 |
| AMPK | 82 | 0.0402* | 0.0053** | 0.2437 |
| CD36 | 81 | 0.2195 | 0.0038** | 0.3579 |
| GLUT4 | 83 | 0.4685 | 0.0310* | 0.4725 |
| HSL | 81 | 0.0203* | 0.0390* | 0.2161 |
| LPL | 80 | 0.0756 | <0.0001**** | 0.4909 |
| ADR-β3 | 79 | 0.0572 | 0.0412* | 0.2272 |
| GR | 82 | 0.2009 | 0.0506 | 0.2960 |

| | | | | |
|-------------|----|--------|---------|---------|
| ACC1 | 73 | 0.4955 | 0.0272* | 0.5446 |
| ACC2 | 79 | 0.4957 | 0.3617 | 0.0221* |

Para cada gene de interesse, os valores de p encontrados após a ANOVA *two-way* foram reportados para os efeitos do horário, da exposição ao frio, e da interação entre os dois fatores. *indica $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; $p < 0.0001$.

TABELA B. Níveis de significância na expressão dos genes de interesse no músculo sóleo observados com a ANOVA *two way* para o horário do dia, exposição ao frio e interação.

| | n | Horário | Exposição ao frio | Interação |
|-----------------------------------|----------|----------------|--------------------------|------------------|
| BMAL-1 | 80 | <0.0001**** | 0.4785 | 0.6391 |
| CLOCK | 83 | 0.1868 | 0.0817 | 0.0488* |
| PER1 | 80 | 0.0010** | <0.0001**** | 0.2543 |
| PER2 | 78 | <0.0001**** | <0.0001**** | 0.0183* |
| CRY1 | 81 | <0.0001**** | <0.0001**** | 0.0199* |
| CRY2 | 82 | 0.3535 | 0.0002*** | 0.0016** |
| DBP | 81 | <0.0001**** | 0.3126 | 0.1582 |
| REV-ERBα | 76 | <0.0001**** | 0.7068 | 0.0308* |
| CREB | 83 | 0.7026 | 0.0229* | 0.0521 |
| PGC1-α | 80 | <0.0001**** | <0.0001**** | 0.0006*** |
| PGC1-β | 79 | 0.3707 | 0.0297* | 0.0984 |
| PPAR-α | 82 | 0.0340* | 0.0169* | 0.0136* |
| PPAR-γ | 80 | 0.7800 | 0.0023** | 0.3825 |
| HSP90 | 78 | 0.0401* | 0.1641 | 0.0015** |
| UCP2 | 65 | 0.5029 | 0.0189* | 0.5634 |
| UCP3 | 77 | <0.0001**** | 0.9447 | 0.0009*** |
| CIRP | 83 | 0.7462 | 0.4239 | 0.2013 |
| CPT1-α | 79 | 0.0084** | 0.0009*** | 0.0285* |
| CPT1-β | 82 | 0.1321 | 0.3225 | 0.0004*** |
| AMPK | 83 | 0.4686 | 0.0008*** | 0.0219* |

| | | | | |
|----------------|----|----------|-------------|----------|
| NAMPT-1 | 82 | 0.0655 | 0.0071** | 0.0234* |
| CD36 | 81 | 0.5285 | 0.0830 | 0.0067** |
| GLUT4 | 81 | 0.0071** | <0.0001**** | 0.0062** |
| HSL | 80 | 0.3865 | <0.0001**** | 0.1707 |
| LPL | 82 | 0.4184 | 0.0200* | 0.0125* |
| ADR-β2 | 82 | 0.0170* | <0.0001**** | 0.2198 |
| GR | 83 | 0.3263 | <0.0001**** | 0.0642 |
| FOXO-1 | 80 | 0.3576 | 0.0005*** | 0.3377 |
| ACC2 | 83 | 0.3244 | 0.0300* | 0.0919 |
| mTOR | 74 | 0.5338 | 0.3857 | 0.2628 |
| CAMK2α | 79 | 0.7143 | 0.0104* | 0.3953 |

Para cada gene de interesse, os valores de p encontrados após a ANOVA *two-way* foram reportados para os efeitos do horário, da exposição ao frio, e da interação entre os dois fatores. *indica $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

“Tudo o que acontece, acontece.

Tudo o que, ao acontecer, faz com que outra coisa aconteça, faz com que outra coisa aconteça.

Tudo o que, ao acontecer, faz com que ela mesma aconteça de novo, acontece de novo.

Isso, contudo, não acontece necessariamente em ordem cronológica”.

Douglas Adams – Praticamente inofensiva