

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências do Esporte**

Roberto Carlos Soares Souza Júnior

**A SEPARAÇÃO MATERNA PRECOCE PREJUDICA O DESEMPENHO  
AERÓBICO DE RATOS ADULTOS MACHOS E FÊMEAS EM  
AMBIENTE TEMPERADO, MAS NÃO EM AMBIENTE QUENTE, E NÃO  
MODIFICA AS RESPOSTAS TERMORREGULATÓRIAS DURANTE O  
EXERCÍCIO FÍSICO**

Belo Horizonte

2023

Roberto Carlos Soares Souza Júnior

**A SEPARAÇÃO MATERNA PRECOCE PREJUDICA O DESEMPENHO  
AERÓBICO DE RATOS ADULTOS MACHOS E FÊMEAS EM  
AMBIENTE TEMPERADO, MAS NÃO EM AMBIENTE QUENTE, E NÃO  
MODIFICA AS RESPOSTAS TERMORREGULATÓRIAS DURANTE O  
EXERCÍCIO FÍSICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências do Esporte, da Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências do Esporte.

Orientador: Dr. Samuel Penna Wanner.

Coorientadora: Dra. Patrícia da Conceição RochaRabelo.

Belo Horizonte

2023

S729s Souza Junior, Roberto Carlos Soares  
2023 A separação materna precoce prejudica o desempenho aeróbico de ratos adultos machos e fêmeas em ambiente temperado, mas não em ambiente quente, e não modifica as respostas termorregulatórias durante o exercício físico. [manuscrito] / Roberto Carlos Soares Souza Junior – 2023.  
64 f.: il.

Orientador: Samuel Penna Wanner  
Coorientadora: Patrícia da Conceição Rocha Rabelo

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional.

Bibliografia: f. 52-59

1. Regulação da temperatura corporal – Teses. 2. Ratos – Teses. 3. Desempenho – Teses. I. Wanner, Samuel Penna. II. Rabelo, Patrícia da Conceição Rocha. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional. IV. Título.

CDU: 612:796

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Sheila Margareth Teixeira Adão, CRB 6: n° 2106, da Biblioteca da Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional da UFMG.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA, FISIOTERAPIA E TERAPIA OCUPACIONAL  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DO ESPORTE

### ATA DE DEFESA DE DESSERTAÇÃO DE MESTRADO

Às **14:00 horas** do dia **02 de junho de 2023**, reuniu-se presencialmente a Comissão Examinadora de Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa para julgar, em exame final, o trabalho de **Roberto Carlos Soares Souza Junior**, intitulado “**A SEPARAÇÃO MATERNA PRECOCE PREJUDICA O DESEMPENHO AERÓBICO DE RATOS ADULTOS MACHOS E FÊMEAS EM AMBIENTE TEMPERADO, MAS NÃO EM AMBIENTE QUENTE, E NÃO MODIFICA AS RESPOSTAS TERMORREGULATÓRIAS DURANTE O EXERCÍCIO FÍSICO**”. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Dr. Samuel Penna Wanner EEFFTO/UFMG, orientador, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra para o candidato, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado.

#### MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Samuel Penna Wanner (Orientador) – EEFFTO/UFMG

Prof. Dra. Danusa Dias Soares - EEFFTO/UFMG

Prof. Dr. Paulo Marcelo Andrade de Lima – Universidade do Rio Verde

Após as indicações o candidato foi considerado: **APROVADO**

**Belo Horizonte, 09 de agosto de 2023.**

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Danusa Dias Soares, Professora do Magistério Superior**, em 09/08/2023, às 17:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

11/09/2023 10:55

SEI/UFMG - 2535108 - Ata de defesa de Dissertação/Tese



Documento assinado eletronicamente por **Samuel Penna Wanner, Professor do Magistério Superior**, em 09/08/2023, às 17:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Paulo Marcelo de Andrade Lima, Usuário Externo**, em 11/08/2023, às 16:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2535108** e o código CRC **9DBB3D5C**.

Dedico este trabalho aos meus pais, por todo amor a mim destinado, amo vocês!

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida à mim destinada com saúde e perseverança.

À população brasileira por custear os meus estudos e permitir a realização de pesquisas em universidades públicas.

A todos os animais utilizados no experimento, aos quais tratei com o máximo de respeito e cuidado durante toda a pesquisa.

Aos meus pais, Vera Cléa Silva e Roberto Carlos Soares Souza, por me darem a vida! Obrigado por conceder à mim oportunidade de ir atrás dos meus sonhos, por proporcionar amor, carinho, zelo e cuidado. Obrigado, amo vocês!

Ao meu amigo e co-orientador da minha iniciação científica Nicolas Henrique Santos Barbosa, quem me acolheu desde o primeiro instante no laboratório. Obrigado pela paciência, esforço que você teve durante todo esse processo. Por todos os ensinamentos e conselhos. Como diria a canção: *“Você meu amigo de fé, meu irmão camarada, sorriso de abraço festivo da minha chegada, você que me diz as verdades com frases abertas, amigo você é o mais certo das horas incertas...”*

Ao professor Dr. Samuel Penna Wanner por me aceitar como aluno. Durante este tempo, tive o prazer de conhecer uma pessoa humana, com um coração que não cabe no seu peito, com tamanha bondade. Um profissional dedicado e atencioso. Admirável seu conhecimento científico, suas aulas são incomparáveis, sem dúvida, um exemplo a todos os alunos. Obrigado por confiar na minha capacidade e incentivar minha carreira acadêmica.

A professora Dr<sup>a</sup>. Patrícia da Conceição Rocha Rabelo por contribuir com sua co-orientação e por ser mediadora desse processo. Por todos os ensinamentos e auxílio na preparação do projeto. Pela confiança e pela amizade. Certamente você foi uma das principais incentivadoras da minha carreira acadêmica.

A professora Dra<sup>a</sup> Danusa Dias Soares pelo exemplo de pesquisadora. Pela contribuição científica, impulsionando os alunos do laboratório e encorajando cada um a querer sempre mais, sempre se colocando à disposição para ajudar.

Ao professor Dr. Dawit Albieiro Pinheiro Gonçalves por contribuir com suas ideias precisas. Pela sua energia, entusiasmo e dedicação com os alunos do laboratório, contagiante.

À Kaoma Silva, pertencente ao Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo da UFMG, pelos ensinamentos na identificação do ciclo estral das ratas em seu laboratório. Obrigado pela dedicação e atenção a este estudo.

A todos os professores da Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia

Ocupacional que fizeram e fazem parte da minha formação acadêmica.

Aos meus colegas de laboratório que me ajudaram, em algum momento com conselhos e motivação. Em especial, as minhas amigas Aline Cruz, Camila Berbert e Letícia Castro que dedicaram tempo para ajudar no desenvolvimento do projeto. Obrigado por compartilhar momentos bons, descontraídos, tristes ou alegres. Amo vocês!

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiologia do Exercício (LAFISE) da Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional (EEFFTO) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), com os auxílios concedidos pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).



## RESUMO

Ratos submetidos à separação materna precoce apresentam alterações comportamentais e fisiológicas na vida adulta, as quais são dependentes do sexo dos filhotes. Essas alterações incluem maior aumento da temperatura corporal interna ( $T_{INT}$ ) durante exposição ao ambiente quente e, portanto, a separação materna pode acentuar o aumento da  $T_{INT}$  induzido pelo exercício físico, prejudicando o desempenho aeróbico. O presente estudo investigou as alterações termorregulatórias e de desempenho em ratos adultos machos e fêmeas previamente submetidos à separação materna. Foram utilizados 49 ratos Wistar – 24 machos e 25 fêmeas – divididos nos seguintes grupos: separação materna (filhotes retirados da mãe por 3 h diárias durante 14 dias) e controle. Quando alcançaram 7 semanas de idade, os filhotes foram submetidos a exercícios progressivos até a fadiga e então a exercícios de velocidade constante com duração de 30 min. Os exercícios foram realizados em ambientes temperado (24°C) e quente (32°C). Conforme esperado, o ambiente quente reduziu o desempenho dos ratos e acentou o aumento da  $T_{INT}$  induzido pelo exercício, em relação ao ambiente temperado. Animais submetidos à separação materna realizaram menos trabalho externo, durante o exercício incremental a 24°, mas não a 32°C. A separação materna não influenciou a  $T_{INT}$  nos protocolos de exercício avaliados, independente das condições ambientais. Uma análise secundária revelou que o desempenho das fêmeas foi superior ao dos machos a 24°C, mas inferior a 32°C. De forma geral, as fêmeas apresentaram maiores  $T_{INT}$  durante o exercício do que os machos. Em conclusão, a separação materna precoce prejudica o desempenho de ratos adultos de forma dependente das condições ambientais. Além disso, a separação materna não modifica a  $T_{INT}$  durante o exercício, sugerindo que o prejuízo no desempenho em ambiente temperado seja causado por mecanismos não termorregulatórios.

**Palavras - Chaves:** Desempenho; Separação materna; Termorregulação; Temperatura.

## ABSTRACT

Rats subjected to early maternal separation exhibit behavioral and physiological impairments in adulthood, which depend on the offspring sex. These changes include a greater increase in body core temperature ( $T_{\text{CORE}}$ ) during passive heat exposure and, therefore, maternal separation may enhance the  $T_{\text{CORE}}$  increase induced by physical exercise, impairing aerobic performance. The present study investigated thermoregulatory and performance alterations in adult male and female rats previously subjected to maternal separation. Forty-nine Wistar rats (24 males and 25 females) were divided into the following groups: maternal separation (pups were deprived from their mothers for 3 h daily for 14 days) and control. At 7 weeks of age, the pups were subjected to incremental-speed exercises to fatigue and then to 30 min constant-speed exercises. These exercises were performed in temperate (24°C) and hot (32°C) environments. As expected, the hot environment reduced the rats' performance and enhanced the  $T_{\text{CORE}}$  increase induced by exercise, relative to the temperate environment. Rats subjected to maternal separation performed less external work during incremental exercise at 24°C, but not at 32°C. Maternal separation did not influence  $T_{\text{CORE}}$  during the exercise protocols analyzed, regardless of environmental conditions. A secondary analysis revealed that females performed better than males at 24°C, but worse at 32°C. In general, females had higher  $T_{\text{CORE}}$  during exercise than males. In conclusion, early maternal separation impairs the performance of adult rats in an environmental-dependent manner. Furthermore, maternal separation does not modify  $T_{\text{CORE}}$  during exercise, suggesting that performance impairment in the temperate environment is caused by non-thermoregulatory mechanisms.

**Keywords:** Maternal separation; Performance; Temperature; Thermoregulation.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Diagrama dos grupos experimentais.....	18
Figura 2 – Delineamento experimental.....	20
Figura 3 – Células identificadas em cada fase do ciclo estral.....	59
Gráfico 1 - Trabalho realizado pelos ratos e ratas submetidos a dois exercícios incrementais até a fadiga em ambiente temperado.....	28
Gráfico 2 - Trabalho realizado pelos ratos e ratas submetidos a dois exercícios incrementais até a fadiga em ambiente temperado e quente.....	29
Gráfico 3 - Temperatura colônica (painéis A e B) e da pele da cauda (painéis C e D) dos ratos e ratas ao longo de dois exercícios incrementais até a fadiga em ambiente temperado (painéis A e C) e quente (painéis B e D).....	31
Gráfico 4 - Temperaturas corporais iniciais (painéis A e C) e na fadiga (painéis B e D) dos ratos e ratas submetidos a dois exercícios incrementais em ambiente temperado e quente: temperatura colônica (painéis A e B) e temperatura da pele da cauda (painéis C e D).....	33
Gráfico 5 - Índice de dissipação de calor dos ratos e ratas submetidos a dois exercícios incrementais em ambiente temperado e quente.....	34
Gráfico 6 - Temperatura colônica (painéis A e B) e da pele da cauda (painéis C e D) ao longo do exercício dos ratos e ratas submetidos a dois exercícios constantes de trinta minutos em ambiente temperado (painéis A e C) e quente (painéis B e D).....	35
Gráfico 7 - Temperaturas corporais iniciais (painéis A e C) e finais (painéis B e D) dos ratos e ratas submetidos a dois exercícios constantes em ambiente temperado e quente: temperatura colônica (painéis A e B) e temperatura da pele da cauda (painéis C e D).....	37
Gráfico 8 - Índice de dissipação de calor dos ratos e ratas submetidos a dois exercícios constantes em ambiente temperado e quente.....	38
Gráfico 9 - Temperatura colônica (painéis A e B) e da pele da cauda (painéis C e D) das ratas ao longo de dois exercícios incrementais até a fadiga em ambiente temperado (painéis A e C) e quente (painéis B e D); fases do ciclo estral.....	60
Gráfico 10 - Temperatura colônica (painéis A e B) e da pele da cauda (painéis C e D) ao longo do exercício das ratas submetidas a dois exercícios constantes de trinta minutos em ambiente temperado (painéis A e C) e quente (painéis B e D); fases do ciclo estral.....	61

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Massa corporal dos ratos pertencentes aos quatro grupos experimentais medida em diferentes momentos do delineamento experimental.....	27
Tabela 2 - Massa de diferentes tecidos corporais relativizada pela massa corporal total de ratos pertencentes aos quatro grupos ao final do delineamento experimental.....	28

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA – Análise de variância

BDNF - Fator neurotrófico derivado do cérebro

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CON – Controle

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CV – Coeficiente de variação

IC – Intervalo de confiança da média

IDC – Índice de dissipação de calor

IGF-1 – Fator de crescimento semelhante à insulina-1

J – Joule

kg – Quilograma

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

SM – Separação materna

T<sub>INT</sub> – Temperatura corporal interna

VMÁX – Velocidade máxima

VO<sub>2</sub>MÁX – Consumo máximo de oxigênio

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	15
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
2.1	Cuidados éticos.....	17
2.2	Animais.....	17
2.3	Cálculo do tamanho amostral.....	18
2.4	Delineamento experimental.....	21
2.5	Procedimentos .....	23
2.5.1	Esfregaço vaginal.....	23
2.5.2	Protocolo de separação materna.....	24
2.5.3	Familiarização à corrida em esteira rolante .....	24
2.5.4	Exercícios com aumentos progressivos da intensidade .....	25
2.5.5	Exercício submáximo.....	25
2.5.6	Controle das condições ambientais .....	26
2.6	Variáveis medidas e calculadas .....	26
2.7	Eutanásia .....	27
2.8	Análise estatística .....	27
3	RESULTADOS.....	26
4	DISCUSSÃO.....	39
5	CONCLUSÃO.....	45
	REFERÊNCIAS.....	49
	APÊNDICES.....	59
	ANEXO I.....	63
	ANEXO II.....	64

## 1 INTRODUÇÃO

No estilo de vida moderno, a necessidade de trabalhar é uma tarefa que geralmente compete a todos os integrantes adultos da família. Portanto, a maternidade é, cada vez mais, desafiada perante as responsabilidades sociais impostas pelas nossas demandas cotidianas (OLTRAMARI *et al.*, 2014). Compreende-se que o cuidado materno, tão importante nos primeiros meses de vida, pode ser prejudicado devido à ausência das mães que necessitam se afastar dos filhos para desempenhar rotinas de trabalho fora de casa. O estresse precoce em humanos, incluindo abuso emocional, abuso sexual e conflitos familiares graves, tem sido associado a várias alterações na função cognitiva e estrutura cerebral durante a vida adulta (e.g., menor velocidade de processamento e menor volume do córtex orbitofrontal), particularmente em indivíduos diagnosticados com depressão (SALEH *et al.*, 2017). Além disso, vivenciar trauma físico e emocional e possuir baixo nível socioeconômico durante a infância estão associados ao aumento do risco de desenvolvimento de ansiedade clinicamente significativa em idade adulta mais avançada (LAHDEPURO *et al.*, 2019).

O parto representa um momento de transição especial na relação materno - infantil. A partir desse momento, as conexões anatômicas e funcionais entre mãe e filho, experimentadas durante a gestação, são substituídas por lactação e várias outras interações comportamentais e fisiológicas (KENDLER *et al.*, 2002). Nesse sentido, compreender aspectos relacionados a essas interações comportamentais e fisiológicas é de extrema importância. Todavia, por questões éticas, algumas abordagens de pesquisa, incluindo o procedimento experimental de separação materna precoce, não podem ser empregadas em humanos. Desse modo, a pesquisa em modelo murino (*i.e.*, ratos e camundongos) pode ajudar a compreender melhor a relação materno-infantil em humanos.

Eventos estressantes no início da vida estão associados ao desenvolvimento de doenças psiquiátricas na idade adulta, tais como depressão e ansiedade (HUOT *et al.*, 2002; ANISMAN e MATHESON, 2005). Em modelos experimentais, animais submetidos ao estresse precoce, induzido pelo manuseio e pela privação materna, apresentam prejuízos na formação de circuitos neurais que exercem influências duradouras na função do sistema nervoso central, tais como comportamentos relacionados a emoções (GIACHINO *et al.*, 2007). Alterações nas concentrações de leptina também foram observadas e, dessa forma, prejuízos na modulação do gasto energético e do comportamento da ingestão de alimentos podem desencadear alterações na composição corporal do animal adulto (DJIANE *et al.*, 2008). Em conjunto, as informações acima indicam que a separação materna induz repercussões comportamentais e fisiológicas duradouras nos filhotes, observadas inclusive quando os mesmos atingem a idade adulta.

Estudos anteriores mostraram que ratos machos e fêmeas respondem de forma diferente ao protocolo de separação materna (OOMEN *et al.*, 2009; MARCO *et al.*, 2013). O hipotálamo dos mamíferos é sexualmente dimórfico (CARRER *et al.*, 2002; SAKUMA *et al.*, 2009); por exemplo, neurônios hipotalâmicos amadurecem mais cedo em ratos do que em ratas, mesmo antes do período crítico da maturação quando se observa aumento da produção de esteroides (CARRER *et al.*, 2002; SAKUMA *et al.*, 2009). Além disso, ratos e ratas neonatais possuem diferentes níveis hipotalâmicos de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1), dois importantes fatores neurotróficos produzidos pelo organismo e que são modulados de maneira dependente do sexo biológico, pela separação materna (VIVEROS *et al.*, 2010).

Xu *et al.* (2018) investigaram os efeitos da separação materna nos níveis de proteínas que se ligam ao cálcio – calretinina, importante na neurogênese e neuroproteção – e calbindina, envolvida na aprendizagem, na proteção dos neurônios do hipocampo e em comportamento cognitivos. O estudo também explorou se esses efeitos estavam relacionados ao sexo dos filhotes. Notoriamente, os autores relataram que os machos são relativamente mais vulneráveis ao estresse causado pela separação materna do que as fêmeas, embora os filhotes de ambos os sexos tenham demonstrado prejuízos no aprendizado espacial após a exposição a esse tipo de estresse (XU *et al.*, 2018).

Outro aspecto importante é a associação entre a separação materna precoce e a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-tireoide, visto que esse eixo é importante para a manutenção da homeostase energética (ORTIGA-CARVALHO *et al.*, 2011), a qual é frequentemente desafiada por situações estressantes. Evidências indicam que a separação materna produziu mudanças de longo prazo, específicas ao sexo, na atividade basal do eixo hipotálamo-hipófise-tireoide. Por exemplo, a resposta ao jejum foi modificada nos machos submetidos ao protocolo de separação materna (*e.g.*, menor redução das concentrações séricas de tiroxina e triiodotironina) mas mantida inalterada nas fêmeas (JAIMES-HOY *et al.*, 2016).

Entre os diferentes sistemas fisiológicos afetados pela separação materna precoce, destacamos a termorregulação, foco do presente estudo. Existem evidências robustas de que o estresse psicobiológico leva ao aumento da temperatura corporal interna (ZETHOF *et al.*, 1994; OLIVIER *et al.*, 2003; BOUWKNECHT *et al.*, 2007). Em adição, desordens afetivas podem influenciar negativamente a termorregulação dos indivíduos, induzindo uma maior temperatura interna devido, pelo menos em parte, a prejuízos nos mecanismos de resfriamento corporal (HAYASHIDA *et al.*, 2010; HALE *et al.*, 2013).

A termorregulação pode ser definida como o controle da temperatura corporal em uma faixa estreita de variação, sob condições que envolvem diferentes cargas térmicas



internas e/ou externas ao corpo (IUPS, 2001). O equilíbrio entre a produção e a dissipação de calor de calor corporal, por meio do recrutamento ou da inibição de mecanismos fisiológicos e comportamentais, é essencial para o controle termorregulatório preciso (GORDON *et al.*, 1993; ROMANOVSKY, 2018). Os mamíferos são animais homeotérmicos, cuja temperatura interna é mantida dentro de uma variação estreita, em aproximadamente 37°C, de maneira relativamente independente da temperatura ambiente (IUPS, 2001). Uma característica comumente observada nos animais homeotérmicos é a capacidade de gerar energia térmica (calor) a partir do próprio metabolismo corporal acelerado (*i.e.*, os animais homeotérmicos são comumente espécies taquimetabólicas, ou seja, endotérmicas; ROMANOVSKY, 2018).

Durante o exercício físico, parte da energia transformada a partir do metabolismo é utilizada para gerar trabalho mecânico (contrações musculares) e parte é perdida na forma de calor (BROOKS *et al.*, 1984). Para manter o balanço térmico, o calor produzido pela musculatura ativa deve ser dissipado para o ambiente; caso contrário, o aumento da temperatura interna induzido pelo exercício pode acelerar a fadiga (CHEUNG *et al.*, 2004; NYBO, 2008). Além disso, a falha do organismo em manter o equilíbrio térmico devido ao excesso de calor produzido durante o exercício ou devido à incapacidade de dissipar calor para o ambiente pode resultar em complicações provocadas pelo calor, tais como câimbras, lesões em órgãos ou tecidos e, nos casos mais extremos, choque hipertérmico (SAWKA *et al.*, 2011; KHALIFA *et al.*, 2018). Nesse sentido, uma maior compreensão acerca da termorregulação durante o exercício é importante para o desenvolvimento de estratégias direcionadas para a melhora do desempenho físico e redução da incidência de complicações provocadas pelo calor.

A separação materna favorece a ocorrência de hipertermia decorrente de disfunção na dissipação de calor, conforme evidenciado pela menor vasodilatação da cauda quando os ratos são expostos ao ambiente quente (MELO *et al.*, 2018). Existem evidências indicando que a termorregulação é controlada por vias neurais também envolvidas no controle do movimento e dos estados de humor (RABELO *et al.*, 2015). Essa sobreposição das funções de uma mesma via neural sugere que o impacto da separação materna precoce no desempenho e na dissipação de calor possa ser evidente também durante o exercício físico. Portanto, considerando-se que prejuízos na termorregulação, caracterizados por aumentos exagerados da temperatura interna, podem influenciar o desempenho aeróbico (prolongado), é possível que um estresse precoce na vida dos ratos causados pela separação materna (KENDLER *et al.*, 1999; ANISMAN e MATHESON, 2005; GRONLI *et al.*, 2005), possa contribuir para acelerar a fadiga durante o exercício físico.

O aumento do fluxo sanguíneo na pele da cauda é uma das formas mais eficazes para

que roedores regulem a sua temperatura interna durante o exercício (WANNER *et al.*, 2015). A vasodilatação da pele da cauda é o mecanismo primário de perda de calor em ratos (GRANT *et al.*, 1963; YOUNG *et al.*, 1982), sendo o fluxo sanguíneo da pele da cauda modulado pela atividade vasoconstritora noradrenérgica (O'LEARY *et al.*, 1985; OWENS *et al.*, 2002). Por conseguinte, é razoável propor que a vasodilatação cutânea induzida pelo exercício em ratos resulta da retirada da atividade simpática sobre os vasos da cauda. Sendo assim, uma forma eficaz de termorregulação em roedores, quando expostos a diferentes intensidades de esforços físicos, é aumentar o fluxo sanguíneo na pele da cauda e então aumentar a temperatura local, favorecendo a drenagem de calor a partir do corpo do animal para o meio ambiente (WANNER *et al.*, 2015).

Entretanto, ainda são inexistentes trabalhos na literatura que investigaram possíveis disfunções na dissipação de calor durante o exercício aeróbico causadas pela separação materna precoce. Neste contexto, o desenvolvimento de estudos envolvendo ratos possibilitará maior entendimento sobre a influência das interações comportamentais e fisiológicas entre mães e filhos, no desempenho e nas respostas termorregulatórias induzidas pelo esforço físico nesses filhotes. Por fim, o presente estudo possibilitará compreender se os filhotes machos e fêmeas são afetados de forma diferente pela privação do contato com a mãe nos primeiros dias de vida.

Alguns estudos (WISLOFF *et al.*, 2001; HAZLIP *et al.*, 2015; HOLCOMB *et al.*, 2022) investigaram possíveis diferenças no desempenho físico causadas pelo sexo biológico. Os achados desses estudos evidenciam o dimorfismo sexual presentes no sistema músculo-esquelético de mamíferos, retratando uma maior prevalência de fibras lentas e intermediárias (tipo I e IIa) em fêmeas em comparação com machos e sugerindo uma vantagem para o desempenho aeróbico em fêmeas, pois as fibras de contração lenta possuem maior capacidade oxidativa, o que confere ao músculo maior resistência à fadiga (HAZLIP *et al.*, 2015). Além do mais, Holcomb *et al.* (2022) sugeriram que as alterações no metabolismo lipídico seriam responsáveis pela maior capacidade aeróbia em camundongos fêmeas em comparação com os machos. Apesar do uso semelhante de glicose exógena durante o exercício, as fêmeas apresentam concentrações de ácidos graxos séricos e corpos cetônicos mais elevadas, sugerindo maior mobilização desses substratos durante o exercício. Além disso, o conteúdo basal de triglicerídeos do músculo esquelético é maior nas fêmeas, o que pode permitir maior uso de lipídios endógenos como fonte de energia em situações de esforço físico (HOLCOMB *et al.*, 2022). Entretanto, Wisloff *et al.* (2001) relataram que, após 5 a 7 semanas de treinamento aeróbico, ambos os sexos apresentaram aumento do consumo máximo de oxigênio ( $VO_{2máx}$ ), sendo o aumento 15% maior nos machos. Vale ressaltar que o  $VO_{2máx}$  é um dos aspectos fisiológicos determinantes do desempenho físico prolongado (MCLAUGHLIN *et al.*, 2010).

Sob a perspectiva da termorregulação, Lubbe *et al.* (2021) mostraram que a temperatura corporal interna das fêmeas foi cerca de 1,3°C a 1,7°C mais alta em comparação com aquela dos machos, tanto antes quanto após o exercício forçado em esteira rolante; é importante mencionar que os maiores valores de temperatura interna nas fêmeas não foram acompanhados por diferenças na temperatura da pele entre sexos (LUBBE *et al.*, 2021). Esses resultados obtidos recentemente em ratos corroboram dados clínicos mais antigos em que as mulheres foram mais propensas a apresentar prejuízos termorregulatórios em condições de exercício no calor em comparação com os homens (WYNDHAM *et al.*, 1965). Esses prejuízos seriam possivelmente a consequência de diferenças antropométricas que influenciam a transferência de calor a partir do corpo para o meio ambiente, como a área de superfície corporal, a relação entre altura e massa corporal e a espessura de dobras cutâneas, assim como de diferenças na distribuição e número de glândulas sudoríparas em diferentes áreas (WYNDHAM *et al.*, 1965; GAGNON, *et al.* 2012).

O objetivo principal do presente estudo foi verificar as alterações termorregulatórias e de desempenho aeróbico em ratos adultos machos e fêmeas previamente submetidos à separação materna precoce; essas alterações foram avaliadas tanto em ambiente temperado quanto quente. Como objetivo secundário, avaliamos a influência do sexo biológico no desempenho aeróbico e nas alterações termorregulatórias induzidas pelo exercício realizado em diferentes temperaturas ambientes. Hipotetizamos que a separação materna precoce atenuaria a dissipação cutânea de calor para o ambiente, resultando em maior aumento da temperatura interna durante o exercício e consequentemente prejudicando o desempenho nos dois ambientes avaliados. Considerando que o aumento da temperatura interna induzido pelo esforço físico é mais acentuado no ambiente quente em comparação com o ambiente temperado (ZARETSKY *et al.*, 2018; DRUMMOND *et al.*, 2019; HUDSON *et al.*, 2020; SHANG *et al.*, 2021), esperávamos que os efeitos da separação materna fossem mais evidentes sob estresse térmico ambiental. Além disso, hipotetizamos que a separação materna resultaria em alterações termorregulatórias e de desempenho distintas nos filhotes machos e fêmeas. Estudos que investigaram o aprendizado (XU *et al.*, 2018) e alterações endócrinas (JAIMES-HOY *et al.*, 2016) sugerem que os filhotes machos são mais vulneráveis à separação materna precoce do que as fêmeas. Por fim, a nossa terceira hipótese, relacionada ao objetivo secundário, sugere que as fêmeas apresentariam melhor desempenho aeróbico do que os machos, ainda que as fêmeas possam exibir capacidade inferior de dissipar calor e hipertermia mais expressiva enquanto correm.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Cuidados éticos

Todos os procedimentos utilizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e foram conduzidos conforme regulamentação estabelecida pelo conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O número do protocolo que foi submetido e aprovado é 119/2021 (Anexo 1).

### 2.2 Animais

Foram utilizados 8 casais de ratos adultos Wistar, provenientes do Biotério Central da UFMG, para geração da prole. Os ratos foram adquiridos com massa corporal inicial de aproximadamente 250 g. Cada casal foi alojado em uma gaiola mantida no Biotério do Laboratório de Fisiologia do Exercício da UFMG, a uma temperatura seca controlada ( $24 \pm 1^\circ \text{C}$ ), sob um ciclo claro/escuro de 12/12 horas (luzes acesas às 07:00 h). Os ratos tiveram livre acesso à ração (marca Presence) e água filtrada e as gaiolas foram limpas três vezes por semana. Após o período de gestação com duração aproximada de 20 a 22 dias (BAYLIS, 1982), os filhotes foram mantidos com a mãe até o dia do desmame.

Vale ressaltar que foram mantidos, no máximo, 7 animais de cada ninhada com a mãe; os demais filhotes foram eutanasiados por decapitação. A escolha por manter vivos um número limitado de filhotes justifica-se por observações prévias que o tamanho da ninhada impacta fortemente o desenvolvimento de ratos. Por exemplo, o número de irmãos de ninhada influencia o crescimento inicial, assim como as concentrações de corticosterona em condições basais ou na presença de um estímulo ansiogênico (*i.e.*, teste do labirinto em cruz elevado) (RODEL *et al.*, 2010). Em particular, quanto maior o número de irmãos de uma mesma ninhada, menor a massa corporal dos filhotes nos 17° e 33° dias de vida, sugerindo uma nutrição inadequada dos mesmos (RODEL *et al.*, 2010). Além disso, o nosso procedimento está de acordo com estudos publicados que também utilizaram o procedimento da separação materna e limitaram o número de filhotes por ninhada, tais como Hupa *et al.* (2013) – 6 a 8 filhotes – e Maghami *et al.* (2018) – 6 a 7 filhotes. No total, 49 filhotes (24 machos e 25 fêmeas) foram utilizados, quando adultos, nos experimentos envolvendo a realização de exercícios físicos.

### 2.3 Cálculo do tamanho amostral

Para a realização deste cálculo (SAMPAIO, 2007), foram considerados dados previamente publicados referentes à variável tempo de exercício até a fadiga, a qual é uma variável instável, além de ser a principal do estudo: média ( $X$ ) = 41,0 min; desvio-padrão ( $s$ ) = 16,1 min; coeficiente de variação (CV) = 39,2% (RABELO *et al.*, 2015). Para realização do cálculo, também foi utilizada uma amplitude do intervalo de confiança da média (IC) de 25% (SAMPAIO, 2007). O cálculo do tamanho amostral para cada grupo experimental está descrito a seguir:

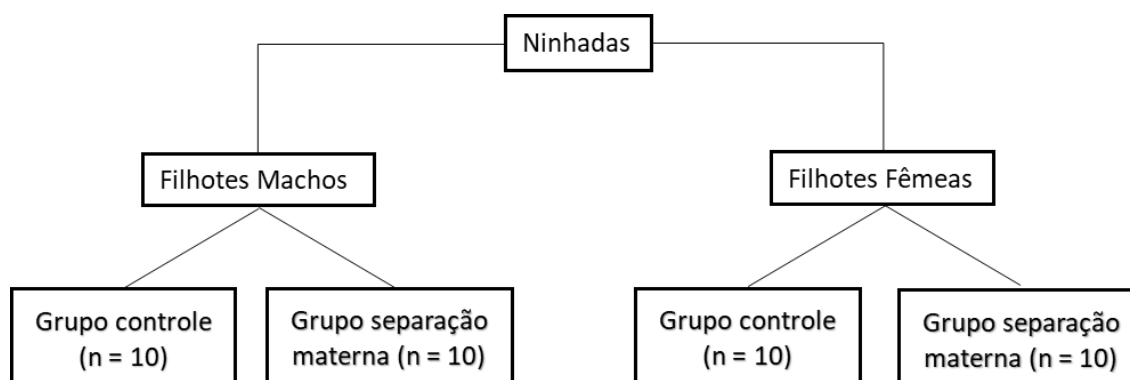
$$\begin{aligned} \text{Fórmula: } X \pm t_{\alpha,gl} * s / \sqrt{n}, \text{ para: } t = 2,0:\text{IC} \\ = 25\% \text{ de } 41,0 \text{ min} = 12,3 \text{ min} \\ 12,3 = 2 * 16,1 / \sqrt{n} \\ n = 9,9 \end{aligned}$$

Portanto, foram utilizadas dez unidades experimentais em cada grupo. Número semelhante de animais, por grupo, foi adotado em estudos anteriores do nosso laboratório, nos quais o tempo até a fadiga foi considerado a variável principal (TEIXEIRA-COELHO *et al.*, 2021).

### 2.4 Delineamento experimental

Os filhotes foram divididos em quatro grupos, contendo 10 animais em cada (Figura1), conforme cálculo do tamanho amostral apresentado anteriormente.

Figura 1 – Diagrama demonstrando os grupos experimentais do presente estudo.



Fonte: do autor

A partir do segundo dia de vida (*i.e.*, no dia seguinte ao nascimento), os filhotes do grupo separação materna foram retirados da mãe, todos os dias por 3 h, entre às 08:30 h e

11:30 h, durante um período de 2 semanas, enquanto os filhotes do grupo controle ficaram com a mãe durante o mesmo período. Após o desmame, realizado quando os ratos atingiram 21 dias de vida (MATTARAIA e MOURA, 2012), os filhotes tiveram o seu sexo identificado e foram mantidos em gaiolas coletivas ( $n = 2$  a 4 filhotes por caixa), até alcançarem aproximadamente 7 semanas de idade. Todos os ratos foram então familiarizados ao exercício físico em esteira rolante.

Na sequência, os ratos foram submetidos a três testes progressivos até a fadiga. O primeiro teste foi realizado a 24°C e teve como objetivo completar a familiarização à corrida em esteira rolante. O segundo e o terceiro testes seguiram uma ordem aleatorizada e cruzada: ambiente temperado (24°C) ou quente (32°C). Após os testes progressivos, os animais foram submetidos a dois exercícios submáximos a 60% da velocidade máxima ( $V_{MÁX}$ ) obtida no ambiente correspondente. Portanto, os exercícios submáximos também foram realizados nos dois ambientes mencionados anteriormente.

A massa corporal dos ratos foi registrada 3 vezes por semana no decorrer dos experimentos. Em todas as situações envolvendo o exercício, as temperaturas colônica e da pele da cauda foram registradas a cada minuto. Para permitir a recuperação do animal, foi dado um intervalo de 48 horas entre cada uma das cinco situações de exercício. Além disso, para determinar a fase do ciclo estral das ratas, foi realizado um esfregaço vaginal após as sessões de exercício. Ao final do experimento, todos os ratos foram eutanasiados por meio de decapitação e tecidos de interesse (tecido adiposo: mesentérico, epididimal e retroperitoneal; tecido muscular: gastrocnêmio) foram retirados para pesagem (FIGURA 2).

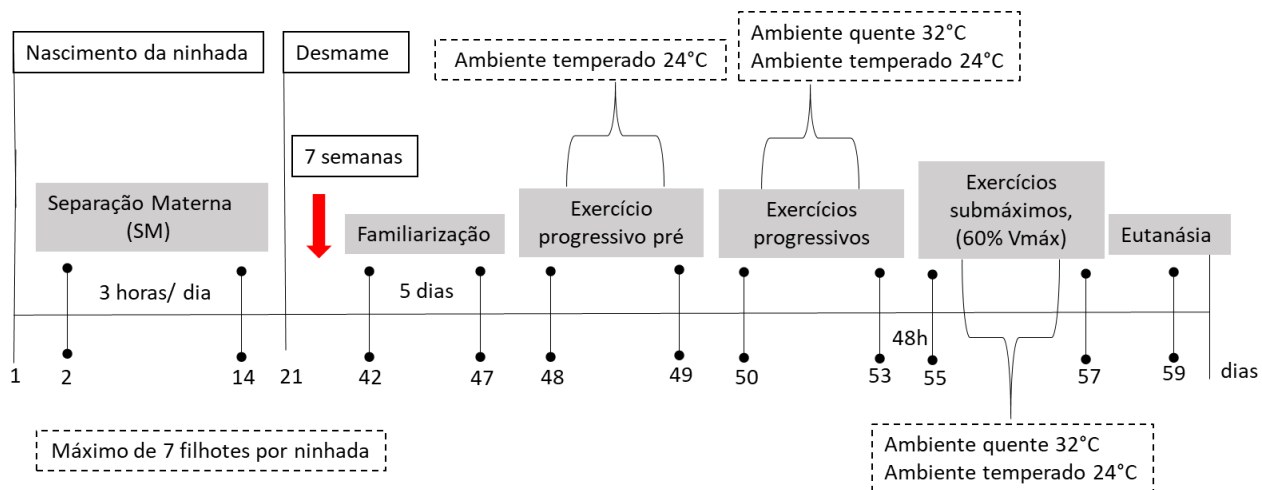


Figura 2 – Delineamento experimental descrevendo desde o protocolo de separação materna até os exercícios para a medida das variáveis termorregulatórias.

## 2.5 Procedimentos

### 2.5.1 Esfregaço vaginal

Durante um mês, sempre após as sessões de exercício, as ratas foram submetidas ao esfregaço vaginal. Inicialmente, a ponta de uma pipeta na plástica foi inserida, de maneira superficial, na vagina da rata. A pipeta estava preenchida com água destilada e foi realizado um movimento delicado de sucção para a coleta da secreção vaginal. Esta foi colocada em lâminas de vidro, corada com cristal violeta (0,1%) e visualizada em microscópio de luz (marca: CN – Inskam modelo: 315W), conectado via USB, a um computador. Três tipos de células foram reconhecidos na secreção vaginal: (1) células epiteliais (redondas e nucleadas); (2) células cornificadas (formato irregular e sem núcleo); e (3) leucócitos (pequenas células redondas). A proporção entre esses tipos celulares foi utilizada para determinação das fases do ciclo estral (LONG *et al.*, 1922; MANDL *et al.*, 1951). O registro da fase do ciclo estral das ratas foi utilizado apenas como um procedimento controle e não determinou a data das situações experimentais, ou seja, as ratas não foram submetidas ao exercício em uma fase específica do ciclo estral.

Os resultados preliminares referentes às respostas termorregulatórias nas diferentes fases do ciclo estral estão descritos no Apêndice 1 desta dissertação. Esta análise foi fundamental para indicar que as diferentes fases do ciclo estral possivelmente não representaram um fator interveniente (*i.e.*, uma covariante) nas comparações dos dados entre machos e fêmeas.

### 2.5.2 Protocolo de separação materna

Entre o segundo e o décimo quarto dia de vida (considerando o dia do nascimento da ninhada como o primeiro dia), os filhotes foram separados da sua mãe por um período de 3 h (EL KHOURY *et al.*, 2006; MRDALJ *et al.*, 2014). Durante o processo de separação, a mãe permaneceu na caixa residência e sua respectiva ninhada foi colocada em uma gaiola de acrílico forrada com manta térmica e maravalha. A manta térmica foi aquecida para manter a temperatura da caixa em 37°C (PLOTSKY e MEANEY 1993; CARD *et al.* 2005). Os filhotes foram devolvidos à mãe após o período de separação. Durante toda a manipulação, os filhotes foram transportados envoltos por maravalha para evitar o contato direto com o pesquisador, reduzindo a possibilidade de recusa pela mãe após o retorno. Os filhotes do grupo controle foram mantidos, em suas gaiolas, na presença de suas respectivas mães, sem serem perturbados.

Vale ressaltar que as gaiolas de ambos os grupos passaram por manutenção de rotina (*i.e.*, troca de maravalha e acréscimo de ração e água) três vezes por semana. No vigésimo primeiro dia de vida, todos os filhotes foram desmamados e alocados em gaiolas coletivas, divididos em grupos de até 4 ratos do mesmo sexo e provenientes da mesma ninhada.

### 2.5.3 Familiarização à corrida em esteira rolante

Todos os ratos foram submetidos a um protocolo de familiarização à corrida em esteira rolante para animais de pequeno porte (PanLab/Harvard Apparatus, Cornellà de Llobregat, Espanha), o qual foi realizado em ambiente temperado (24°C), durante cinco dias consecutivos, conforme protocolo proposto por Teixeira-Coelho *et al.*(2017). O protocolo foi realizado da seguinte forma: 5 min de repouso seguidos de 5 a 7 min de corrida em velocidades compreendidas entre 10 e 15 m/min, com inclinação constante de 5°. Durante a familiarização, os ratos foram encorajados a correr por estímulos elétricos (0,5 mA) fornecidos por uma grade metal posicionada ao final da esteira. O objetivo da familiarização foi ensinar os ratos em qual direção deveriam correr, diminuindo assim a exposição dos mesmos ao estímulo elétrico durante as sessões de exercício físico (WANNER *et al.*, 2007). Nos três últimos dias do protocolo, os ratos foram familiarizados aos procedimentos de medida da temperatura colônica e da pele da cauda; portanto, os sensores para medida dessas temperaturas foram colocados nos ratos antes das sessões de familiarização (BITTENCOURT *et al.*, 2020).



#### 2.5.4 Exercícios com aumentos progressivos da intensidade

Todos os ratos foram submetidos aos exercícios progressivos, os quais foram iniciados a uma velocidade de 10 m/min, com acréscimos de 1 m/min a cada 3 min, até que os animais fadigassem (PRÍMOLA-GOMES *et al.*, 2009). A fadiga foi determinada no momento em que os ratos se mantiveram 10 s parados sobre a grade de estímulo elétrico, o que reflete a incapacidade de acompanhar o ritmo da esteira rolante (WANNER *et al.*, 2015).

Os exercícios progressivos foram realizados para avaliar o desempenho físico aeróbico dos animais, por meio do registro do tempo até a fadiga e da velocidade aeróbica máxima ( $V_{MÁX}$ ) atingida em ambiente temperado e quente. Estudo recente do nosso laboratório indicou que o desempenho de ratos submetidos a este exercício progressivo possui reprodutibilidade moderada ( $ICC = 0,74$ ; ANDRADE *et al.*, 2022).

No dia de cada exercício, o rato foi retirado do biotério em sua gaiola e, na sequência, os sensores para as medidas da temperatura colônica (indicativo da temperatura interna) e temperatura da pele da cauda (indicativo da dissipação cutânea de calor) foram colocados no animal. Logo após, o rato foi posicionado na esteira rolante para o início da corrida. Durante todo o protocolo, as medidas das temperaturas corporais e temperatura ambiente foram registradas a cada minuto. Após a realização do exercício, os sensores foram retirados do rato e este foi colocado novamente em sua gaiola e levado para o biotério.

#### 2.5.5 Exercício submáximo

Cada rato foi submetido a duas corridas de 30 min em intensidade submáxima (60% da  $V_{MÁX}$  obtida no exercício progressivo realizado na mesma temperatura ambiente) em ambiente temperado ou quente. Estudo anterior revelou que 30 min de corrida a 60% da  $V_{MÁX}$  são suficientes para induzir aumentos marcantes na temperatura interna e da cauda de ratos, sem induzir fadiga (DRUMMOND *et al.*, 2016). Além disso, realizando esses exercícios submáximos, nós garantimos que os ratos dos diferentes grupos estavam se exercitando a um mesmo percentual da sua capacidade aeróbica máxima, possibilitando comparações mais precisas. Os procedimentos realizados durante os exercícios submáximos foram semelhantes àqueles realizados durante os exercícios progressivos, exceto as diferenças inerentes aos dois protocolos de corrida.

### 2.5.6 Controle das condições ambientais

A temperatura ambiente foi medida no interior da caixa de acrílico que envolvea esteira com dois termopares, um posicionado na parte frontal e o outro na parte traseira. Nos experimentos que foram realizados em condições temperadas, a temperatura ambiente foi controlada a 24°C com ar condicionado. Dados anteriores sugerem que valores de temperatura variando entre 24°C e 26°C correspondem à extremidade inferior da zona termoneutra de ratos em repouso mantidos dentro da caixa de acrílico que contem a esteira (WANNER *et al.*, 2015; MALHEIROS-LIMA *et al.*, 2018). Nos experimentos em ambiente quente, a temperatura foi controlada em 32°C por meio de dois aquecedores ligados a 1.200 W (Britânia modelo AB 1100, Curitiba, Brasil), um posicionado na frente e o outro atrás da esteira, para evitar o surgimento de um gradiente de temperatura dentro da caixa de acrílico. Estudos anteriores mostraram que ratos correndo a 31-32°C exibem aumentos mais significativos da temperatura corporal interna (abdominal ou colônica) e da temperatura da pele em comparação com ratos correndo a 23–24°C (ZARETSKY *et al.*, 2018; DRUMMOND *et al.*, 2019; HUDSON *et al.*, 2020; SHANG *et al.*, 2021).

### 2.6 Variáveis medidas e calculadas

A velocidade aeróbica máxima ( $\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ ) foi calculada de acordo com a seguinte equação:  $V_{\text{MÁX}} = V + (t_1/t_2)$ , onde  $V$  = velocidade no último estágio concluído em  $\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ ;  $t_1$  = tempo gasto no estágio incompleto em segundos; e  $t_2$  = duração de cada estágio, que correspondeu a 180 s (BITTENCOURT *et al.*, 2020).

Os valores da distância percorrida foram calculados para cada estágio do exercício progressivo, incluindo o estágio incompleto, e então somados; o valor obtido após o somatório correspondeu à distância percorrida ao longo do exercício. O trabalho externo foi calculado em Joules como  $mc \times g \times d \times \sin\theta$ , onde  $mc$  é a massa corporal do animal (kg);  $g$  é a força da gravidade ( $9,8 \text{ m/s}^2$ );  $d$  é a distância percorrida (m); e  $\theta$  é o ângulo de inclinação da esteira (KUNSTETTER *et al.*, 2018; BITTENCOURT *et al.*, 2020).

A temperatura colônica foi medida usando um termistor lubrificado (modelo 4491RJ, Measurement Specialties, EUA), inserido 7 cm além do esfíncter anal, após a remoção das fezes do cólon por meio de massagem externa suave. A temperatura colônica foi considerada um índice de temperatura corporal interna. Conforme evidenciado anteriormente, tanto a temperatura abdominal medida por telemetria quanto a temperatura colônica medida por sonda produziram respostas semelhantes a fármacos que modulam a termorregulação e houve correlações positivas elevadas entre as medidas fornecidas pelos dois métodos (DILSAVER *et al.*, 1992).

A temperatura da pele da cauda foi registrada por um termopar (Instrutheem, modelo

S-09K, SP, Brasil), conectado a um termômetro digital com precisão de 0,01°C (Yellow Springs Instrument Inc., Yellow Springs, OH, EUA). O termopar foi fixado a 1 cm da base, na face lateral da cauda, com fita impermeável. A escolha do posicionamento do termopar foi baseada no estudo de Young e Dawson (1982), o qual demonstrou que a drenagem do sangue ocorre, principalmente, através de veias laterais, localizadas na superfície e próximas à base da cauda.

O índice de dissipação de calor (IDC) foi calculado utilizando-se a seguinte equação:  $(T_{\text{CAUDA}} - T_{\text{AMB}}) / (T_{\text{COL}} - T_{\text{AMB}})$ . O IDC varia de 0 (vasoconstrição máxima) a 1 (vasodilatação máxima) e vem sendo utilizado, por outros trabalhos, para avaliar a dissipação cutânea de calor através cauda de ratos (ROMANOVSKY *et al.*, 2002; PRIMOLA-GOMES *et al.*, 2007; ANDRADE *et al.*, 2022).

## 2.7 Eutanásia

Setenta e duas horas após o último exercício constante, os ratos foram eutanasiados via decapitação. Após a eutanásia, os seguintes tecidos foram retirados para pesagem: tecidos adiposos mesentérico, epididimal e retroperitoneal, além do tecido muscular esquelético do gastrocnêmio.

## 2.8 Análise estatística

Todos os parâmetros avaliados foram testados quanto a sua normalidade e homocedasticidade por meio dos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Como apresentaram distribuição normal e variância igual entre os diferentes grupos, os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão. Os dados de desempenho foram comparados entre grupos (separação materna e controle), sexos (machos e fêmeas) e temperaturas ambientais (24° e 32° C), utilizando-se análise de variância (ANOVA) de três fatores. Uma análise secundária foi realizada para investigar se houve alteração no desempenho entre o exercício progressivo que fez parte do protocolo de familiarização e o exercício progressivo para a medida das variáveis termorregulatórias, ambos executados a 24° C. Neste caso, foi realizada uma nova ANOVA de três fatores: exercícios progressivos (familiarização e medidas termorregulatórias), grupos e sexos.

As curvas de temperatura interna e da cauda foram plotadas para acompanhamento visual das alterações nessas temperaturas ao longo dos exercícios. As seguintes variáveis termorregulatórias foram comparadas utilizando-se ANOVAs de três fatores (grupos, sexos e temperaturas ambientais): temperatura colônica inicial e na fadiga (ou aos 30 min, no caso dos exercícios submáximos), temperatura da cauda inicial e na fadiga (ou aos 30

min) e índice de dissipação de calor na fadiga (ou aos 30 min). Quando as ANOVAs, indicaram a existência de valores de F significativos, foi aplicando o teste *post hoc* de Tukey para identificação das diferenças entre pares de médias. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . Todas as figuras foram elaborados e as análises foram realizadas com auxílio do software Sigma Plot (versão 11.0, Systat Software Inc., San Jose - CA, EUA).

### 3. RESULTADOS

A massa corporal dos animais foi avaliada em sete diferentes momentos do desenho experimental (tabela 1). Em todos os momentos avaliados, observou-se um efeito principal de sexo biológico significativo ( $p < 0,001$ ), sendo que os machos sempre apresentaram maior massa corporal do que as fêmeas; por exemplo, durante os exercícios constantes (ao final do desenho experimental), a diferença de massa entre sexos correspondeu a aproximadamente 100 g. O efeito principal de intervenção não foi significativo na maioria dos momentos avaliados, exceto no exercício constante realizado no ambiente temperado, quando os ratos submetidos à separação materna precoce apresentaram menor massa corporal do que os animais controles. Não foram observadas interações significativas na massa corporal entre sexo biológico e intervenção ao longo do experimento.

**Tabela 1. Massa corporal dos ratos pertencentes aos quatro grupos experimentais medida em diferentes momentos do delineamento experimental.**

MOMENTO	♂ CON (N=14)	♂ SM (N=10)	♀ CON (N=12)	♀ SM (N=13)	P1	P2	P1x2
1° DIA FAMILIARIZAÇÃO	229 ± 5	218 ± 5	170 ± 5	166 ± 3	< 0,001	0,120	0,494
5° DIA FAMILIARIZAÇÃO	252 ± 6	241 ± 5	179 ± 5	176 ± 3	< 0,001	0,143	0,396
1° INCREMENTAL FAMILIARIZAÇÃO	260 ± 5	245 ± 5	186 ± 5	184 ± 3	< 0,001	0,078	0,148
INCREMENTAL TEMPERADO	288 ± 5	285 ± 5	201 ± 6	200 ± 4	< 0,001	0,668	0,856
INCREMENTAL QUENTE	283 ± 5	274 ± 6	202 ± 5	194 ± 3	< 0,001	0,088	0,907
CONSTANTE TEMPERADO	316 ± 4	307 ± 6	216 ± 5	206 ± 3	< 0,001	0,039	0,878
CONSTANTE QUENTE	318 ± 5	308 ± 6	218 ± 5	211 ± 3	< 0,001	0,099	0,780

A massa corporal foi medida em g. Dados expressos como média ± erro padrão; CON: Controle; SM: Separação materna; P1: Efeito principal de sexo biológico; P2: Efeito principal de intervenção; P1x2: Interação entre sexo e intervenção.

Em função das diferenças na massa corporal descritas no parágrafo anterior, o trabalho externo realizado pelos ratos foi utilizado como índice para determinar o desempenho aeróbico durante os exercícios incrementais.

Após 72 h do último exercício constante submáximo, diferentes tecidos corporais dos animais foram retirados e pesados (tabela 2). Em todos os tecidos avaliados, quando a massa dos tecidos foi relativizada pela massa corporal total dos ratos, não foram observados efeitos principais significativos de sexo biológico e intervenção e nem interação significativa entre sexo e intervenção.

**Tabela 2. Massa de diferentes tecidos corporais relativizada pela massa corporal total de ratos pertencentes aos quatro grupos ao final do delineamento experimental.**

TECIDOS CORPORAIS	♂ CON (N= 9)	♂ SM (N=5)	♀ CON (N=12)	♀ SM (N=13)	<i>P</i> 1	<i>P</i> 2	<i>P</i> 1x2
MESENTÉRICO	4,9 ± 0,8	5,9 ± 2	9,0 ± 1,8	5,4 ± 0,7	0,220	0,388	0,117
EPIDIDIMAL	11,2 ± 0,6	11,9 ± 1,2	-	-		0,627	
RETROPERITONEAL	8,3 ± 1,0	9,5 ± 2,0	8,9 ± 1,6	12,4 ± 1,2	0,263	0,140	0,463
GASTROCNÊMIO	5,7 ± 0,2	5,8 ± 0,4	6,1 ± 0,2	6,1 ± 0,2	0,227	0,870	0,700

A massa corporal dos tecidos foi medida em µg/g (micrograma de tecido dividido por grama de massa corporal). Dados expressos como média ± erro padrão; CON: Controle; SM: Separação Materna; *P*1: Efeito principal de sexo biológico; *P*2: Efeito principal de intervenção; *P*1x2: Interação entre sexo e intervenção.

Inicialmente, nós comparamos o trabalho realizado pelos ratos durante dois exercícios incrementais realizados a 24°C. O primeiro correspondeu à última sessão da familiarização enquanto o segundo teve como objetivo realizar medidas termorregulatórias. Essa comparação permitiu avaliar aprendizagem dos ratos em função da repetição do exercício incremental.

A ANOVA three-way não demonstrou a existência de interação significativa entre os três fatores principais ( $F = 1,692$ ;  $p = 0,197$ ) e nem quando esses fatores foram analisados de forma pareada ( $F = 0,003 - 0,596$ ;  $p = 0,442 - 0,960$ ). No entanto, foram observados efeitos principais significativos do momento ( $F = 7,887$ ;  $p = 0,006$ ) e da intervenção ( $F = 3,967$ ;  $p = 0,049$ ), mas não do sexo biológico ( $F = 2,351$ ;  $p = 0,129$ ). Mais especificamente, os ratos realizaram 18,5% mais trabalho no segundo exercício incremental em comparação com o primeiro ( $25,2 \pm 9$  J vs.  $212 \pm 10$  J) e, além disso, os ratos submetidos a separação materna precoce realizaram 10,2% menos trabalho que os controles ( $219 \pm 11$  J vs.  $244 \pm 9$  J).

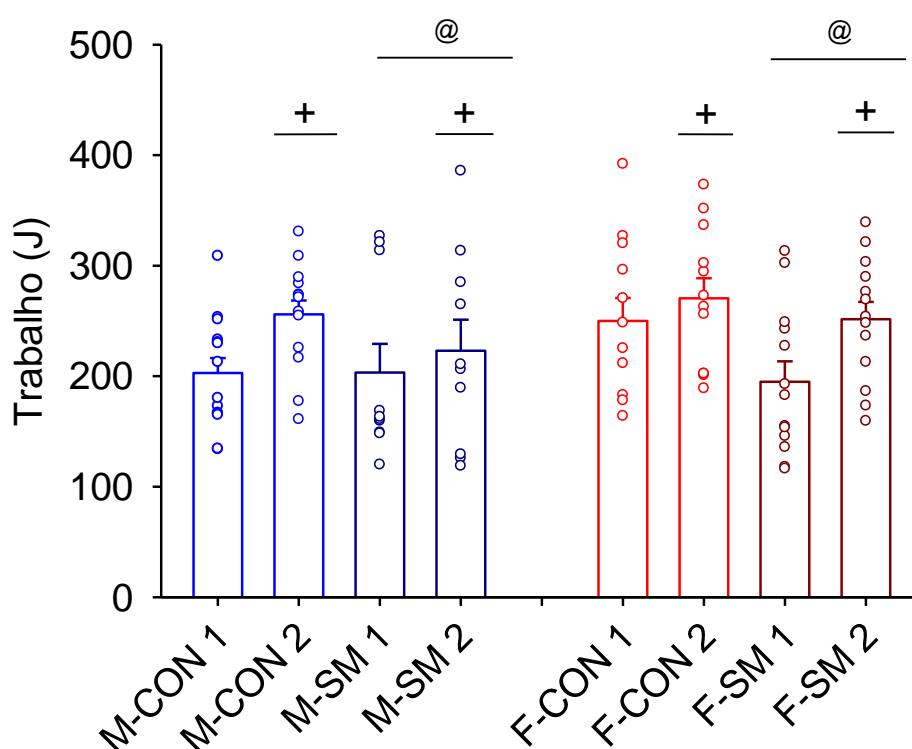


Gráfico 1. Trabalho realizado pelos ratos e ratas submetidos a dois exercícios incrementais até a fadiga em ambiente temperado. Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão. + efeito principal significativo de momento experimental ( $p < 0,05$ ). @ efeito principal significativo de intervenção ( $p < 0,05$ ). Abreviaturas: F-CON = fêmeas controles ( $n = 12$ ); F-SM = fêmeas submetidas à separação materna precoce ( $n = 13$ ); M-CON = machos controles ( $n = 14$ ); M-SM = machos submetidos à separação materna precoce ( $n = 10$ ).

Posteriormente, nós comparamos o trabalho realizado pelos ratos durante dois exercícios incrementais realizados a 24°C (ambiente temperado) e 32°C (ambiente quente).

A ANOVA three-way não demonstrou a existência de interação significativa entre os três fatores principais ( $F = 0,065$ ;  $p = 0,799$ ) e nem interação dupla entre intervenção e ambiente ( $F = 2,991$ ;  $p = 0,087$ ) ou entre sexo e intervenção ( $F = 0,167$ ;  $p = 0,684$ ). Entretanto, foi observada interação significativa entre sexo e ambiente ( $F = 4,851$ ;  $p = 0,030$ ). Mais especificamente, as fêmeas realizaram 7,6% mais trabalho em comparação com os machos no ambiente temperado ( $261 \pm 12$  J vs.  $242 \pm 14$  J), mas 17,1% menos trabalho no ambiente quente ( $109 \pm 5$  J vs.  $131 \pm 9$  J). Por fim, houve efeito principal significativo de ambiente ( $F = 147,613$ ;  $p < 0,001$ ), mas não de intervenção ( $F = 0,504$ ;  $p = 0,480$ ) ou de sexo biológico ( $F = 0,032$ ;  $p = 0,859$ ). Os ratos realizaram 52,4% menos trabalho a 32°C do que 24°C ( $252 \pm 9$  J vs.  $120 \pm 5$  J).

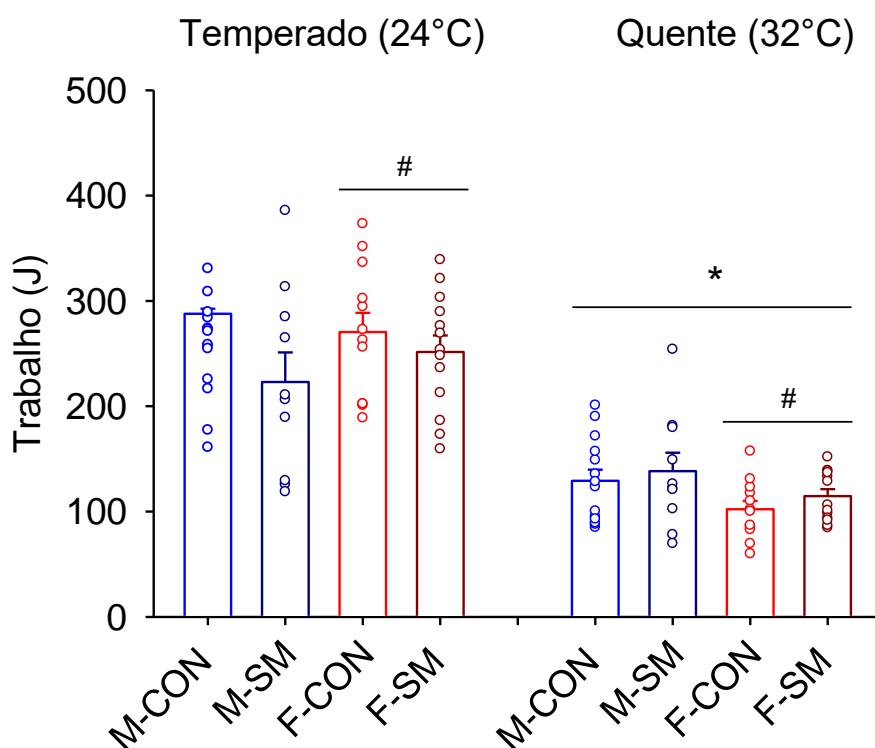


Gráfico 2. Trabalho realizado pelos ratos e ratas submetidos a dois exercícios incrementais até a fadiga em ambiente temperado e quente. Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão. \* efeito principal significativo da temperatura ambiente ( $p < 0,05$ ). # efeito principal significativo de sexo biológico para uma mesma temperatura ambiente ( $p < 0,05$ ). Abreviaturas: F-CON = fêmeas controles ( $n = 12$ ); F-SM = fêmeas submetidas à separação materna precoce ( $n = 13$ ); M-CON = machos controles ( $n = 14$ ); M-SM = machos submetidos à separação materna precoce ( $n = 10$ ).



As alterações das temperaturas colônicas e da pele da cauda foram avaliadas a cada minuto de exercício, até o momento em que todos os ratos ainda estavam correndo (33 min a 24°C e 21 min a 32°C; Gráfico 3A-D). No entanto, essas curvas de temperaturas corporais não foram analisadas com métodos estatísticos, pois teríamos que elaborar uma ANOVA de quatro fatores (intervenção, sexo biológico, temperatura ambiente e tempo durante o exercício), o que poderia gerar um número elevado de interações significativas entre fatores, dificultando a interpretação dos resultados. Portanto, nós decidimos avaliar esses parâmetros termorregulatórios, utilizando-se ferramentas estatísticas, em momentos específicos (no início do exercício e momento da fadiga), eliminando-se o fator tempo durante o exercício das nossas análises. A escolha desses momentos específicos foi realizada por meio de análise visual, visto que as diferenças entre sexos nas temperaturas corporais foram mais evidentes no início do exercício e momento da fadiga, enquanto as diferenças entre ambientes foram mais acentuadas quando os ratos fadigaram.

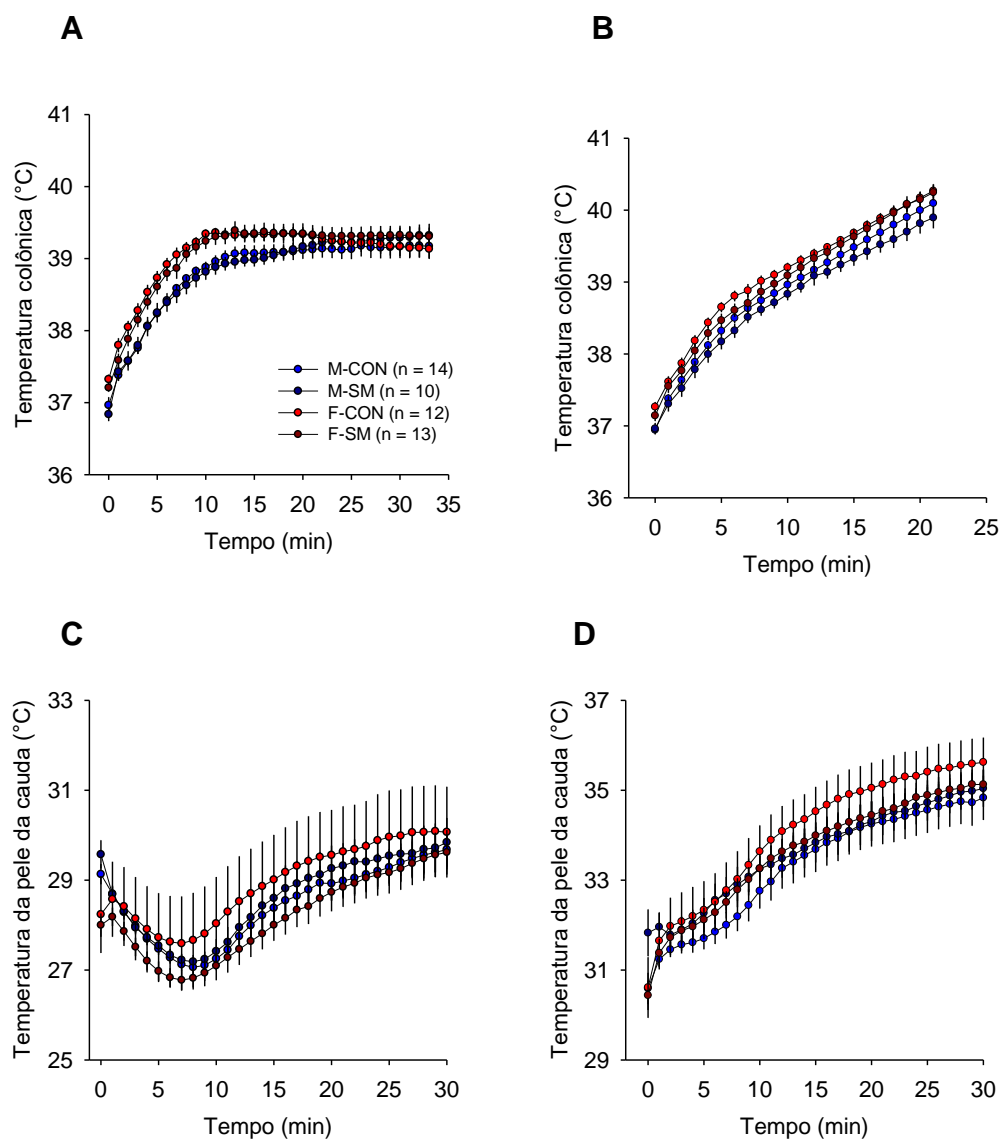


Gráfico 3. Temperatura colônica (painéis A e B) e da pele da cauda (painéis C e D) dos ratos e ratas ao longo de dois exercícios incrementais até a fadiga em ambiente temperado (painéis A e C) e quente (painéis B e D). Abreviaturas: F-CON = fêmeas controles (n = 12); F-SM = fêmeas submetidas à separação materna precoce (n = 13); M-CON = machos controles (n = 14); M-SM = machos submetidos à separação materna precoce (n = 10).

As ANOVAs three-way não demonstraram a existência de interação significativa entre os três fatores principais ( $F = 0,014 - 0,480$ ;  $p = 0,490 - 0,995$ ) e nem quando esses fatores foram analisados de forma pareada ( $F = 0,024 - 1,992$ ;  $p = 0,162 - 0,995$ ) para nenhuma das cinco variáveis analisadas durante o exercício incremental: temperatura colônica inicial e na fadiga, temperatura da pele da cauda inicial e na fadiga (Figura 4A-D), e índice de dissipação de calor na fadiga (Figura 5). Além disso, não foi observado efeito principal de intervenção em nenhuma dessas cinco variáveis ( $F = 0,126 - 2,586$ ;  $p = 0,111 - 0,979$ ).

O fator principal sexo biológico influenciou a temperatura colônica inicial ( $F = 32,365$ ;  $p < 0,001$ ) e na fadiga ( $F = 35,707$ ;  $p < 0,001$ ) e a temperatura da cauda inicial ( $F = 18,402$ ;  $p < 0,001$ ), mas não influenciou a temperatura da cauda ( $F = 0,421$ ;  $p = 0,948$ ) e o índice de dissipação de calor ( $F = 1,345$ ;  $p = 0,249$ ), ambos determinados no momento da fadiga. Mais especificamente, a temperatura colônica das fêmeas foi  $0,30^{\circ}\text{C}$  maior no início do exercício ( $37,23 \pm 0,03^{\circ}\text{C}$  vs.  $36,93 \pm 0,04^{\circ}\text{C}$ ) e  $0,85^{\circ}\text{C}$  maior na fadiga ( $41,21 \pm 0,12^{\circ}\text{C}$  vs.  $40,36 \pm 0,17^{\circ}\text{C}$ ) em relação aos machos. Além disso, a temperatura da cauda inicial das fêmeas foi  $1,26^{\circ}\text{C}$  menor do que a dos machos ( $28,69 \pm 0,28^{\circ}\text{C}$  vs.  $29,95 \pm 0,26^{\circ}\text{C}$ ).

O fator principal temperatura ambiente influenciou a temperatura colônica na fadiga ( $F = 99,030$ ;  $p < 0,001$ ) e a temperatura da cauda inicial ( $F = 70,792$ ;  $p < 0,001$ ) e na fadiga ( $F = 375,657$ ;  $p < 0,001$ ), mas não influenciou a temperatura colônica inicial ( $F = 0,121$   $p = 0,913$ ) e o índice de dissipação de calor na fadiga ( $F = 0,913$ ;  $p = 0,342$ ). Por exemplo, a temperatura colônica na fadiga foi  $1,47^{\circ}\text{C}$  maior a  $32^{\circ}\text{C}$  do que a  $24^{\circ}\text{C}$  ( $41,52 \pm 0,09^{\circ}\text{C}$  vs.  $40,06 \pm 0,14^{\circ}\text{C}$ ). Além disso, as temperaturas da cauda inicial e na fadiga foram, respectivamente,  $2,51^{\circ}\text{C}$  e  $5,32^{\circ}\text{C}$  maiores a  $32^{\circ}\text{C}$  do que a  $24^{\circ}\text{C}$  (e.g., na fadiga,  $35,63 \pm 0,13^{\circ}\text{C}$  vs.  $30,31 \pm 0,23^{\circ}\text{C}$ ).

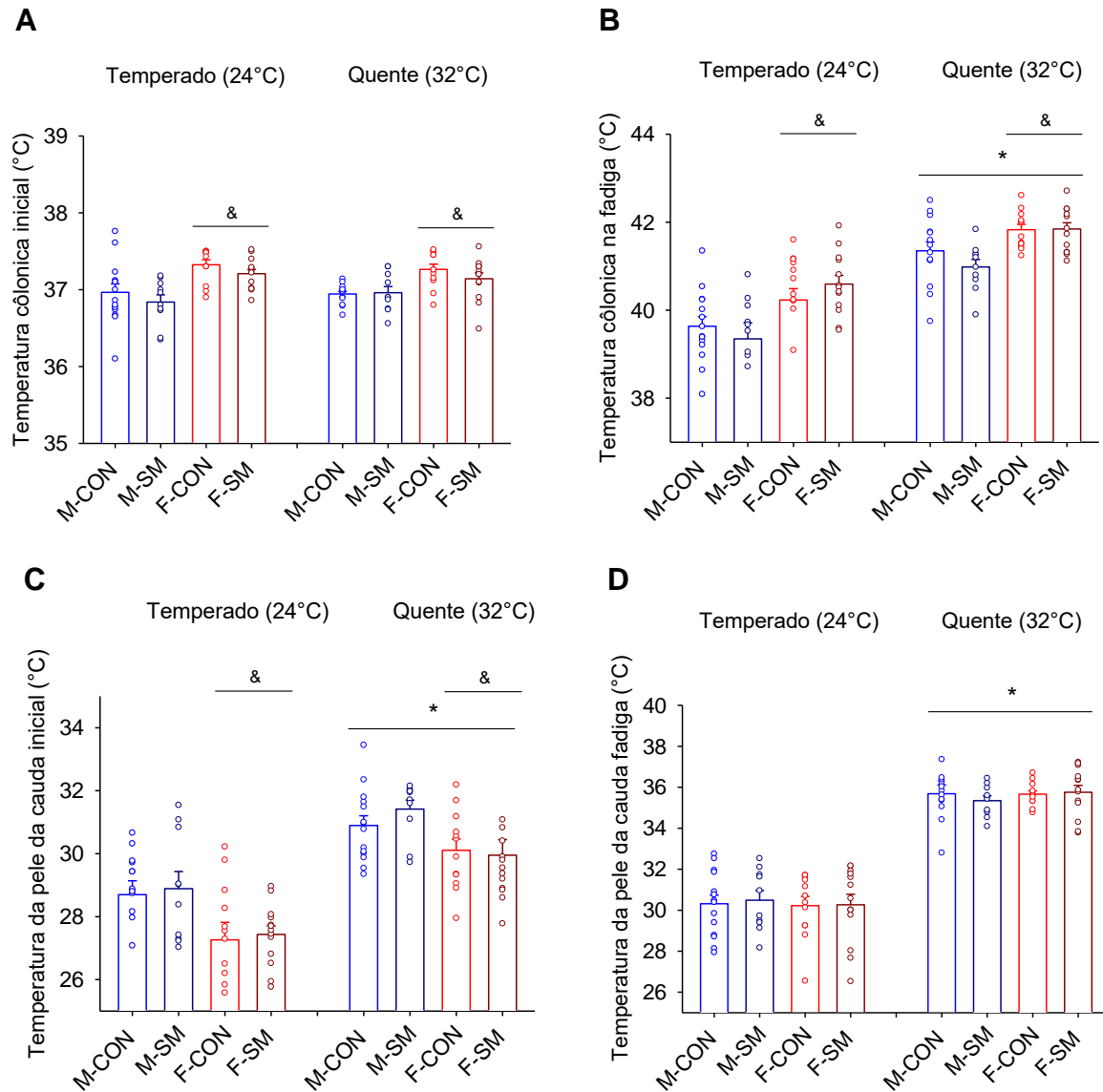


Gráfico 4. Temperaturas corporais iniciais (painéis A e C) e na fadiga (painéis B e D) dos ratos e ratas submetidos a dois exercícios incrementais em ambiente temperado e quente: temperatura colônica (painéis A e B) e temperatura da pele da cauda (painéis C e D). Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão. \* efeito principal significativo de temperatura ambiente ( $p < 0,05$ ). & efeito principal significativo de sexo biológico ( $p < 0,05$ ). Abreviações: F-CON = fêmeas controles ( $n = 12$ ); F-SM = fêmeas submetidas à separação materna precoce ( $n = 13$ ); M-CON = machos controles ( $n = 14$ ); M-SM = machos submetidos à separação materna precoce ( $n = 10$ ).

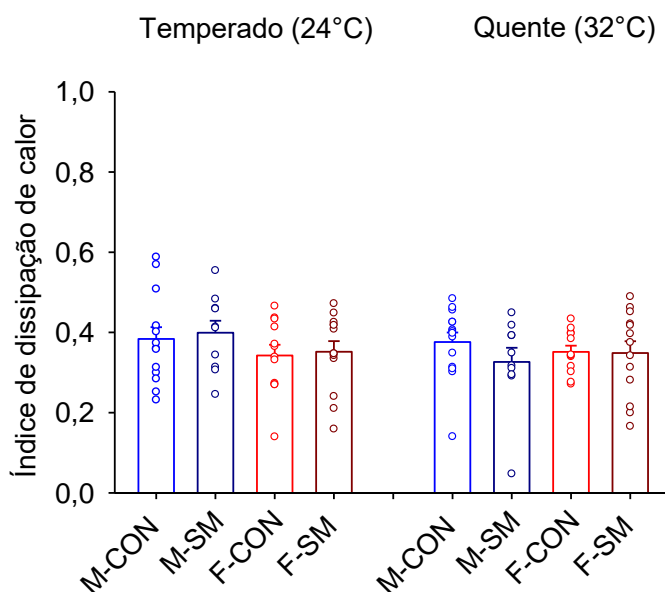


Gráfico 5. Índice de dissipação de calor dos ratos e ratas submetidos a dois exercícios incrementais em ambiente temperado e quente. Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão. Abreviaturas: F-CON = fêmeas controles (n = 12); F-SM = fêmeas submetidas à separação materna precoce (n = 13); M-CON = machos controles (n = 14); M-SM = machos submetidos à separação materna precoce (n = 10).

As alterações das temperaturas colônicas e da pele da cauda também foram avaliadas durante exercícios em velocidade constante nos dois ambientes. A utilização desse protocolo de exercício teve como objetivo padronizar a duração (30 minutos) e a intensidade (mesmo % da velocidade aeróbica máxima) do esforço físico (Gráfico 6). Novamente, nós decidimos avaliar esses parâmetros termorregulatórios em momentos específicos (no início e ao final do exercício), eliminando-se o fator tempo durante o exercício das nossas análises. Assim como nos exercícios incrementais, a análise visual dos quatro painéis permitiu escolher os momentos em que as ANOVAs de três fatores foram realizadas: as diferenças entre sexos nas temperaturas corporais foram novamente mais evidentes no início e ao final do exercício, enquanto as diferenças entre ambientes foram mais acentuadas ao final do exercício.

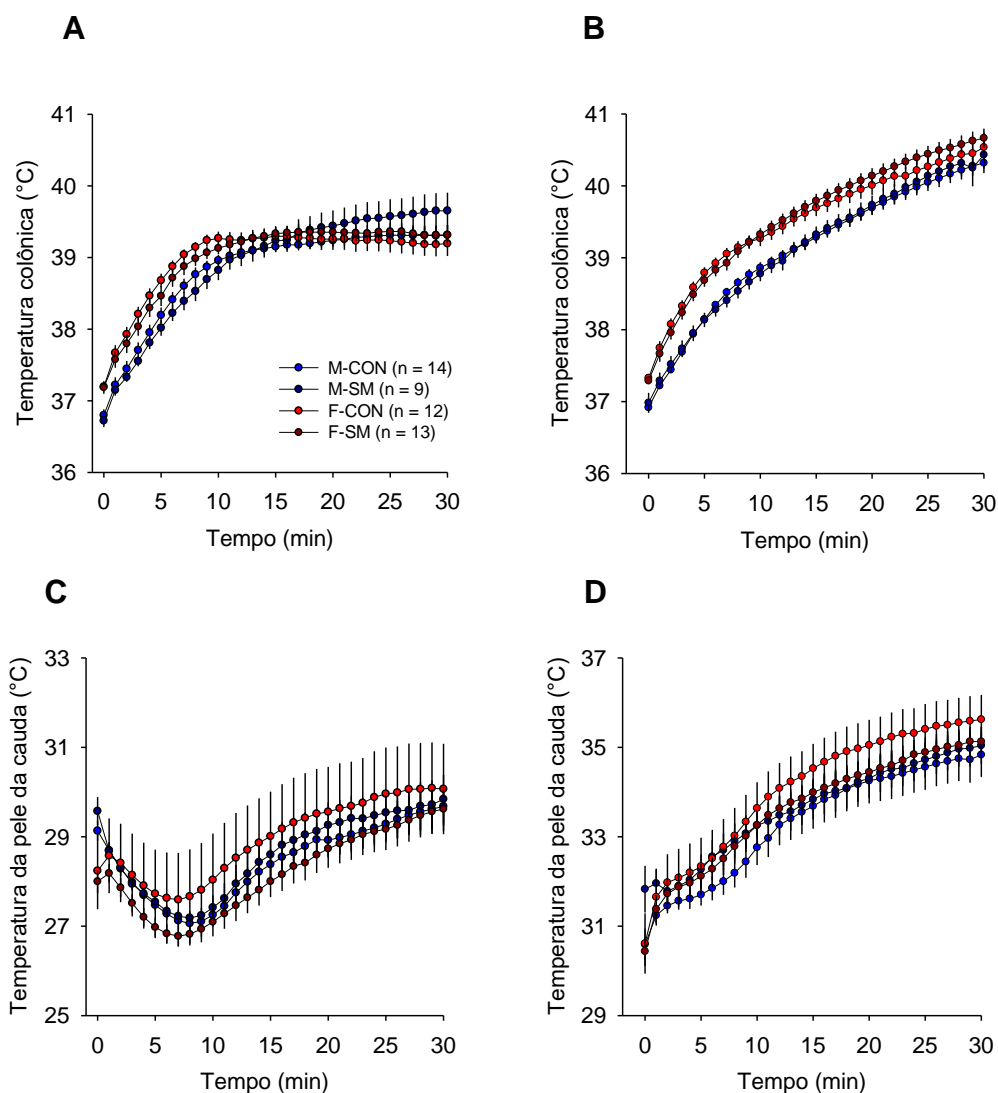


Gráfico 6. Temperatura colônica (painéis A e B) e da pele da cauda (painéis C e D) ao longo do exercício dos ratos e ratas submetidos a dois exercícios constantes de trinta minutos em ambiente temperado (painéis A e C) e quente (painéis B e D). Abreviaturas: F-CON = fêmeas controles (n = 12); F-SM = fêmeas submetidas à separação materna precoce (n = 13); M-CON = machos controles (n = 14); M-SM = machos submetidos à separação materna precoce (n = 9).

As ANOVAs three-way não demonstraram a existência de interação significativa entre os três fatores principais ( $F = 0,019 - 0,932$ ;  $p = 0,337 - 0,965$ ) e nem quando esses fatores foram analisados de forma pareada ( $F = 0,010 - 0,848$ ;  $p = 0,126 - 0,939$ ) para nenhuma das cinco variáveis analisadas durante o exercício constante (Figura 7A-D e Figura 8). A única exceção foi a interação significativa entre sexo biológico e temperatura ambiente observada para a temperatura colônica aos 30 minutos ( $F = 4,219$ ;  $p = 0,043$ ). As fêmeas apresentaram temperaturas colônicas  $0,20^{\circ}\text{C}$  menores do que os machos a  $24^{\circ}\text{C}$  ( $39,26 \pm 0,11^{\circ}\text{C}$  vs.  $39,46 \pm 0,13^{\circ}\text{C}$ ), mas valores  $0,24^{\circ}\text{C}$  maiores a  $32^{\circ}\text{C}$  ( $40,60 \pm 0,12^{\circ}\text{C}$  vs.  $40,36 \pm 0,11^{\circ}\text{C}$ ).

Não foi observado efeito principal de intervenção em nenhuma dessas cinco variáveis ( $F = 0,063 - 0,900$ ;  $p = 0,345 - 0,803$ ). O fator principal sexo biológico influenciou as temperaturas colônica ( $F = 52,664$ ;  $p < 0,001$ ) e da cauda ( $F = 7,919$ ;  $p = 0,006$ ) iniciais.

Por outro lado, o sexo biológico não influenciou a temperatura da cauda ( $F = 0,288$ ;  $p = 0,593$ ) e o índice de dissipação de calor ( $F = 0,815$ ;  $p = 0,369$ ), ambos determinados aos 30 min de exercício. Mais especificamente, a temperatura colônica inicial das fêmeas foi  $0,40^{\circ}\text{C}$  maior do que a dos machos ( $37,25 \pm 0,03^{\circ}\text{C}$  vs.  $36,85 \pm 0,04^{\circ}\text{C}$ ). Em contraste, a temperatura da cauda inicial das fêmeas foi  $0,86^{\circ}\text{C}$  menor do que a dos machos ( $29,32 \pm 0,32^{\circ}\text{C}$  vs.  $30,18 \pm 0,22^{\circ}\text{C}$ ).

O fator principal temperatura ambiente influenciou a temperatura colônica inicial ( $F = 8,049$ ;  $p = 0,006$ ) e aos 30 min ( $F = 84,672$ ;  $p < 0,001$ ) e a temperatura da cauda inicial ( $F = 37,962$ ;  $p < 0,001$ ) e aos 30 min ( $F = 167,513$ ;  $p < 0,001$ ), mas não influenciou o índice de dissipação de calor aos 30 min ( $F = 0,340$ ;  $p = 0,561$ ). Por exemplo, ao final do exercício constante, a temperatura colônica foi  $1,13^{\circ}\text{C}$  maior ( $40,49 \pm 0,08^{\circ}\text{C}$  vs.  $39,35 \pm 0,09^{\circ}\text{C}$ ) e a temperatura da cauda foi  $5,36^{\circ}\text{C}$  maior ( $35,15 \pm 0,23^{\circ}\text{C}$  vs.  $29,79 \pm 0,32^{\circ}\text{C}$ ) a  $32^{\circ}\text{C}$  do que a  $24^{\circ}\text{C}$ .

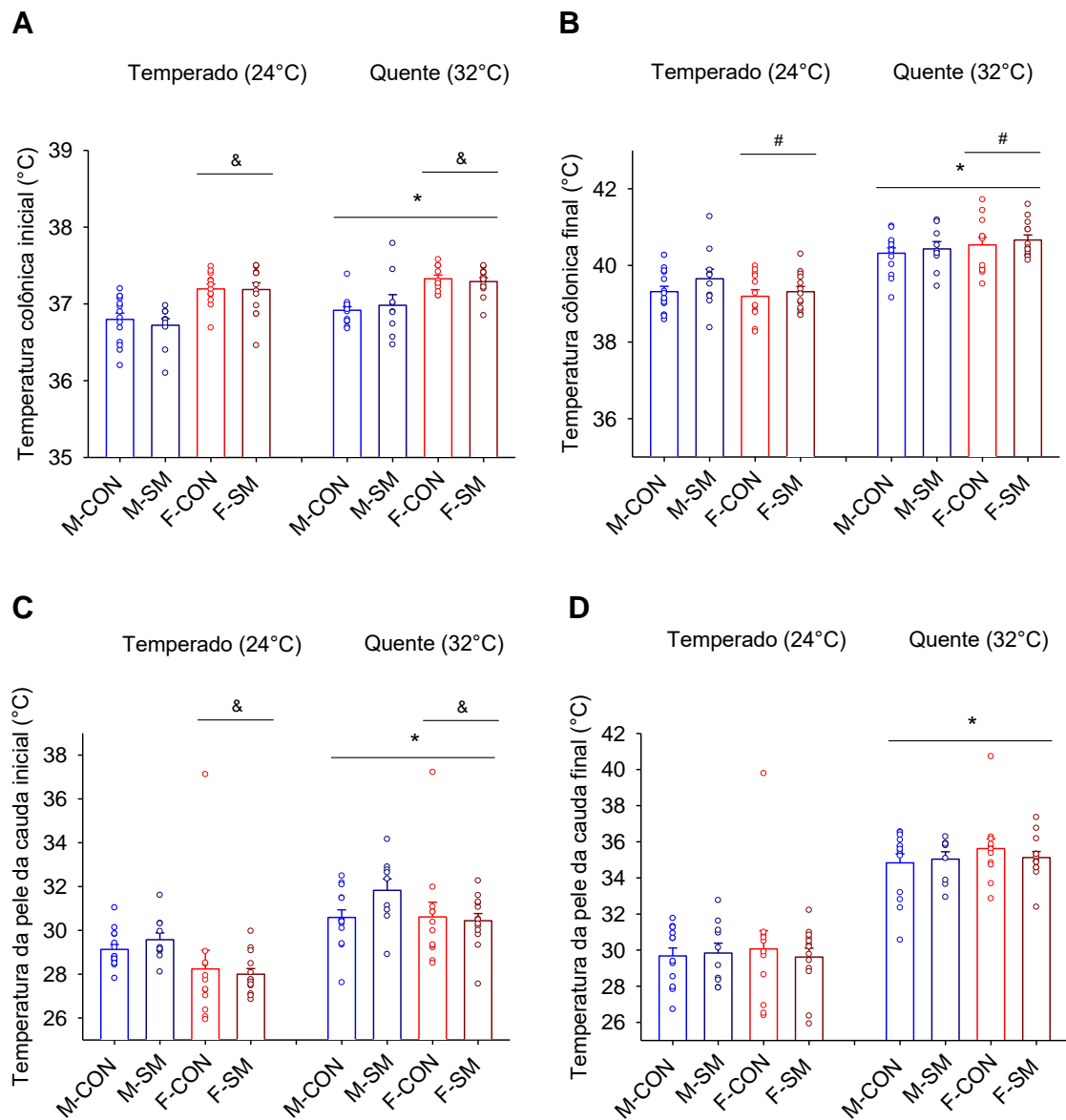


Gráfico 7. Temperaturas corporais iniciais (painéis A e C) e finais (painéis B e D) dos ratos e ratas submetidos a dois exercícios constantes em ambiente temperado e quente: temperatura colônica (painéis A e B) e temperatura da pele da cauda (painéis C e D). Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão. \* efeito principal significativo de temperatura ambiente ( $p < 0,05$ ). & efeito principal significativo de sexo biológico ( $p < 0,05$ ). # efeito significativo de sexo para uma mesma temperatura ambiente ( $p < 0,05$ ). Abreviaturas: F-CON = fêmeas controles ( $n = 12$ ); F-SM = fêmeas submetidas à separação materna precoce ( $n = 13$ ); M-CON = machos controles ( $n = 14$ ); M-SM = machos submetidos à separação materna precoce ( $n = 9$ ).



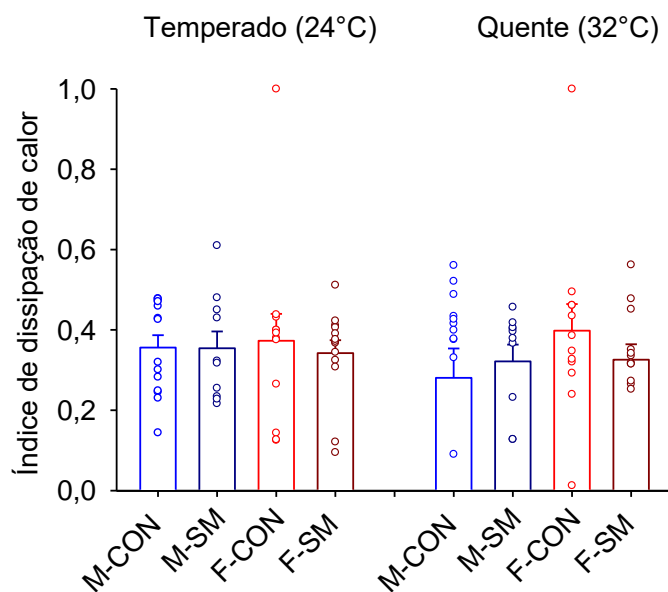


Gráfico 8. Índice de dissipação de calor dos ratos e ratas submetidos a dois exercícios constantes em ambiente temperado e quente. Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão. Abreviaturas: F-CON = fêmeas controles (n = 12); F-SM = fêmeas submetidas à separação materna precoce (n = 13); M-CON = machos controles (n = 14); M-SM = machos submetidos à separação materna precoce (n = 9).

#### 4. DISCUSSÃO

O principal achado do nosso estudo foi que os animais submetidos à separação materna precoce realizaram menos trabalho e, portanto, apresentaram menor desempenho aeróbico durante exercício incremental em ambiente temperado, em comparação aos animais controles, confirmando parcialmente a nossa primeira hipótese. Esses dados indicam que o estresse no início da vida dos filhotes provocou alterações duradouras que refletiram em prejuízos (i.e., menor desempenho) na idade adulta, conforme já demonstrado em estudos que investigaram outras respostas biológicas, incluindo alterações nos comportamentos relacionados às emoções (GIACHINO *et al.*, 2007) e na ativação de vias neurais por estressores físicos e psicológicos (FÓSCOLO *et al.*, 2022).

Nossos resultados não mostraram diferenças significativas na temperatura interna entre os grupos experimentais, controle e separação materna, em nenhum dos dois protocolos de exercício realizados e em nenhuma das duas condições ambientais investigadas, indicando ausência de alterações termorregulatórias advindas da intervenção adotada. Esses dados refutam parcialmente a nossa primeira hipótese e sugerem que o menor desempenho aeróbico dos animais separados de suas mães no início da vida não tenha sido causado por disfunções termorregulatórias. Alterações neurais, mais especificamente alterações em neurotransmissores (e.g., serotonina, dopamina e noradrenalina; (RÉCAMIER-CARBALLO *et al.*, 2017; GONZALEZ-PARDO *et al.*, 2020), poderiam explicar o menor desempenho aeróbico induzido pela separação materna precoce. Vale mencionar que, atuando no sistema nervoso central, as três monoaminas citadas anteriormente influenciam o comportamento dos animais e também modulam a fadiga durante uma sessão de exercício (ROELANDS *et al.*, 2010; RABELO *et al.*, 2015; CORDEIRO *et al.*, 2017). Mais especificamente, maiores concentrações encefálicas de dopamina aumentam o desempenho aeróbico (ROELANDS *et al.*, 2008; BALTHAZAR *et al.*, 2009), enquanto maiores concentrações de serotonina e noradrenalina reduzem o desempenho (ROELANDS *et al.*, 2008; CORDEIRO *et al.*, 2014).

Estudos anteriores em camundongos demonstraram que a separação materna precoce reduziu o comportamento de busca por chocolate em fêmeas e induziu dessensibilização do receptor dopaminérgico D1 no núcleo accumbens, sugerindo que o estresse no início da vida afeta o comportamento de busca por recompensa (SASAGAWA *et al.*, 2017). Achados prévios também indicam que ratos com maior capacidade intrínseca para realizarem exercícios prolongados apresentam maior renovação (*turnover*) de dopamina no caudado putâmen do que ratos com capacidade baixa ou padrão (RABELO *et al.*, 2015). Esse resultado possivelmente reflete uma maior atividade do trato

nigroestriatal, o qual está envolvido na motivação, em comportamentos de busca por recompensa (incluindo o exercício físico) e no controle motor (RABELO *et al.*, 2015). Considerando-se essas evidências de que a atividade do sistema dopaminérgico está relacionada ao desenvolvimento da fadiga por meio da sua atividade modulatória em circuitos associados à termorregulação e ao controle motor, bem como por meio da sua participação em mecanismos de motivação e recompensa (MEEUSEN *et al.*, 2006; HASEGAWA *et al.*, 2008; COIMBRA *et al.*, 2010), é possível que a separação materna precoce diminua a sinalização dopaminérgica em circuitos relacionados a busca por recompensa, contribuindo para um menor desempenho aeróbico dos animais submetidos ao estresse no início de suas vidas.

Considerando que a fadiga é um fenômeno multifatorial (NOAKES *et al.*, 2000;2011; HUDSON *et al.*, 2022), existem outros aspectos fisiológicos que, além das alterações nos neurotransmissores, poderiam estar associados à interrupção antecipada do esforço nos animais separados de suas mães, tais como alterações metabólicas e no equilíbrio ácido-básico. A possível contribuição das alterações de neurotransmissores e metabólicas nos prejuízos de desempenho promovidos pela separação materna precoce deve ser investigada em estudos futuros.

Ao avaliar os efeitos da separação materna precoce no desempenho aeróbico utilizando na mesma análise dados coletados nos ambientes temperado e quente, não observamos o efeito que foi evidenciado ao se avaliar somente os exercícios realizados em ambiente temperado. É possível que os efeitos do estresse térmico provocado pelo exercício aeróbico em ambiente quente tenham sido tão marcantes a ponto de limitar a visualização dos efeitos da separação materna precoce em reduzir o desempenho aeróbico. Por exemplo, Shang *et al.* (2021) demonstraram que a redução do desempenho causada pela privação de sono (tamanho do efeito; *d* de Cohen variando entre 0,47 e 0,58) foi menor do que aquela causada pela exposição ao ambiente quente (variando de 0,82 e 1,29), sugerindo que o estresse térmico ambiental seja um dos fatores que interferem, de forma mais evidente, na tolerância de ratos ao exercício aeróbico.

O fato de nenhum dos parâmetros termorregulatórios avaliados ter sido diferente entre os animais submetidos à intervenção e os animais controles não corrobora estudo que reportou prejuízos na dissipação cutânea de calor em ratos expostos ao ambiente quente (MELO *et al.*, 2018). Mais especificamente, os ratos submetidos à separação materna exibiram redução na temperatura da pele da cauda e maior temperatura interna do que os ratos controles (MELO *et al.*, 2018). Essas duas alterações não foram observadas quando nós submetemos aos ratos ao exercício. É válido ressaltar que o aquecimento passivo envolve o aumento da temperatura corporal (primeiro a pele e, na sequência, a região mais central) por meio de fontes exógenas de fornecimento de energia térmica (LIMA *et*

*al.*, 2013; PIRES *et al.*, 2013); o aquecimento ativo, por sua vez, é consequência do calor produzido endogenamente a partir da musculatura em contração (GONZÁLEZ-ALONSO *et al.*, 2000). Em função disso, durante o exercício, o papel do aquecimento da região interna do corpo na dissipação de calor é maior que o papel da periferia, particularmente quando o esforço é realizado em ambientes temperados. Portanto, a nossa sugestão é que a separação materna precoce afeta a dissipação de calor na cauda mediada pelo aquecimento local e/ou de toda a superfície corporal, mas não aquela mediada pelo aquecimento da região central do corpo. Em conjunto, essas informações sugerem que os prejuízos gerados pelo protocolo de separação materna precoce sejam mascarados quando os ratos são exercitados em uma esteira rolante.

Vale ainda ressaltar que, enquanto está correndo na esteira o principal local do corpo a partir do qual o rato consegue dissipar calor são os vasos da cauda, visto que o animal não consegue adotar comportamentos relacionados à termorregulação (WANNER *et al.*, 2015). Neste contexto, é possível que ratos aquecidos passivamente aumentem sua capacidade de dissipação de calor através da perda evaporativa, a qual está associada ao grooming (HAINSWORTH *et al.*, 1968), um comportamento inato envolvido na manutenção da higiene, mas também importante para a termorregulação (ALMEIDA *et al.*, 2015). De qualquer forma, a separação materna precoce parece não impactar comportamentos termorregulatórios, visto que, em comparação com os controles, os animais separados das suas mães procuraram por ambientes mais frios e apresentaram mais episódios de grooming para tentar normalizar a sua temperatura interna (MELO *et al.*, 2018).

A redução do desempenho aeróbico, observada em ambiente temperado e causada pela separação materna precoce, não foi influenciada pelo sexo dos filhotes, visto que não houve interação significativa entre os fatores principais intervenção e sexo. Além disso, como a separação materna não influenciou o desempenho em ambiente quente e nenhuma das variáveis termorregulatórias analisadas, não faz sentido compreender se os efeitos da separação materna nessas variáveis seriam dependentes do sexo dos animais. Esses dados, em conjunto, refutam a nossa segunda hipótese e contradizem dados previamente publicados indicando que os filhotes machos seriam mais sensíveis do que as filhotes fêmeas aos efeitos da separação materna precoce (JAIMES-HOY *et al.*, 2016; XU *et al.*, 2018).

Outro achado relevante do nosso estudo diz respeito ao melhor desempenho aeróbico das fêmeas no ambiente temperado, quando comparadas aos machos. Esses dados confirmam parcialmente a nossa terceira hipótese e, de certa forma, contradizem os resultados obtidos por Lubbe e colaboradores (2021), que não observaram diferença significativa no tempo de tolerância à corrida a 75% do  $VO_{2\text{máx}}$  entre ratos machos (335,5

s) e fêmeas (530,0 s). No entanto, devemos ter cuidado com a afirmação contida na frase anterior, pois faltou muito pouco para que os autores observassem significância estatística (*i.e.*, a comparação entre sexos biológicos correspondeu a um  $p = 0,08$ ), uma vez que as fêmeas correram 50% a mais do que os machos (LUBBE *et al.*, 2021). Mais recentemente, Holcomb *et al.* (2022) reportaram que, em relação aos camundongos machos, as fêmeas possuem maior tolerância ao exercício aeróbico devido a uma maior capacidade de mobilizar e utilizar ácidos graxos para transformação de energia no musculo esquelético. Além disso, existem evidências que camundongos fêmeas possuem maior prevalência de fibras musculares esqueléticas do tipo I (HAIZLIP *et al.*, 2015; O'REILLY *et al.*, 2021), gerando a expectativa de maior tolerância ao exercício aeróbico em fêmeas do que em machos.

Em contraste, as fêmeas mostraram um menor trabalho realizado no ambiente quente, quando comparadas aos machos. Essa redução do desempenho, exclusivamente em condições de estresse térmico ambiental, pode ser explicada pela maior razão entre a área de superfície e a massa corporal das fêmeas, o que favorece uma maior troca de energia térmica entre o corpo e o ambiente circundante (GORDON *et al.*, 1990; WANNER *et al.*, 2015). Em linhas gerais, animais menores possuem maior razão entre área de superfície e massa corporal e são mais susceptíveis aos efeitos prejudiciais do calor ambiental sobre o desempenho aeróbico. Ratas Wistar adultas apresentam menor comprimento corporal (medido do focinho até a cauda) em comparação com ratos Wistar adultos (SANTIAGO *et al.*, 2015), o que contribui para uma menor massa corporal, conforme observamos em todos os momentos avaliados no nosso estudo.

Estudo conduzido por Wisloff *et al.* (2001) demonstrou que os ratos machos apresentam maior  $VO_{2máx}$  em comparação com as fêmeas. Em humanos, o  $VO_{2máx}$  é um dos principais preditores do desempenho aeróbico em corredores treinados (MCLAUGHLIN *et al.*, 2010). Entretanto, é importante destacar que, em ratos, o treinamento aeróbico aumenta a tolerância ao esforço, sem aumentar o  $VO_{2máx}$  concomitantemente (TEIXEIRA-COELHO *et al.*, 2017), sugerindo dissociação entre  $VO_{2máx}$  e tempo de tolerância ao esforço nessa espécie animal. Portanto, mais estudos são necessários para se compreender melhor as diferenças de desempenho entre sexos e os mecanismos fisiológicos subjacentes a essas diferenças.

Nós observamos uma maior temperatura colônica no início dos exercícios incremental e constante nas fêmeas em comparação com os machos; esse resultado corrobora os dados publicados recentemente por Lubbe *et al.* (2021). Vale ressaltar que, quando os ratos são colocados na esteira rolante e manuseados para a inserção de sensores que permitem a medição das temperaturas corporais, um aumento acentuado e duradouro na temperatura interna é observado (KUNSTETTER *et al.*, 2018). Esse aumento na

temperatura interna pode ser consequência de um estresse emocional ou uma resposta condicionada antecipatória (WANNER *et al.*, 2015). De fato, diferenças sexuais na sensibilidade a outras formas de estresse (não relacionados à separação materna precoce) foram documentadas em ratos (BROWN *et al.*, 1996) e em humanos (TAYLOR *et al.*, 2000). O dimorfismo sexual observado frente a vários estímulos estressantes sugere que as fêmeas possam ser mais suscetíveis ao estresse de manipulação que precede o início da corrida em esteira rolante. Interessantemente, é possível que a modulação do sexo na resposta de ratos a um determinado estímulo estressor seja dependente do tipo de estímulo avaliado.

Além de maiores valores de temperatura no início do exercício, as fêmeas também possuem temperaturas mais elevadas do que machos no momento da fadiga. Esses achados podem ser, parcialmente, explicados pela maior duração da corrida das fêmeas e, conseqüentemente, maior distância percorrida. Conforme descrito recentemente por Andrade *et al.* (2023a e 2023b), a distância percorrida é um dos fatores determinantes do valor de temperatura interna na fadiga em ratos submetidos a um exercício incremental. Nesse protocolo de exercício, os animais que correm por mais tempo alcançam velocidades mais rápidas, as quais promovem aumentos mais acentuados na taxa metabólica e, conseqüentemente, na produção metabólica de calor (ANDRADE *et al.*, 2023a).

Nossos resultados mostraram que as fêmeas possuíram menor temperatura colônica aos 30 minutos de exercício com velocidade constante no ambiente temperado em comparação com os machos. A sobrecarga mecânica imposta durante esse exercício submáximo foi diferente para machos e fêmeas, sendo que as fêmeas correram a velocidades mais elevadas. Como maiores velocidades de corrida induzem maior produção metabólica de calor, é sugestivo que a economia de corrida das fêmeas tenha sido maior em comparação com os machos, visto que as mesmas terminaram o esforço com menores temperaturas internas. É importante destacar que os estudos futuros, voltados para a avaliação das alterações na termorregulação associadas à eficiência da corrida, avaliar parâmetros que auxiliem na compreensão das alterações na produção de calor, incluindo a medida do consumo de oxigênio. Em contraste, no ambiente quente, as fêmeas atingiram temperaturas mais altas no final do exercício submáximo, podendo essa diferença entre sexos ser explicada pela maior razão entre a área de superfície e a massa corporal das fêmeas, o que facilita a troca de energia térmica entre o corpo e o ambiente circundante (WANNER *et al.*, 2015).

As fêmeas apresentaram menor temperatura da cauda do que os machos no início dos exercícios incrementais e constantes. Conforme descrito por Nakamura *et al.* (2015), grande parte da elevação da temperatura interna em resposta ao estresse psicológico é

resultado do aumento da atividade simpática, a qual induz termogênese no tecido adiposo marrom e vasoconstrição periférica, levando ao aumento do metabolismo corporal e à diminuição da perda de calor na superfície corporal. Vale destacar que o manuseio dos ratos antes do exercício para colocação dos sensores de temperatura e a exposição à esteira rolante promovem aumentos acentuados e prolongados na temperatura interna, frequência cardíaca e pressão arterial, de forma bem semelhante ao que se observa em outros paradigmas de estresse emocional (KUNSTETTER *et al.*, 2018). Além disso, observa-se também a redução prolongada da temperatura da cauda (KUNSTETTER *et al.*, 2018), o que possivelmente resulta de uma maior atividade simpática direcionada para os vasos da cauda (O'LEARY *et al.*, 1985; OWENS *et al.*, 2002). Como as fêmeas possuem uma maior sensibilidade ao estresse crônico variável (RENARD *et al.*, 2007), isso pode explicar, em parte, a menor temperatura da cauda no início dos exercícios em comparação com os machos.

Conforme previamente reportado em experimentos envolvendo seres humanos (GALLOWAY *et al.*, 1997; MAIA-LIMA *et al.*, 2017) e ratos (RODRIGUES *et al.*, 2003; PIRES *et al.*, 2013; ZARETSKY *et al.*, 2018; SHANG *et al.*, 2021; TEIXEIRA-COELHO *et al.*, 2021), o desempenho aeróbico foi reduzido no ambiente quente em comparação com o ambiente temperado, independentemente se os ratos foram submetidos ou não à separação materna precoce. Os ratos exibiram hipertermia corporal acentuada a 32°C em relação a 24°C, evidenciada por temperaturas colônica e da pele da cauda 1,47°C e 5,32°C, respectivamente, mais elevadas na fadiga. A combinação entre o ambiente quente e a intensidade duração da corrida pode produzir uma condição de estresse térmico insustentável (SAWKA *et al.*, 2011; WANNER *et al.*, 2015), caracterizada pela incapacidade de dissipar o calor metabólico produzido, levando a aumentos acentuados na temperatura interna e a um maior esforço cardiovascular (CHEUVRONT *et al.*, 2010). Dessa forma, esses resultados sugerem que a hipertermia acentuada a 32°C pode ser explicada pela incapacidade de os ratos dissiparem o calor via evaporação enquanto correm (SHELLOCK *et al.*, 1984) e pela perda de calor reduzida através da pele da cauda, uma vez que a troca passiva de calor é limitada pelo gradiente estreito entre as temperaturas ambiente e da pele. Além disso, o índice de dissipação de calor desses animais foi semelhante nos dois ambientes 24°C e 32°C, indicando que os ratos não conseguem aumentar mais a dissipação cutânea de calor, por meio de vias secas, durante o exercício em ambiente quente.

Andrade *et al.* (2022) observaram que a repetição do exercício incremental no ambiente temperado aumentou o desempenho dos ratos, especialmente quando esse desempenho foi determinado a partir do cálculo do trabalho externo. Os nossos dados corroboram esse achado recente, visto que o trabalho realizado pelos ratos foi maior no

segundo em comparação com o primeiro exercício incremental. De fato, o aprendizado causado pela repetição de testes de desempenho físico pode influenciar a interpretação dos dados e é uma preocupação recorrente em estudos na área de ciências do esporte; em função disso, muitos pesquisadores realizam sessões de familiarização antes das situações experimentais. Por exemplo, Zhang (2017) relataram que a familiarização ao protocolo de exercício influenciou a reprodutibilidade do desempenho medido em múltiplos contra-relógios, com melhores resultados obtidos após os ciclistas terem sido submetidos a uma familiarização completa ao exercício.

## **5. CONCLUSÃO**

A separação materna precoce prejudica o desempenho aeróbico de ratos adultos machos e fêmeas em ambiente temperado, mas não em ambiente quente, sugerindo que o estresse térmico ambiental oculta o efeito do estresse no início da vida sobre o desempenho. Vale destacar que essa menor tolerância ao esforço a 24°C, causada pela separação materna, foi independente do sexo biológico dos filhotes. Além disso, a separação materna não modifica as respostas da temperatura corporais durante o exercício físico nos dois ambientes e nos dois protocolos de corrida avaliados, indicando que o prejuízo no desempenho a 24°C seja causado por mecanismos não termorregulatórios.

Independente se submetidas ou não à separação materna precoce, as fêmeas apresentam desempenho aeróbico melhor em comparação com os machos no ambiente temperado, mas pior no ambiente quente. As fêmeas também apresentam alterações termorregulatórias. No início do exercício, essas alterações são caracterizadas por temperatura colônica elevada e temperatura da pele da cauda reduzida. Ao final do exercício, a temperatura colônica é sempre maior nas fêmeas do que nos machos no ambiente quente, independente do protocolo de corrida. Por outro lado, no ambiente temperado, o aumento da temperatura colônica induzido pelo exercício depende do protocolo de corrida avaliado.

### **Limitações do estudo**

Como limitação, não avaliamos as alterações em outros parâmetros fisiológicos induzidas pela corrida em esteira rolante, tais como as alterações no consumo de oxigênio (que reflete custo metabólico do exercício aeróbico e ajuda a compreender a eficiência mecânica dos ratos) e as monoaminas centrais (que participam vias de motivação e



reforço positivo, as quais podem modular o desempenho físico). De qualquer forma, o presente estudo descarta o envolvimento de aspectos termorregulatórios ou a existência de uma resposta específica ao sexo biológico na redução do desempenho causada pela separação materna precoce. Uma segunda limitação deve-se ao fator de não ter sido selecionada uma fase do ciclo estral específica para a realização dos protocolos de exercícios. Em função disso e da tendência de as ratas começarem a ciclar de maneira semelhante quando permanecem muito tempo agrupadas, é possível que número de observações seja diferente entre as fases do ciclo estral.

### **Implicações práticas**

Os nossos experimentos descrevem como o impacto do estresse no início da vida pode refletir no desempenho físico quando os animais já se encontram em idade adulta. Portanto, os resultados dessa pesquisa básica possuem repercussão no entendimento do desenvolvimento humano. Em linhas gerais, a pesquisa sobre a separação materna precoce revela a importância de cuidados com os filhotes no início da vida, garantindo que os mesmos se desenvolvam em contato com as suas respectivas mães e em um ambiente sem exposição crônica a agentes estressores. Por exemplo, considerando-se as limitações de transposição dos resultados obtidos em experimentos com ratos para seres humanos, essa pesquisa enfatiza a importância de manutenção e aprimoramento de políticas que garantam um período adequado de licença maternidade, possibilitando o desenvolvimento saudável dos filhos. Ao mencionar as limitações na transposição dos resultados é importante destacar a diferença no tempo de vida entre ratos e seres humanos, o que pode impactar o efeito do estresse no início da vida no decorrer do desenvolvimento de cada uma dessas espécies. Mais especificamente, espera-se que flutuações transitórias em experiências precoces tenham impactos mais duradouros em espécies pequenas que vivem por pouco tempo do que em espécies grandes que vivem por muito tempo (KUZAWA *et al.*, 2011).

## REFERÊNCIAS

ANISMAN, *et al.* Stress, depression and anhedonia: warnings about animal models. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 4-5, p. 525-546, 2005.

ALMEIDA *et al.* Current understanding on the neurophysiology of behavioral thermoregulation. **Temperature**, v. 2, n. 4, p. 483-490, 2015.

ANDRADE *et al.* Determinants of body core temperatures at fatigue in rats subjected to incremental-speed exercise: The prominent roles of ambient temperature, distance traveled, initial core temperature, and measurement site. **International Journal of Biometeorology**, v.67, n. 5 p. 761-775, 2023.

ANDRADE *et al.* Core body temperatures of rats subjected to treadmill exercise to fatigue or exhaustion: The journal Temperature toolbox. **Temperature**, p. 1-26, 2022.

ANDRADE *et al.* Reliability of physical performance and thermoregulatory parameters in rats subjected to incremental treadmill running. **Journal of Thermal Biology**, p. 103270, 2022.

AGUIAR, *et al.* The exercise sex gap and the impact of the estrous cycle on exercise performance in mice. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-8, 2018.

BAYLIS, *et al.* Glomerular ultrafiltration in the pseudopregnant rat. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 243, n. 3, p. F300-F305, 1982.

BALTHAZAR *et al.* Performance-enhancing and thermoregulatory effects of intracerebroventricular dopamine in running rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 93, n. 4, p. 465-469, 2009.

BROWN *et al.* Global sex differences in stress-induced activation of cerebral metabolism revealed by 2-deoxyglucose autoradiography. **Hormones and behavior**, v. 30, n. 4, p. 611-617, 1996.

BITTENCOURT, *et al.* Comparative effects of two heat acclimation protocols consisting of high-intensity interval training in the heat on aerobic performance and thermoregulatory responses in exercising rats. **PloS one**, v. 15, n. 2, p. e0229335, 2020.

BRISKI, *et al.* Differential distribution of Fos expression within the male rat preoptic area and hypothalamus in response to physical vs. psychological stress. **Brain research bulletin**, v. 55, n. 3, p. 401-408, 2001.

BROOKS, *et al.* Estimation of anaerobic energy production and efficiency in rats during exercise. **Journal of Applied Physiology: Respiratory, Environmental and Exercise Physiology**, v. 56, n. 2, p. 520-525, 1984.

CARRER, *et al.* Sexual differentiation of the brain: genes, estrogen, and neurotrophic factors. **Cellular and molecular neurobiology**, v. 22, n. 5, p. 479-500, 2002.

CORDEIRO *et al.* Inhibition of tryptophan hydroxylase abolishes fatigue induced by central tryptophan in exercising rats. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, v. 24, n. 1, p. 80-88, 2014

CORDEIRO, *et al.* Exercise-induced fatigue: the role of serotonergic and dopaminergic systems. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 50, n. 12, e6432, 2017.

COIMBRA, *et al.* The involvement of brain monoamines in the onset of hyperthermic central fatigue. **An International Perspective on Topics in Sports Medicine and Sport Injury**, p. 275-295, 2010.

CHEUNG, *et al.* Multiple triggers for hyperthermic fatigue and exhaustion. **Exercise and sport sciences reviews**, v. 32, n. 3, p. 100-106, 2004.

DILSAVER, *et al.* Measurement of temperature in the rat by rectal probe and telemetry yields compatible results. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 42, n. 3: p. 549-552, 1992.

DJIANE, *et al.* Role of leptin during perinatal metabolic programming and obesity. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 59, n. Suppl 1, p. 55-63, 2008.

DRUMMOND, *et al.* Spontaneously hypertensive rats have greater impairments in regulating abdominal temperature than brain cortex temperature following physical exercise. **Journal of Thermal Biology**, v. 83, p. 30-36, 2019.

DRUMMOND, *et al.* Brain temperature in spontaneously hypertensive rats during physical exercise in temperate and warm environments. **PLoS One**, v. 11, n. 5, p. e0155919, 2016.

FÓSCOLO, *et al.* Neonatal maternal separation affects endocrine and metabolic stress responses to ether exposure but not to restraint exposure in adult rats. **Metabolic brain disease**, v. 23, p. 375-385, 2008.

FÓSCOLO *et al.* Early maternal separation alters the activation of stress-responsive brain areas in adulthood. **Neuroscience Letters**, v. 771, p. 136464, 2022.

GALLOWAY *et al.* Effects of ambient temperature on the capacity to perform prolonged cycle exercise in man. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 29, n. 9, p. 1240-1249, 1997.

GONZÁLEZ-ALONSO *et al.* Heat production in human skeletal muscle at the onset of intense dynamic exercise. **The Journal of physiology**, v. 524, n. 2, p. 603-615, 2000.

GONZÁLEZ-PARDO *et al.* Sex-specific effects of early life stress on brain mitochondrial function, monoamine levels and neuroinflammation. **Brain Sciences**, v. 10, n. 7, p. 447, 2020.

GAGNON, *et al.* Sex differences in thermoeffector responses during exercise at fixed requirements for heat loss. **Journal of applied physiology**, v. 113, n. 5, p. 746-757, 2012.

GIACHINO, *et al.* Maternal deprivation and early handling affect density of calcium binding protein-containing neurons in selected brain regions and emotional behavior in periadolescent rats. **Neuroscience**, v. 145, n. 2, p. 568-578, 2007.

GORDON *et al.* Thermal biology of the laboratory rat. **Physiology & behavior**, v. 47, n. 5, p. 963-991, 1990.

GRANT, *et al.* Vasodilation and body heating in rats. **The Journal of Physiology**, v. 167, n. 2, p. 311, 1963.

HALE, *et al.* Integrative physiology of depression and antidepressant drug action: implications for serotonergic mechanisms of action and novel therapeutic strategies for treatment of depression. **Pharmacology & Therapeutics**, v.137, n. 1, p. 108–118, 2013.

HAIZLIP *et al.* Sex-based differences in skeletal muscle kinetics and fiber-type composition. **Physiology**, v. 30, n. 1, p. 30-39, 2015.

HAINSWORTH *et al.* Evaporative water loss from rats in the heat. **American Journal of Physiology-Legacy Content**, v. 214, n. 5, p. 979-982, 1968.

HAYASHIDA, *et al.* The repeated stress of social defeat induces chronic hyperthermia in rats. **Physiology and Behavior**, v. 101, n. 1, p. 124-131, 2010.

HASEGAWA, H. *et al.* Influence of brain catecholamines on the development of fatigue in exercising rats in the heat. **The Journal of Physiology**, v. 586, n. 1, p. 141-149, 2008.

HOLCOMB *et al.* Sex differences in endurance exercise capacity and skeletal muscle lipid metabolism in mice. **Physiological Reports**, v. 10, n. 3, p. e15174, 2022.

HOFFMAN, *et al.* Maternal employment: 1979. **American Psychologist**, v. 34, n. 10, p. 859, 1979.

HUDSON, *et al.* The magnitude of physical exercise-induced hyperthermia is associated with changes in the intestinal permeability and expression of tight junction genes in rats. **Journal of Thermal Biology**, v. 91: 102610. 2020.

HUPA, *et al.* Maternal deprivation decelerates postnatal morphological lung development of F344 rats. **The Anatomical Record**, v. 297, n. 2, p. 317-326, 2014.

IUPS Thermal Commission (The Commission for Thermal Physiology of the International Union of Physiological Sciences). Glossary of terms for thermal physiology: third edition. **Japanese Journal of Physiology**, v. 51: p. i–xxxvi, 2001.

JAIMES-HOY, *et al.* Neonatal maternal separation alters, in a sex-specific manner, the expression of TRH, of TRH-degrading ectoenzyme in the rat hypothalamus, and the response of the thyroid axis to starvation. **Endocrinology**, v. 157, n. 8, p. 3253-3265, 2016.

KUZAWA *et al.* Timescales of human adaptation: the role of epigenetic processes. **Epigenomics**, v. 3, n. 2, p. 221-234, 2011.

KUNSTETTER *et al.* Pre-exercise exposure to the treadmill setup changes the cardiovascular and thermoregulatory responses induced by subsequent treadmill running in rats. **Temperature**, v. 5, n. 2, p. 109-122, 2018.

KHOURY, *et al.* Adult life behavioral consequences of early maternal separation are alleviated by escitalopram treatment in a rat model of depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 30, n. 3, p. 535-540, 2006.

KHALIFA, *et al.* The physiological role of the hypothalamus in thermoregulation during exercise. **International Journal of Advanced Research in Biological Sciences**, v.5, n.11, p.122-126, 2018.

KENDLER, *et al.* Towards a comprehensive developmental model for major depression in

- women. **American Journal of Psychiatry**, v. 159, n. 7, p. 1133-1145, 2002.
- LÄHDEPURO, *et al.* The impact of early life stress on anxiety symptoms in late adulthood. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 4395, 2019.
- LONG, *et al.* The estrous cycle in the rat and its associated phenomena. **Memories of University of California**, v. 6: p. 1-148, 1922.
- LUBBE *et al.* Forced running-induced rhabdomyolysis in the Sprague–Dawley rat: towards a rodent model of capture myopathy. **Veterinary Research Communications**, v. 45, n. 4, p. 459-465, 2021.
- LIMA *et al.* Chronic sympathectomy of the caudal artery delays cutaneous heat loss during passive heating. **Neuroscience Letters**, v. 537, p. 11-16, 2013.
- MCLAUGHLIN *et al.* A test of the classical model for predicting endurance running performance. **The University of Tennessee**, 2006.
- MAIA-LIMA *et al.* Effects of precooling on 30-km cycling performance and pacing in hot and temperate environments. **International Journal of Sports Medicine**, v. 38, n. 01, p. 48-54, 2017.
- MANDL, *et al.* The phases of the oestrous cycle in the adult white rat. **Journal of Experimental Biology**, v. 28: p. 576-584, 1951.
- MALHEIROS-LIMA, *et al.* Physical exercise-induced cardiovascular and thermoregulatory adjustments are impaired in rats subjected to cutaneous artery denervation. **Frontiers in Physiology**, v. 9, article 74, 2018.
- MARRONE, *et al.* Gonadal hormones and body temperature in rats: effects of estrous cycles, castration and steroid replacement. **Physiology & Behavior**, v. 17, n. 3: p.419-425, 1976.
- MATTARAIA, *et al.* Produtividade de ratos Wistar em diferentes sistemas de acasalamento. **Ciência Rural**, v. 42, n. 8, p. 1490-1496, 2012.
- MAGHAMI, *et al.* Maternal separation blunted spatial memory formation independent of peripheral and hippocampal insulin content in young adult male rats. **PloS One**, v. 13, n. 10, p. e0204731, 2018.
- MARCO, *et al.* Maternal deprivation effects on brain plasticity and recognition memory in adolescent male and female rats. **Neuropharmacology**, v. 68, p. 223-231, 2013.
- MARCONDES, *et al.* Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, n. 4A, p. 609-614, 2002.

MCLAUGHLIN, *et al.* A test of the classical model for predicting endurance running performance. **The University of Tennessee**, 2006.

MELO, *et al.* Early maternal separation promotes changes in the thermoregulatory profile of adult Wistar rats. **Journal of Thermal Biology**, v. 78, p. 151-160, 2018.

MEEUSEN *et al.* Central fatigue: the serotonin hypothesis and beyond. **Sports Medicine**, v. 36, p. 881-909, 2006.

MALHEIROS-LIMA, *et al.* Physical exercise-induced cardiovascular and thermoregulatory adjustments are impaired in rats subjected to cutaneous artery denervation. **Frontiers in Physiology**, v. 9, article 74, 2018.

NAKAMURA *et al.* Neural circuit for psychological stress-induced hyperthermia. **Temperature**. 2: 352–361. 2015.

NOAKES *et al.* Time to move beyond a brainless exercise physiology: the evidence for complex regulation of human exercise performance. **Applied physiology, nutrition, and metabolism**, v. 36, n. 1, p. 23-35, 2011.

NOAKES *et al.* Physiological models to understand exercise fatigue and the adaptations that predict or enhance athletic performance. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports: Review Article**, v. 10, n. 3, p. 123-145, 2000.

NYBO. Hyperthermia and fatigue. **Journal of Applied Physiology**, v. 104, n. 3, p.871-878, 2008.

OLTRAMARI, *et al.* Carreira e família na sociedade líquido-moderna. **RAM. Revista de Administração Mackenzie**, v. 15, n. 1, p. 15-48, 2014.

O'LEARY, *et al.* Mode of neural control mediating rat tail vasodilation during heating. **Journal of Applied Physiology**, v. 59, n. 5, p. 1533-1538, 1985.

O'REILLY *et al.* Sex differences in skeletal muscle revealed through fiber type, capillarity, and transcriptomics profiling in mice. **Physiological reports**, v. 9, n. 18, p. e15031, 2021.

OOMEN, *et al.* Opposite effects of early maternal deprivation on neurogenesis in male versus female rats. **PloS One**, v. 4, n. 1, p. e3675, 2009.

ORTIGA-CARVALHO *et al.* Hypothalamus-pituitary-thyroid axis. **Comprehensive Physiology**, v. 6, n. 3, p. 1387-1428, 2011.

OWENS, *et al.* Thermoregulatory control of sympathetic fibres supplying the rat's tail. **Journal of Physiology**, v. 543 (Pt 3), p. 849-858, 2002.

PIRES *et al.* Physical exercise performance in temperate and warm environments is decreased by an impaired arterial baroreflex. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e72005, 2013.

PRÍMOLA-GOMES, *et al.* Exercise capacity is related to calcium transients in ventricular cardiomyocytes. **Journal Applied Physiology**, v. 107, p. 593-598, 2009.

PLOTSKY, *et al.* Long-term consequences of neonatal rearing on central corticotropin

delivery systems in adult male rat pups. **Neuropsychopharmacology**, v. 30, n. 12, p. 2192-2204, 2005.

RABELO, *et al.* Intrinsic exercise capacity is related to differential monoaminergic activity in the rat forebrain. **Brain Research Bulletin**, v. 112, p. 7-13, 2015.

RÉCAMIER-CARBALLO *et al.* Maternal separation induces long-term effects on monoamines and brain-derived neurotrophic factor levels on the frontal cortex, amygdala, and hippocampus: differential effects after a stress challenge. **Behavioural pharmacology**, v. 28, n. 7, p. 545-557, 2017.

RENARD *et al.* Sexual dimorphism in rats: effects of early maternal separation and variable chronic stress on pituitary-adrenal axis and behavior. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 25, n. 6, p. 373-379, 2007.

RIBEIRO HUDSON *et al.* The dialectical model of fatigue in physical activity. **Fatigue: Biomedicine, Health & Behavior**, v. 10, n. 2, p. 94-106, 2022.

RODRIGUES *et al.* Heat storage rate and acute fatigue in rats. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 36, p. 131-135, 2003.

ROELANDS *et al.* The effects of acute dopamine reuptake inhibition on performance. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 40, n. 5, p. 879-885, 2008.

ROELANDS *et al.* Acute norepinephrine reuptake inhibition decreases performance in normal and high ambient temperature. **Journal of applied physiology**, v. 105, n. 1, p. 206-212, 2008.

RÖDEL *et al.* Litter size is negatively correlated with corticosterone levels in weanling and juvenile laboratory rats. **Physiology & behavior**, v. 99, n. 5, p. 644-650, 2010.

ROELANDS *et al.* Alterations in central fatigue by pharmacological manipulations of neurotransmitters in normal and high ambient temperature. **Sports Medicine**, v. 40, n. 3, p. 229-246, 2010.

ROSSI, *et al.* Implications of the serotonergic system on physical exercise. **Brazilian Archives of Endocrinology & Metabolism**, v. 48, n. 2, p. 227-233, 2004.

ROMANOVSKY. Thermoregulation: some concepts have changed. Functional architecture of the thermoregulatory system. **American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 292, n. 1, p. R37-R46, 2007.

ROMANOVSKY, 2018. The thermoregulation system and how it works. **Handbook of clinical neurology**, v. 156, p. 3-43, 2018.

SAWKA, *et al.* Integrated physiological mechanisms of exercise performance, adaptation, and maladaptation to heat stress. **Comprehensive Physiology**, v.1, n.4, p.1883-1928, 2011.

SASAGAWA *et al.* Long-term effects of maternal separation coupled with social isolation on reward seeking and changes in dopamine D1 receptor expression in the nucleus accumbens via DNA methylation in mice. **Neuroscience letters**, v. 641, p. 33-39, 2017.

SANTIAGO *et al.* Allometric relationships among body mass, MUZZLE-tail length, and tibia

length during the growth of Wistar rats<sup>1</sup>. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 30, p. 743-748, 2015.

SALEH, *et al.* Effects of early life stress on depression, cognitive performance and brain morphology. **Psychological medicine**, v. 47, n. 1, p. 171-181, 2017.

SHANG, *et al.* Independent effects of rapid eye movement sleep deprivation and exposure to environmental heat stress on aerobic performance and thermoregulatory responses in exercising rats. **Temperature**, v. 8, n. 2: p. 188-201, 2021.

SHELLOCK *et al.* Temperature regulation during treadmill exercise in the rat. **Journal of Applied Physiology**, v. 57, n. 6, p. 1872-1877, 1984.

SAKUMA. Gonadal steroid action and brain sex differentiation in the rat. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 21, n. 4, p. 410-414, 2009.

SAMPAIO, *et al.* Estatística aplicada à experimentação animal. 3ª edição. Belo Horizonte: **Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia**, 2007.

TEIXEIRA-COELHO *et al.* Effects of manipulating the duration and intensity of aerobic training sessions on the physical performance of rats. **PLoS One**, v. 12, n. 8, p. e0183763, 2017.

TEIXEIRA-COELHO, *et al.* Physical exercise-induced thermoregulatory responses in trained rats: Effects of manipulating the duration and intensity of aerobic training sessions. **Journal of Thermal Biology**, v. 97, p. 102878, 2021.

TAYLOR *et al.* Biobehavioral responses to stress in females: tend-and-befriend, not fight-or-flight. **Psychological review**, v. 107, n. 3, p. 411, 2000.

VIVEROS, *et al.* Maternal deprivation induces a rapid decline in circulating leptin levels and sexually dimorphic modifications in hypothalamic trophic factors and cell turnover. **Hormones and Behavior**, v. 57, n. 4-5, p. 405-414, 2010.

WANNER, *et al.* Muscarinic cholinceptors in the ventromedial hypothalamic nucleus facilitate tail heat loss during physical exercise. **Brain Research Bulletin**, v. 73, n. 1-3: p.28-33, 2007.

WANNER, *et al.* Thermoregulatory responses in exercising rats: methodological aspects and relevance to human physiology. **Temperature**, v. 2, n. 4, p. 457-475, 2015.

WISLØFF *et al.* Intensity-controlled treadmill running in rats:  $\dot{V}O_2$  max and cardiac hypertrophy. **American journal of physiology-heart and circulatory physiology**, v. 280, n. 3, p. H1301-H1310, 2001.

WYNDHAM, *et al.* Heat reactions of male and female Caucasians. **Journal of applied physiology**, v. 20, n. 3, p. 357-364, 1965.

XU, *et al.* Sex differences in associations between maternal deprivation and alterations in hippocampal calcium-binding proteins and cognitive functions in rats. **Behavioral and Brain Functions**, v. 14, n. 1, p. 1-12, 2018.

YANASE, *et al.* Effects of estrus cycle on thermoregulatory responses during exercise in rats. **European journal of applied physiology and occupational physiology**, v. 58, n. 4,



p. 446-451, 1989.

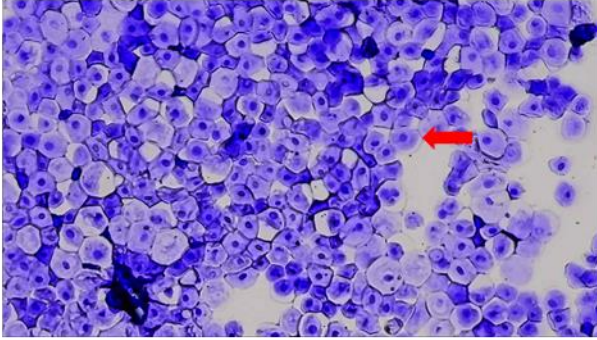
YOUNG, *et al.* Evidence for on–off control of heat dissipation from the tail of the rat. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 60, n. 3, p. 392-398, 1982.

ZARETSKY, *et al.* Automatic analysis of treadmill running to estimate times to fatigue and exhaustion in rodents. *PeerJ*, v. 6: e5017, 2018.

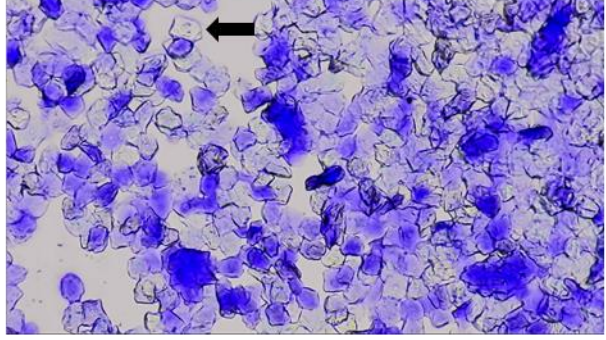
ZHANG *et al.* Episodic specificity in acquiring thematic knowledge of novel words from descriptive episodes. **Frontiers in Psychology**, v. 8, p. 488, 2017.

## APÊNDICES

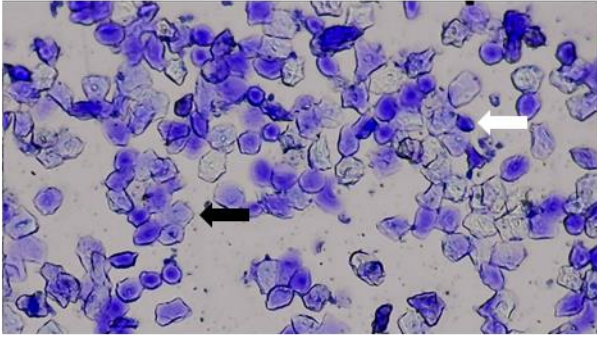
**PROESTRO**



**ESTRO**



**METAESTRO**



**DIESTRO**

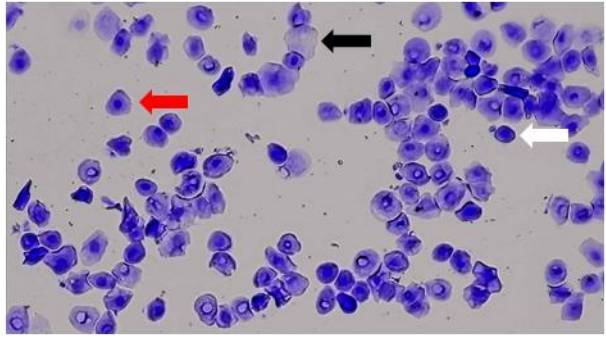


Figura 3. Proestro: Células epiteliais nucleadas (setas vermelhas); Estro: Células epiteliais cornificadas (setas pretas); Metaestro: Células epiteliais cornificadas e Leucócitos (setas brancas); Diestro: Células epiteliais cornificadas, nucleadas e Leucócitos.

Os gráficos referentes às respostas termorregulatórias das fêmeas submetidos ao exercício físico, em diferentes fases do ciclo estral, estão apresentados abaixo. Os gráficos 9 e 10 correspondem aos dados coletados durante os exercícios incremental e constante, respectivamente. Os gráficos sugerem que as fases do ciclo estral não representaram um fator interveniente (*i.e.*, uma covariante) nas comparações dos dados entre machos e fêmeas.

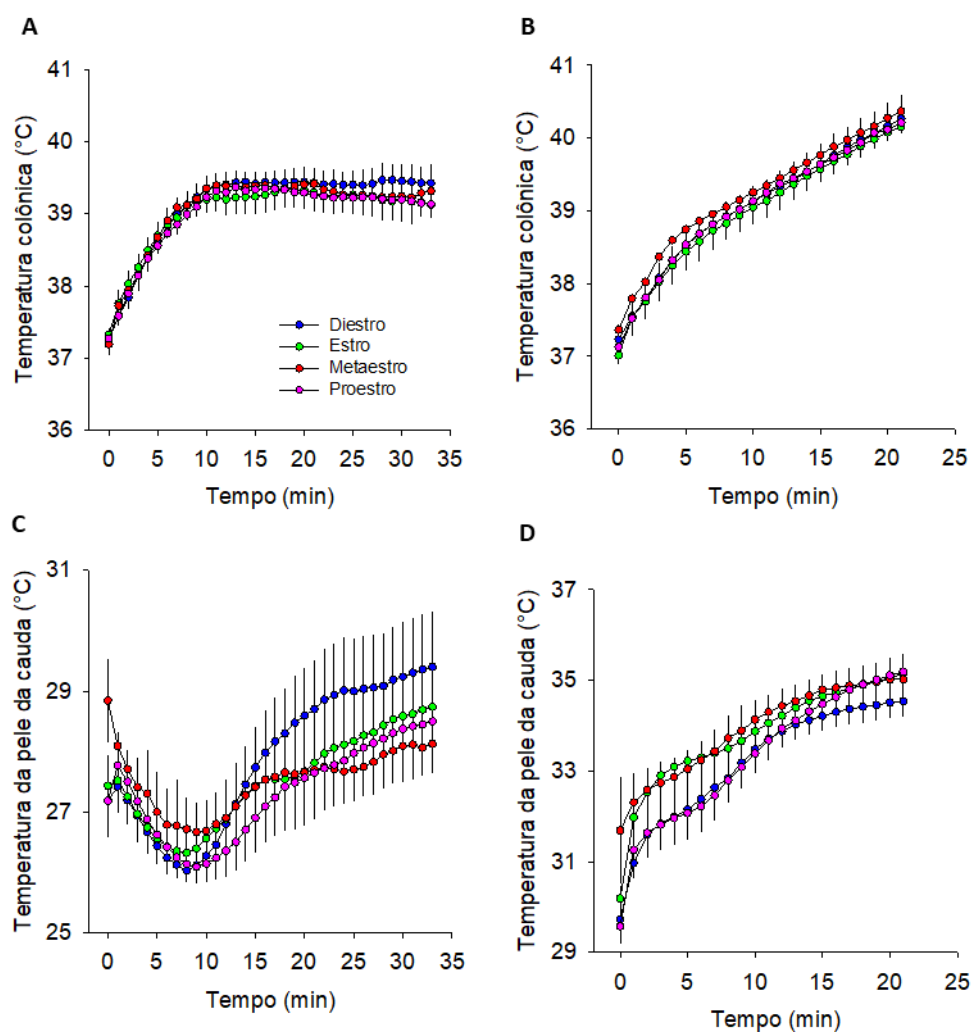


Gráfico 9. Temperatura colônica (painéis A e B) e da pele da cauda (painéis C e D) das ratas ao longo de dois exercícios incrementais até a fadiga em ambiente temperado (painéis A e C) e quente (painéis B e D). Fases: Diestro (n = 16); Estro (n = 8); Metaestro (n = 8); Proestro (n = 18).

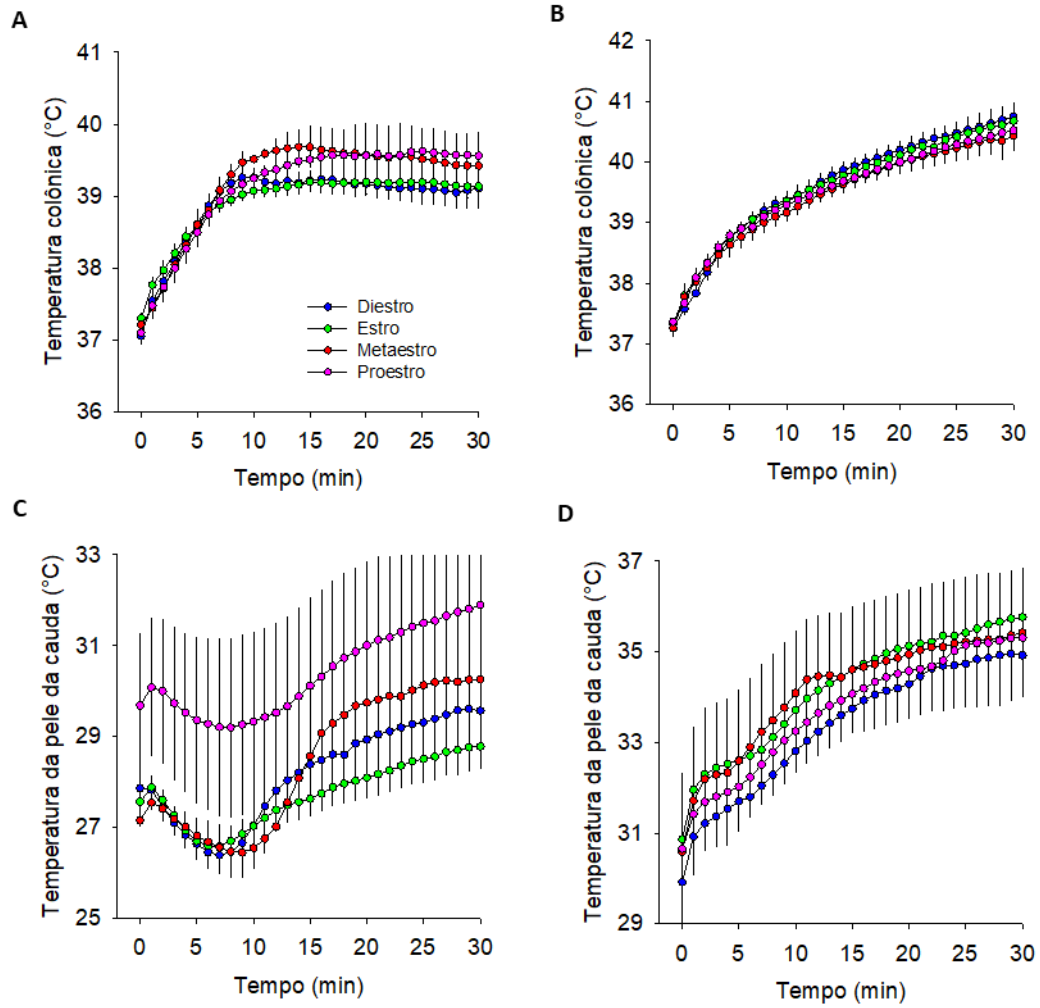


Gráfico 10. Temperatura colônica (painéis A e B) e da pele da cauda (painéis C e D) ao longo do exercício das ratas submetidas a dois exercícios constantes de trinta minutos em ambiente temperado (painéis A e C) e quente (painéis B e D). Fases: Diestro (n = 12); Estro (n = 18); Metaestro (n = 7); Proestro (n = 13).

## ANEXO I



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado "A influência da separação materna na termorregulação, taxa metabólica e desempenho de ratos machos e fêmeas submetidos ao exercício físico", protocolo do CEUA: 119/2021 sob a responsabilidade de Samuel Penna Wanner que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 12/07/2021.

Vigência da Autorização	12/07/2021 a 11/07/2026
Finalidade	Pesquisa
<b>*Espécie/linhagem</b>	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	6
Peso/Idade	300g / 2(meses)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG
<b>*Espécie/linhagem</b>	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	6
Peso/Idade	270g / 2(meses)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Central da UFMG

## ANEXO II

Artigo publicado utilizando-se base dados pertencentes ao Laboratório de Fisiologia do Exercício (UFMG) e que contém resultados coletados na presente dissertação de mestrado.

International Journal of Biometeorology  
<https://doi.org/10.1007/s00484-023-02453-z>

ORIGINAL PAPER



## Determinants of body core temperatures at fatigue in rats subjected to incremental-speed exercise: The prominent roles of ambient temperature, distance traveled, initial core temperature, and measurement site

Marcelo T. Andrade<sup>1</sup> · Nicolas H. S. Barbosa<sup>1</sup> · Roberto C. S. Souza-Junior<sup>1</sup> · Cletiana G. Fonseca<sup>1</sup> · William C. Damasceno<sup>1</sup> · Kássya Regina-Oliveira<sup>1</sup> · Lucas R. Drummond<sup>1,2</sup> · Myla A. Bittencourt<sup>1</sup> · Ana C. Kunstetter<sup>1</sup> · Pedro V. R. Andrade<sup>1</sup> · Alexandre S. R. Hudson<sup>1</sup> · Pedro H. Paula<sup>1</sup> · Francisco Teixeira-Coelho<sup>1,3</sup> · Cândido C. Coimbra<sup>4</sup> · Washington Pires<sup>1,5</sup> · Samuel P. Wanner<sup>1</sup>

Received: 16 September 2022 / Revised: 6 February 2023 / Accepted: 8 March 2023  
 © The Author(s) under exclusive licence to International Society of Biometeorology 2023

### Abstract

Understanding the factors that underlie the physical exercise-induced increase in body core temperature ( $T_{CORE}$ ) is essential to developing strategies to counteract hyperthermic fatigue and reduce the risk of exertional heatstroke. This study analyzed the contribution of six factors to  $T_{CORE}$  attained at fatigue in Wistar rats ( $n = 218$ ) subjected to incremental-speed treadmill running: ambient temperature ( $T_{AMB}$ ), distance traveled, initial  $T_{CORE}$ , body mass, measurement site, and heat loss index (HLI). First, we ran hierarchical multiple linear regression analyses with data from different studies conducted in our laboratory ( $n = 353$  recordings). We observed that  $T_{AMB}$ , distance traveled, initial  $T_{CORE}$ , and measurement site were the variables with predictive power. Next, regression analyses were conducted with data for each of the following  $T_{CORE}$  indices: abdominal ( $T_{ABD}$ ), brain cortex ( $T_{BRAIN}$ ), or colonic ( $T_{COL}$ ) temperature. Our findings indicated that  $T_{AMB}$ , distance traveled (*i.e.*, an exercise performance-related variable), initial  $T_{CORE}$ , and HLI predicted the three  $T_{CORE}$  indices at fatigue. Most intriguingly, HLI was inversely related to  $T_{ABD}$  and  $T_{BRAIN}$  but positively associated with  $T_{COL}$ . Lastly, we compared the temperature values at fatigue among these  $T_{CORE}$  indices, and the following descendent order was noticed –  $T_{COL}$ ,  $T_{ABD}$ , and  $T_{BRAIN}$  – irrespective of  $T_{AMB}$  where experiments were conducted. In conclusion,  $T_{CORE}$  in rats exercised to fatigue depends primarily on environmental conditions, performance, pre-exercise  $T_{CORE}$ , and measurement site. Moreover, the influence of cutaneous heat loss on  $T_{COL}$  is qualitatively different from the influence on  $T_{ABD}$  and  $T_{BRAIN}$ , and the temperature values at fatigue are not homogenous within the body core.

**Keywords** Brain · Environment · Heat · Hyperthermia · Performance · Physical exercise · Regression analysis · Temperature · Thermoregulation

✉ Samuel P. Wanner  
[samuelwanner@ufmg.br](mailto:samuelwanner@ufmg.br)

<sup>1</sup> Exercise Physiology Laboratory, School of Physical Education, Physiotherapy and Occupational Therapy, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, MG 31.270-901 Belo Horizonte, Brazil

<sup>2</sup> Department of Physical Education, Universidade do Estado de Minas Gerais, Unidade Divinópolis, MG, Divinópolis, Brazil

<sup>3</sup> Department of Sport Sciences, Institute of Health Sciences, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, MG, Uberaba, Brazil

<sup>4</sup> Laboratory of Endocrinology and Metabolism, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>5</sup> Physical Activity Laboratory, School of Physical Education, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, Brazil