

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de ciências biológicas

Departamento de fisiologia e biofísica

Pós-graduação em fisiologia e farmacologia

Hellen Maria Soares Nunes

**ALTERAÇÕES METABÓLICAS INDUZIDAS PELO ISOLAMENTO SOCIAL:
Papel do tecido adiposo marrom**

Belo Horizonte

2024

Hellen Maria Soares Nunes

**ALTERAÇÕES METABÓLICAS INDUZIDAS PELO ISOLAMENTO SOCIAL:
Papel do tecido adiposo marrom**

Dissertação de mestrado apresentada como requisito parcial para obtenção de título de Mestre pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais

Orientadora: Profa. Dra. Maristela de Oliveira Poletini

Belo Horizonte

2024

043

Nunes, Hellen Maria Soares.

Alterações metabólicas induzidas pelo isolamento social: papel do tecido adiposo marrom [manuscrito] / Hellen Maria Soares Nunes. – 2024.
50 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Prof.^a. Dr^a Maristela de Oliveira Poletini.

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

1. Fisiologia. 2. Ritmo Circadiano. 3. Relações Interpessoais. 4. Isolamento Social. 5. Regulação da Temperatura Corporal. I. Poletini, Maristela de Oliveira. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ICB - COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA - SECRETARIA

ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº 597 DE HELLEN MARIA SOARES NUNES

Às 14:30 horas do dia 18 do mês de dezembro de 2024, no Transmiteda através da Plataforma Microsoft Teams, realizou-se a sessão pública para a defesa da Dissertação de **Hellen Maria Soares Nunes**. A presidência da sessão coube à **Profa. Dra. Maristela de Oliveira Poletini**, orientadora. Inicialmente, a presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **Profa. Dra. Maristela de Oliveira Poletini**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, **Profa. Dra. Luciana Chagas Caperuto**, UNIFESP e **Prof. Dr. Samuel Penna Wanner**, EEEFTO/Universidade Federal de Minas Gerais. Em seguida, a candidata fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Dissertação de Mestrado**, intitulada: "**Alterações Metabólicas Induzidas Pelo Isolamento Social: Papel do Tecido Adiposo Marrom**". Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença da candidata e do público e decidiu considerar **APROVADA** a Dissertação de Mestrado. O resultado final foi comunicado publicamente a candidata pela presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, será assinada pela Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 18 de dezembro de 2024.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente **Samuel Penna Wanner** Professor do Magistério Superior em 21/01/2025, às 19:48, conforme horário de Brasília, com fundamento no art. 5º [Decreto nº 10.543 de 13 de novembro de 2020](#)



Documento assinado eletronicamente **Luciana Chagas Caperuto** Usuário Externo em 22/01/2025, às 16:08, conforme horário de Brasília, com fundamento no art. 5º [Decreto nº 10.543 de 13 de novembro de 2020](#)



Documento assinado eletronicamente por **Maristela de Oliveira Poletti**, Professora do Magistério Superior, em 23/01/2025, às 07:53, 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 https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_gao_acesso_externo= informando o código verificador **3853573** e o código CR **036DD758**.

AGRADECIMENTOS

O mestrado me proporcionou uma das maiores experiências de crescimento pessoal e profissional que tive na vida. Foram muitos desafios, renúncias, frustrações e conquistas. E como nunca se cresce sozinho e gostaria de agradecer a todos que tiveram comigo nessa jornada.

Gostaria de agradecer à minha orientadora Prof. Dr^a Maristela Poletini por ter acreditado em mim, por me receber com todo carinho, atenção e paciência em seu laboratório, me ensinando fundamentos que levarei para a vida profissional e pessoal.

Aos meus colegas de laboratório pela companhia, pelos cafés e por dividirem seu tempo comigo. Especialmente a minha companheira de laboratório e de momentos difíceis Tamires, com quem eu espero muito continuar dividindo bons momentos. A todos os professores do Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo pela convivência e ensinamentos e por toda dedicação nas disciplinas.

Um agradecimento especial ao meu marido Bruno, que estava ao meu lado nos momentos de conquistas e de medos durante esse desafio, e por acreditar em mim mesmo quando eu não estava. Gostaria de agradecer aos professores do departamento de Fisiologia e Biofísica, aos funcionários pela contribuição para manutenção da nossa pesquisa. Às agências de fomento CNPq e CAPES pelo financiamento à pesquisa.

RESUMO

Manter os laços sociais é tão crítico para a sobrevivência que o isolamento social é considerado um desafio à homeostase comparados com a fome e a sede. Mamíferos usam a interação social para manter a homeostase térmica, o que lhes permite economizar energia. Este fenômeno é crítico para animais pequenos, como os camundongos mantidos em laboratório. Em trabalhos anteriores, demonstramos que camundongos isolados mantêm seu pico circadiano na temperatura corporal central (Tc) às custas de um ganho de peso corporal reduzido em comparação aos camundongos mantidos agrupados. No entanto, não está claro como o metabolismo energético é afetado pelo isolamento social. O tecido adiposo marrom (*Brown Adipose Tissue* – BAT) é um tecido com habilidade única de gerar calor através da ação da proteína desacopladora 1 (*Uncoupling-protein-1*, UCP1). Além disso, o BAT tem a função de manter a Tc no estresse térmico induzido pelo frio. Em função disso, hipotetizamos que o isolamento social induz alterações no metabolismo por meio de adaptações do BAT para manter o ritmo diário de Tc. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a participação do BAT e da temperatura ambiente nos efeitos do isolamento social sobre o metabolismo energético e as variações circadianas de Tc. Foram utilizados camundongos adultos C57BL/6-UNI. Os animais foram mantidos isolados ou agrupados (4 animais por caixa – Grupo Controle) por 28 dias, em um regime de 12h de luz e 12h de escuro (luzes acesas à 7:00h) em duas condições térmicas: 28 ± 2 °C (condições sub-neutras) e, outra, à 25 ± 1 °C. A Tc e atividade locomotora espontânea (SLA) foram monitoradas por telemetria. Durante o protocolo a massa corporal e ingesta alimentar foram acompanhadas, e, ao final, a taxa metabólica foi avaliada por calorimetria de fluxo indireto. No 28º dia de protocolo, os animais foram eutanasiados no zeitgeber time (ZT) 1 e 10 para obtenção do BAT, o qual foi utilizado para análise de expressão gênica por qRT-PCR. Animais isolados à 25 ± 1 °C mostraram redução da Tc na metade da fase clara e valores de pico circadianos no início da fase escura comparáveis aos animais agrupados. Animais isolados à 25 ± 1 °C apresentaram uma menor razão de trocas respiratórias (RER) e maior gasto energético, o que pode ter contribuído para o menor ganho de peso ao longo das semanas. Estas diferenças entre agrupados e isolados não se repetiram à 28 ± 2 °C. A seguir, desafiámos o BAT com uma injeção i.p. do agonista do receptor adrenérgico tipo-3 (B3ADR) à 25 ± 1 °C, com o objetivo de mimetizar a resposta do BAT ao desafio do frio. Nos agrupados, como esperado houve um aumento da expressão de *Ucp1* e do gene da enzima lipase hormônio sensível (*Hsl*), enquanto nos isolados, observamos um aumento da expressão do gene *Rev-erba* e do *Coativador gama 1-alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissomo (PGC1a)*. Sabe-se que *Rev-erba* faz parte da alça acessória de regulação do relógio molecular e regula negativamente a UCP1. Frente a este resultado investigamos outros genes de relógio, bem como o efeito do isolamento em dois horários do dia. Animais isolados à 28 ± 2 °C apresentaram uma menor expressão de *Ucp1* and *PGC1a* no ZT1 (início da fase clara), enquanto no ZT10 não houve diferença na expressão destes genes entre agrupados e isolados. No ZT1, o isolamento também reduziu a expressão de *Per2*, sem alterar a expressão de *Per1* e *Bmal1*. Com base nestes resultados sugerimos que as alterações induzidas pelo isolamento social no metabolismo para manter o ritmo diário de Tc podem ser explicadas por mudanças na programação transcricional do BAT que parecem ser determinadas pelo horário do dia e pela temperatura ambiente.

Palavra-chave: ritmo circadiano, interação social, isolamento social, zona termoneutra, termorregulação

ABSTRACT

Maintaining social bonds is so critical for survival that social isolation has been reported as a challenge to homeostasis, comparable to hunger and thirst. Mammals use social interaction to maintain thermal homeostasis, allowing them to conserve energy. This phenomenon is particularly critical for small animals, such as laboratory mice. We have previously demonstrated that isolated mice maintain their circadian peak in core body temperature (T_c) at the expense of reduced body weight gain compared to group-housed mice. However, it is unclear how energy metabolism is affected by isolation conditions in these animals. Brown adipose tissue (BAT) is a unique tissue capable of generating heat through the action of uncoupling protein 1 (UCP1). Based on this, we hypothesized that social isolation induces metabolic changes through adaptations in BAT to maintain the daily rhythm of T_c throughout the day in isolated mice. The present study aimed to evaluate whether the effects of social isolation on energy metabolism and circadian variations in T_c involve BAT participation and/or modulation of environmental temperature. For this purpose, adult C57BL/6-UNI mice were used. Mice were maintained either in isolation or in groups (4 animals per cage – Control Group) for 28 days under a 12-hour light/dark cycle (lights on at 7:00 AM) in two thermal conditions: one closer to the thermoneutral zone (28 ± 2 °C) and another outside this temperature zone (25 ± 1 °C). T_c and spontaneous locomotor activity (SLA) were monitored by intra-abdominal telemetry probes. Body mass and food intake were tracked throughout the protocol, and at the end, metabolic rate was assessed using indirect calorimetry. On the 28th day of the protocol, the animals were euthanized at zeitgeber time (ZT) 1 and 10 to obtain intrascapular BAT for gene expression analysis by qRT-PCR. T_c was lower in the middle of light phase in isolated mice at 25 ± 1 °C, while the circadian peak in T_c shown by isolated mice was comparable to grouped mice. Isolated mice at 25 ± 1 °C showed lower respiratory Exchange ratio (RER) and higher energy expenditure (EE), which may have contributed to the lower body weight gain during the protocol. These differences in T_c rhythm and metabolic responses between grouped and isolated mice were not observed at 28 ± 2 °C. Next, we challenged the BAT with an i.p. injection of a type-3 adrenergic receptor agonist (B3ADR) at 25 ± 1 °C to mimic the BAT response to cold exposure. In grouped animals, as expected, there was an increase in the expression of *Ucp1* and the hormone-sensitive lipase (*Hsl*) gene, whereas in isolated animals, we observed an increase in the expression of the *Rev-erba* gene and the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1-Alpha (*PGC1α*). It is known that *Rev-erba* is part of the accessory loop of molecular clock regulation and negatively regulates UCP1. Based on this result, we investigated other clock genes as well as the effect of isolation at two different times of day. Socially isolated animals at 28 ± 2 °C showed lower expression of *Ucp1* and *PGC1α* at ZT1 (the beginning of the light phase), whereas at ZT10, no differences in the expression of these genes were observed between grouped and isolated animals. At ZT1, isolation also reduced the expression of *Per2* without altering the expression of *Per1* or *Bmal1*. Based on these results, we suggest that the social isolation-induced changes in metabolism to maintain the daily T_c rhythm can be explained by alterations in the transcriptional programming of BAT, which appear to be determined by the time of day and ambient temperature.

Keywords: circadian rhythm, social interaction, social isolation, thermoneutral zone, thermoregulation.

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP - Adenosina trifosfato

BAT - Brown Adipose Tissue

B3ADR - Receptores B-3-adrenérgicos

BMAL1 - Brain and muscle Arnt-like protein 1

CLOCK - Circadian Locomotor Output Cycles Kaput

CPT1 α - Carnitina palmitoil transferase tipo 1

CRY - Cryptochrome

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

FADH2 - Flavina adenina dinucleotídeo reduzido

GH - Grouped house

LD - Light/dark

NADH - Nicotinamida adenina di-nucleotídeo

NSQ - Núcleo supraquiasmático

PER - Period

PKA - Proteína quinase A

PGC1 α - Coativador gama 1-alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissomo

REVERB α - Reverse-erythroblastosis virus alpha Nuclear Receptor subfamily 1

RER - Razão de trocas respiratórias

ROR - Nuclear orphan receptor

SH - Single housed

SLA - Spontaneous locomotor activity

Tc - Temperatura corporal central

TMB - Taxa Metabólica Basal

UCP1 - Uncoupling Protein 1

VO2 - Volume de oxigênio

ZNT - Zona termoneutra

ZT - Zeitgeber

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Relógio circadiano interno e <i>zeitgebers</i> externos. Osciladores circadianos no cérebro e em órgãos periféricos.....	13
Figura 2: Localização do tecido adiposo marrom humano (hBAT) e roedores.....	15
Figura 3: Sistema simplificado da cascata de ativação molecular termogênica do BAT.....	18
Figura 4: Princípios básicos para a produção de calor no BAT.....	19
Figura 5: As consequências energéticas de diferentes temperaturas ambiente.....	21
Figura 6: Dados de registros telemétricos de temperatura abdominal e atividade locomotora espontânea de camundongos agrupados e isolados.....	29
Figura 7: Dados de registros do quociente respiratório e gasto energético medido no tempo <i>zeitgeber</i>	30
Figura 8: Transcrições de <i>Ucp1</i> , <i>Hsl</i> , <i>Rev-erb-α</i> , <i>Pgc1α</i> e <i>Cpt1α</i> no BAT de camundongos agrupados e isolados mantidos em 25 ± 1 °C.....	31
Figura 9: Dados de registros telemétricos de temperatura abdominal e atividade locomotora espontânea de camundongos agrupados ou isolados alojados em uma temperatura de $28^{\circ} \pm 1$	32
Figura 10: Transcrições de UCP1, PGC1 α , CPT1 α na tecido adiposo marrom obtidos no <i>zeitgeber</i> time ZT1 e no ZT10 de camundongos alojados em uma temperatura de $28^{\circ} \pm 1$	33
Figura 11: Transcrição de genes de relógio da alça principal do relógio molecular no tecido adiposo marrom obtidos no <i>zeitgeber</i> time ZT 1 e ZT10 de camundongos alojados em uma temperatura de $28^{\circ} \pm 1$	34
Figura 12: Transcrição de genes de relógio da alça acessória do relógio molecular no tecido adiposo marrom obtidos no <i>zeitgeber</i> time ZT1 e ZT10 de camundongos alojados em uma temperatura de $28^{\circ} \pm 1$	35

SUMÁRIO

1. REVISÃO DE LITERATURA.....	12
1.1 Sistema circadiano temporal.....	12
1.2 Isolamento social.....	14
1.3 Tecido adiposo marrom.....	15
1.4 Termorregulação.....	19
2. JUSTIFICATIVA.....	22
3. HIPÓTESE.....	23
4. OBJETIVOS.....	23
4.1 Objetivo geral.....	23
4.2 Objetivos específicos.....	23
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
5.1 Animais.....	24
5.2 Procedimentos cirúrgicos.....	24
5.2.1 Implantação de sensor de telemetria.....	24
6. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	25
6.1 Experimento 1: O efeito do isolamento social sobre os ritmos diários de Tc e SLA no início do protocolo de isolamento.....	25
6.2 Experimento 2: O efeito do isolamento social sobre metabolismo energético.....	25
6.3 Experimento 3: Efeito do isolamento social sobre a expressão dos genes <i>clocks</i>	26
6.4 Experimento 4: Efeito do isolamento social sobre a ativação farmacológica do TAB.....	27
7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	28
8. RESULTADOS.....	28
9. DISCUSSÃO.....	35
10. CONCLUSÃO.....	42
11. REFERÊNCIAS.....	44

1. REVISÃO DE LITERATURA:

1.1 Sistema temporal circadiano

Os mecanismos de busca pelo alimento, assim como de digestão e metabolismo são regulados pelo sistema temporal circadiano. Sabe-se que o relógio circadiano modula a expressão de muitas enzimas metabólicas de maneira específica ao horário do dia.

Nos mamíferos, o relógio circadiano celular consiste em uma alça de retroalimentação entre fatores de transcrição que regulam a expressão de vários genes. O cerne desta alça de retroalimentação é formado pelos heterodímeros de proteínas *CLOCK* (ou NPAS) e *BMAL1*, os quais conduzem a expressão de seus próprios repressores, *CRY* (1 e 2) e *PER* (1, 2 e 3) (CHAIX, et al, 2019). *CLOCK:BMAL* também ativa a expressão de receptores nucleares, tais como, o receptor órfão relacionado ao ácido retinóico (*ROR*) e o *Rev-erb* (*Rev-erba* e *Rev-erbb*), que regulam a expressão do gene *Bmal1* (HARDIN, 2013). Uma importante propriedade dos relógios circadianos consiste no fato de que a oscilação desta alça de regulação transcricional opera de forma autossustentada, ou seja, quando em condições constantes, a oscilação da expressão das proteínas de relógio persiste por aproximadamente 24 horas. Além disso, esta alça molecular pode ser sincronizada por pistas ambientais rítmicas tais como luz, temperatura e disponibilidade de alimentos (SANCAR e BRUNNER, 2014).

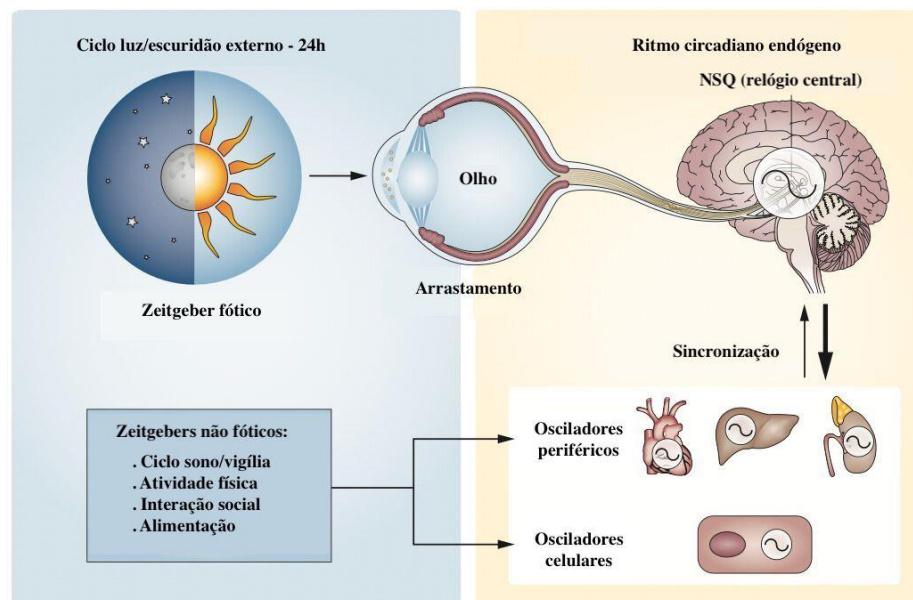
As diferentes pistas ambientais são denominadas *zeitgebers* (ZT), uma palavra do idioma alemão que significa doadores de tempo (ASCHOFF & POHL, 1978) e na ausência delas, em especial em escuro constante, o relógio circadiano assume seu período próprio de aproximadamente 24 horas. A essa condição dá-se o nome de livre curso ou *free-running* (PITTENDRIGH, 1993).

Em mamíferos, os relógios circadianos organizam-se de maneira hierárquica em um relógio central, localizado no núcleo supraquiasmático do hipotálamo (NSQ) e em relógios periféricos, presentes em outras áreas do sistema nervoso central e nos demais órgãos e tecidos periféricos. O relógio central é o responsável por transmitir informações sobre as condições do meio externo aos relógios periféricos e, desse modo, manter todo o organismo sincronizado ao ciclo de luz ambiental (figura 1). Essa comunicação acontece por vias humorais e hormonais.

A principal pista temporal externa para a sincronização do relógio central é a luz. Os níveis de luminosidade são conduzidos diretamente da retina para o NSQ através do trato retino-hipotalâmico (BUTTGEREIT, et al. 2015).

Além dos ciclos de luminosidade e escuridão impostos pelo movimento de rotação da Terra em torno do seu próprio eixo, pistas não fóticas também são capazes de auxiliar na sincronização dos relógios periféricos como alimentação, atividade física e interação social (BALSALOBRE et al., 2000; TERAZONO et al., 2003).

Em relação a interação social, já foi demonstrado que, em um ciclo luz-escuridão de 12:12h, ratos *Wistar* agrupados com coespecíficos do mesmo sexo aumenta a estabilidade e a amplitude do ritmo diário de Temperatura corporal central (Tc) comparados com ratos do mesmo sexo mantidos em isolamento. Já em luz constante, que provoca arritmicidade e enfraquecimento dos ritmos circadianos, não foi observada diferença na estabilidade do ritmo diário de temperatura corporal central entre animais agrupados e isolados (CAMBRAS et al., 2011). Dessa forma, a interação social contribui de forma decisiva para o ritmo circadiano de Tc, em condições de ciclo luz-escuridão 12/12h.



Adaptado de BUTTGEREIT, et al. 2015

Figura 1: Relógio circadiano interno e *zeitgebers* externos. Osciladores circadianos no cérebro e em órgãos periféricos.

1.2 Isolamento social

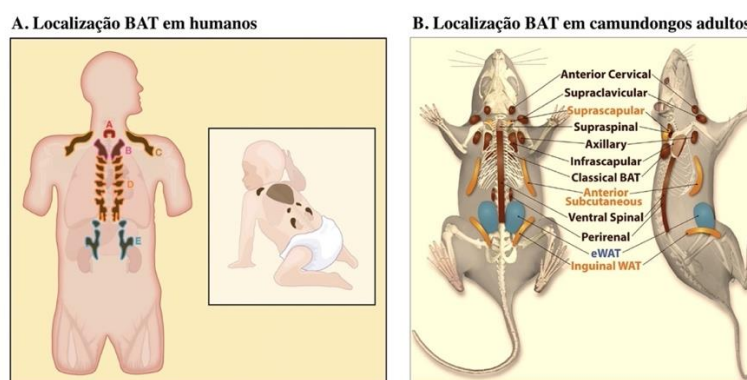
Manter os laços sociais é tão crítico para a sobrevivência que o isolamento social tem sido relatado como um desafio à homeostase em comparação com a fome e a sede (LEE, et al, 2021; TOMOVA et al., 2020). Os mamíferos usam a interação social para manter a homeostase térmica, o que lhes permite economizar energia (BATCHELDER, et al., 1983). Demostramos em nosso laboratório, que camundongos isolados mantêm seu pico circadiano de Tc à custas de uma redução no ganho de peso corporal em comparação aos camundongos agrupados (FERNANDES, et al.; 2021). Dados similares foram encontrados por Hamilton e colaboradores (2022). Neste estudo, além de mostrar o efeito do isolamento social sobre a redução do peso corporal, de forma interessante, revelou que a condição de agrupamento reverte o aumento da resistência à sepse bacteriana, possivelmente pelo efeito de um melhor controle térmico em função da convivência social e do comportamento de aglomeração, o que pode ter contribuído para a regulação da resposta imune do hospedeiro à infecção em camundongos (HAMILTON, et al.; 2022).

Apesar de alguns relatos na literatura sobre o efeito do isolamento social sobre o ganho de peso corporal, não está claro como o metabolismo energético é afetado pela condição de isolamento. Camundongos alojados individualmente podem mostrar um aumento ou nenhuma alteração na ingestão de alimentos (FUNABASHI, et al., 2022). O aumento da atividade locomotora espontânea (SLA) também não explica de forma consistente, a redução no ganho de peso corporal porque, ao contrário, camundongos alojados sozinhos apresentam redução da amplitude do ritmo de SLA com reduzida SLA na fase escura (CLEMENZA, et al., 2021; FERNANDES et al., 2021). Dessa forma, aventamos que alterações nas respostas termorregulatórias poderiam contribuir para o aumento do gasto energético, visto que os animais isolados são privados do componente comportamental da termorregulação, a interação social (NAGASHIMA et al., 2000). Portanto, possivelmente, os animais isolados precisam ativar termogênese a fim de atingir os mesmos níveis de Tc dos animais agrupados na fase escura, conforme mostramos anteriormente (FERNANDES et al., 2021).

O tecido adiposo marrom é o local primário da termogênese metabólica, ou seja, do calor produzido sem tremor. Dessa forma, levantamos a possibilidade deste tecido ter sofrido alterações induzidas pela condição de isolamento social que garantissem a manutenção do ritmo circadiano de Tc.

1.3 Tecido adiposo marrom

Há mais de 60 anos sabe-se que o tecido adiposo marrom (Brown Adipose Tissue - BAT) tem papel na produção de calor, sendo esse o fator que mantém os mamíferos aquecidos e os ajuda a despertar da hibernação. A produção de calor pelo BAT se dá através do uso da energia alimentar, por isso, o tecido adiposo marrom ativado pode utilizar parte da energia advinda dos alimentos, ou mesmo, a energia já armazenada no organismo (NEDERGAARD, 2023). O BAT gera calor através, predominantemente, da termogênese sem tremores, sendo formado e diferenciado antes do nascimento para proteger os recém-nascidos do frio. Porém, apesar de estar presente também em adultos, a atividade do BAT diminui em vários estados patológicos, como obesidade, diabetes e envelhecimento. Conforme figura 2A, podemos observar que, em humanos, o BAT se localiza nas regiões supraclavicular, axilar, pescoço, periaórtico, paravertebral, perirenal e mediastinal (GHESMATI, et al. 2024). Em camundongos, a distribuição do BAT se assemelha a de humanos com um alto incidência do tecido na região interescapular (Figura 2B). Alta vascularização e inervação simpática é uma característica marcante do BAT, além de ter um alto conteúdo mitocondrial, fazendo com que, macroscopicamente, tenha uma aparência marrom, devido aos fatores heme da enzima mitocondrial citocromo oxidase (FRONTINI e CINTI, 2010).



Adaptado de ENERBACK, 2010 e ZHANG et al, 2018

Figura 2: A. Localização do tecido adiposo marrom humano em adultos e crianças, na figura modificada de Enerback 2010, as letras A, B, C e D indicam a região onde este tecido se localiza. B. Localização do tecido adiposo marrom em camundongos adultos, a figura foi modificada a partir de Zhang et al, 2018.

A termogênese caracterizada pela não ocorrência de tremores (termogênese sem tremor) é o processo, pelo qual, o BAT preserva a temperatura corporal. Essa termogênese é mediada

pela proteína de desacoplamento específica de adipócitos marrons (*UCP1*). A *UCP1* está localizada na membrana mitocondrial interna e transporta íons H^+ do espaço inter-membranas para a matriz mitocondrial (NEDERGAARD, 2023).

A capacidade termogênica do BAT está acoplada aos processos de utilização de glicose e ácidos graxos que além de fornecer os substratos energéticos para a produção de energia durante o ciclo de Krebs, ativam a *UCP1*. Na matriz mitocondrial o piruvato vindo da glicólise é convertido em acetil-CoA que entra no ciclo de Krebs (ou ciclo do ácido cítrico) produzindo nicotinamida adenina di-nucleotídeo (NADH) e flavina adenina dinucleotídeo reduzido (FADH₂). Por outro lado, a beta-oxidação dos ácidos graxos que também ocorre na matriz mitocondrial é a outra fonte de acetil-CoA. Após a lipólise, os ácidos graxos são convertidos em acil-coa, ou seja, ácidos com cadeias carbônicas menores que os ácidos graxos originais, mas ainda acima de 2 carbonos, esta redução da cadeia carbônica permite que o acil-coa adentrem a matriz mitocondrial, um processo mediado pela carnitina-palmitoil transferase (CPT I e II). Uma vez na matriz mitocondrial, o acil-coa passará pela beta-oxidação gerando acetil-CoA. Assim, o ciclo de Krebs alimentado pela glicose e pelos ácidos graxos que fornecem piruvato e acil-coa, respectivamente, gerando acetil-coa na matriz mitocondrial, produz NADH e FADH₂, doando elétrons, que passaram para a cadeia transportadora de elétrons o que resultará na geração de um gradiente de prótons entre matriz e espaço inter-membranas da mitocôndria. A cadeia transportadora de elétrons consiste dos complexos C1 (NADH desidrogenase), C2 (Succinato desidrogenase), complexo 3 e 4, além da co-enzima Q e citocromo C que localizam-se na membrana interna da mitocôndria. Enquanto os elétrons passam por estas proteínas de membrana, os H^+ deixa o espaço da matriz em direção ao espaço inter-membranas da mitocôndria. A dissipação deste gradiente, ou seja, o retorno dos H^+ para a matriz acontecerá por duas rotas. Uma ocorre pela ativação pelos prótons H^+ da enzima ATP-sintase, localizada na membrana interna da mitocôndria. A ATP-sintase, por sua vez, ativa a fosforilação oxidativa (ou seja, a conversão de ADP + Pi em ATP), capaz de gerar 28 ATP por molécula de glicose, ou seja, um processo com alta eficiência energética. Dessa forma, a dissipação do gradiente por esta rota está acoplada a respiração celular e produção de ATP. A outra rota envolve a ativação da *UCP1*, primariamente pelos prótons H^+ , no entanto, reconhece-se vários fatores que podem aumentar tanto a transcrição desta proteína de membrana quanto sua ativação (GHESMATI, et al. 2024; WHITE, DEWAL e STANFORD, 2019; NEGROIU, et al. 2024). Por exemplo, como

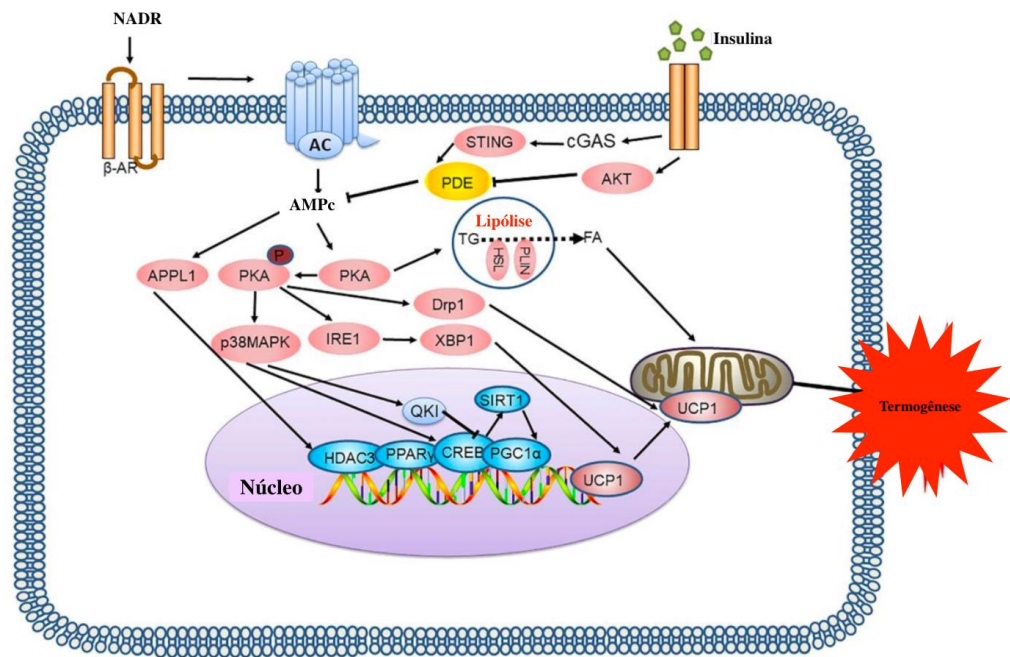
já mencionado acima, os ácidos graxos diretamente ativam UCP1, e descreveremos a seguir a ativação neural da UCP1 pelo sistema simpático.

Uma vez ativada, a UCP1 permitirá que prótons H^+ retornem à matriz mitocondrial dissipando o gradiente. Neste processo, calor é gerado, desacoplando a dissipação do gradiente com a produção de energia. Além disso, ocorrerá a potencialização da cadeia transportadora de elétrons, que funcionará de forma proeminente para alimentar o gradiente que está em processo de ser eficientemente dissipado pela rota termogênica, via UCP1 e produção de calor (GHESMATI, et al. 2024; WHITE, DEWAL e STANFORD, 2019; NEGROIU, et al. 2024).

Considerando a regulação neural da termogênese no BAT, sabe-se que a ativação da UCP1 pode ocorrer em resposta à sinalização adrenérgica através do sistema nervoso simpático (MCNEILL, et al. 2021). As alterações de temperatura, provocadas pela exposição ao frio, estimulam os termorreceptores presentes na pele, que são responsáveis pela transdução do aumento ou diminuição da temperatura aos neurônios sensoriais, sinalizando esta alteração pela via sensorial ascendente para os gânglios da raiz dorsal, de onde segue para a porção lateral do núcleo parabraquial no tronco encefálico. O núcleo parabraquial envia projeções para os interneurônios GABAérgicos da área pré-óptica medial, inibindo estes neurônios. A área pré-óptica medial, por sua vez, envia projeções hipotálamo dorsomedial, atenuando sua inibição e levando a ativação de neurônios na porção rostral do núcleo pálido da rafe, que ativa neurônios na região intermediolateral da medula espinhal. Esses neurônios se interligam com os neurônios do gânglio estrelado, para que estes liberem noradrenalina e neuropeptídeo Y para ativação da via de sinalização adrenérgica no BAT, com consequente produção de calor (MORRISON; MADDEN; TUPONE, 2015).

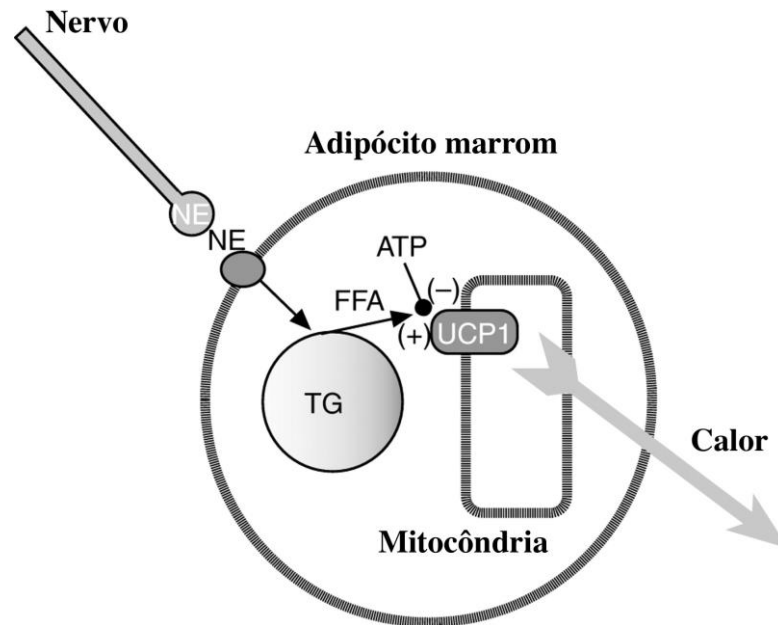
Assim, após a exposição ao frio, os neurônios simpáticos liberam noradrenalina (NE) da região da sinapse. A NE se liga a vários receptores beta-adrenérgicos. Embora existam três tipos principais de receptores beta-adrenérgicos (β -AR), β_1 , β_2 e β_3 , o que é predominantemente expresso no BAT, e mais provável de mediar a ativação pela estimulação beta-adrenérgica é o receptor β_3 . Essa ligação ao receptor beta-adrenérgico causa a elevação dos níveis de adenosina monofosfato cíclico (AMPC), que facilita a ativação da proteína quinase A (PKA). A PKA fosforila alvos a jusante, incluindo a proteína quinase ativada por mitógeno p38 (p38 MAPK), a proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPC (CREB), a lipase hormônio sensível (*Hsl*) e o fator de transcrição Coativador gama 1-alfa do receptor ativado por

proliferador de peroxissoma (*PGC1 α*) que estimula a transcrição da *UCP1* (figura 3). A fosforilação de p38 e CREB inicia a ativação de genes envolvidos na termorregulação. No mesmo momento, a *Hsl* promove a lipólise, liberando ácidos graxos que se ligam diretamente a *UCP1*, ativando-a em adipócitos termogênicos. Assim, os ácidos graxos livres contribuem para o aumento da atividade da *UCP1* (figura 4).



Adaptado de ZHANG et al, 2021

Figura 3: Sistema simplificado da cascata de ativação molecular termogênica do BAT



Adaptado de CANNON e NEDERGAARD, 2011

Figura 4: Princípios básicos para a produção de calor no BAT

O *PGC1 α* ativa também a isoforma α da CPT1 (*CPT1 α*), que catalisa a etapa limitante da oxidação de ácidos graxos mitocondriais, promovendo o transporte de acil-coa para a matriz mitocondrial (SCHLAEPFER and JOSHI, 2020). A ativação da *CPT1 α* também favorece a termogênese via aumento da expressão de *UCP1* (SCHREIBER et al., 2017).

Além da termogênese induzida pela via clássica dos ligantes beta-adrenérgicos, outros estudos demonstraram induzir, de forma independente a maquinaria termogênica no BAT, destacando a complexidade da termorregulação. Alguns desses mecanismos envolvem sinalização por vários outros sinais externos, como hormônios metabólitos, os peptídeos natriuréticos atriais e acetilcolina (SAKAGUCHI, 2024).

1.4 Termorregulação

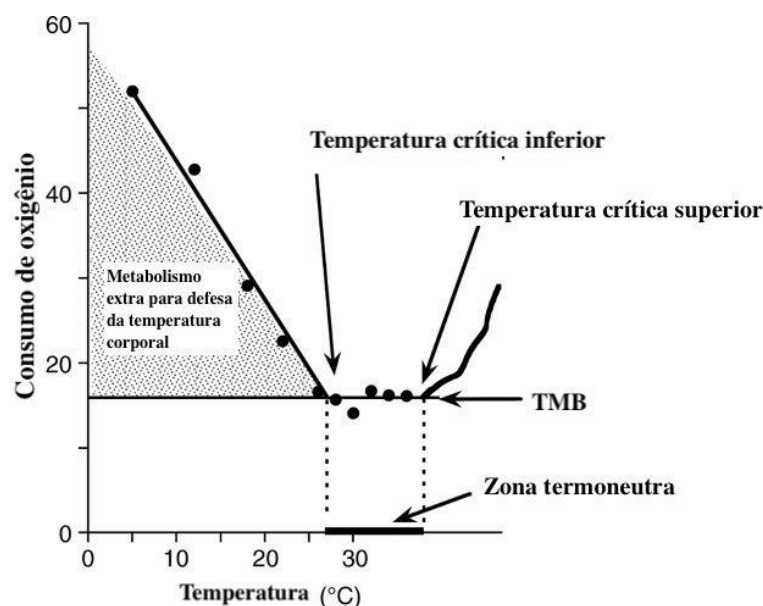
A flutuação circadiana da temperatura corporal é uma das saídas mais proeminentes e estáveis do sistema temporal circadiano, e desempenha um papel importante na manutenção da homeostase energética ideal dia e noite (MIYAKE, et al. 2024).

Para todos os mamíferos, há uma faixa de temperatura ambiente dentro da qual o metabolismo geral do organismo, na ausência de qualquer atividade física, gera calor suficiente

como um subproduto do metabolismo em andamento contínuo para que a sua temperatura corporal predeterminada seja mantida. Essa faixa de temperatura é conhecida como zona termoneutra (ZTN). Na ZTN destacam-se a temperatura ambiente crítica inferior, onde os mecanismos de produção de calor (aumento de consumo de oxigênio) serão acionados e a temperatura crítica superior, onde os mecanismos de dissipação de calor serão acionados. Entre os valores de temperatura crítica inferior e superior, o organismo apresenta sua taxa metabólica basal (TMB) (SCHIMIDT-NIELSEN, 1990).

A Tc dos camundongos está sujeita a flutuações marcantes ao longo de um período de 24 horas, mesmo quando alojados em condições ideais. E sua Tc pode cair vertiginosamente quando enfrentam desafios ambientais. Como camundongos são animais noturnos, sua temperatura durante a fase clara do ciclo circadiano, quando encontram-se na fase de repouso ou pouca atividade sofre pouca variação, já na fase escura, onde estão em atividade, a Tc destes animais é mais lábil e maior do que a fase clara (REFINETTI, 2010).

Na exposição moderada ao frio, um animal tentará inicialmente defender sua temperatura corporal por meios energeticamente baratos, como vasoconstrição e piloereção, e por mudanças na postura para diminuir a área de superfície de contato. Se tais medidas não se mostrarem suficientes, o animal aumentará a sua produção de calor endógena. Esse aumento ocorrerá inicialmente por meio da termogênese de tremores. Havendo contrações musculares involuntárias, liberando ATP, que será hidrolisado e o calor será liberado (figura 5) (CANNON e NEDERGAARD, 2011).



Adaptado de CANNON e NEDERGAARD, 2011

Figura 5: As consequências energéticas de diferentes temperaturas ambiente.

Em temperaturas acima da temperatura crítica superior, o metabolismo ativa mecanismos de resfriamento que o animal deve utilizar para diminuir a T_c . Já na temperatura crítica inferior, o animal inicia a produção de calor para defender a T_c (CANNON e NEDERGAARD, 2011).

O relógio molecular circadiano é um regulador crucial da termogênese do BAT. No BAT, a expressão circadiana do gene do relógio *Rev-erba* atinge maiores valores de expressão em anti-fase com o ritmo circadiano de T_c . Sugere-se que *Rev-erba* atue como fator integrador, capaz de modular a função do BAT, principalmente pela capacidade de inibir a *UCP1*. A regulação da expressão do *Rev-erba* não está diretamente associada ao frio, dessa forma, esta rota circadiana de produção da termogênese possa ser acionada por mecanismos internos de ajustes termo-regulatórios ou metabólicos, garantindo a manutenção de T_c não só em situações de defesa térmica à estresses ambientais (GERHART-HINES et al. 2013).

Já foi demonstrado que, camundongos nocautes para *Rev-erba* apresentam T_c mais alta durante a fase de luz, indicando a necessidade de *Rev-erba* para redução diária da T_c , muito provavelmente pelo seu efeito em reduzir a *UCP1* no BAT e, consequentemente, a ritmicidade termogênica. Estudos *in vivo* e *in vitro* mostram uma ligação direta entre esse gene e a expressão

de *UCP1* (WEST et al. 1999). A regulação do *Rev-erba* na expressão da *UCP1* no BAT parece operar em paralelo à liberação de NE desencadeada pelo frio, pois camundongos sem receptores beta-adrenérgicos ainda respondem ao frio com a redução no *Rev-erba* (RAZZOLI, et al. 2018). Portanto, o ritmo circadiano de expressão do *Rev-erba* parece regular a atividade termogênica do BAT, aumentando a Tc quando camundongos estão acordados e potencialmente expostos a condições ambientais adversas e diminuindo a termogênese durante o sono, quando estão tipicamente em abrigo protetor. No caso de o animal ser confrontado por um desafio repentino de temperatura durante o sono, a redução rápida do *Rev-erba* facilitaria a indução apropriada de programas termogênicos e a sobrevivência do organismo (GERHART-HINES et al. 2013). Dessa forma, do ponto de vista molecular, o relógio circadiano é fundamental para garantir as oscilações de Tc via regulação da termogênese do BAT.

Nosso grupo de pesquisa mostrou que o isolamento social foi capaz de alterar o perfil circadiano de expressão de *Rev-erba* no BAT, de tal maneira que o pico de expressão deste gene ocorre de forma precoce, subsequentemente, um aumento de *UCP1* em relação aos animais agrupados. Este aumento pode ter favorecido o aumento de consumo de VO₂ durante a transição da fase clara para a fase escuro, e consequentemente, o pico circadiano de Tc observado nos animais isolados (FERNANDES et al, 2023).

2. JUSTIFICATIVA

A temperatura do ambiente pode afetar de forma decisiva o metabolismo, a atividade locomotora, o crescimento e desenvolvimento, o consumo alimentar e hídrico entre outros aspectos da fisiologia e do comportamento dos animais. Sabe-se que camundongos alojados individualmente preferem temperatura ambiente entre 30 e 31°C (GORDON et al, 1991).

Essa faixa de temperatura ambiente é equivalente à zona termoneutra do camundongo, onde a taxa metabólica e a perda de calor evaporativo estão próximas dos níveis basais. Na maioria dos biotérios, a temperatura ambiente é mantida em torno de 22°C. Por outro lado, porque os camundongos são mantidos em caixas de cinco ou mais, e, geralmente mantêm contato corporal próximo durante todo o dia, presume-se que o conforto térmico para grupos de camundongos alojados em condições padrão não esteja comprometido (GORDON, 1985; GORDON, 1993; GORDON et al, 1991). Assim, a interação social é essencial para manter a

homeostase térmica, permitindo economizar energia e a fisiologia de animais pequenos, como os camundongos mantidos em laboratório.

Em mamíferos, a Tc varia de acordo com fases do ciclo claro e escuro ambiental. Em roedores de hábitos noturnos, o pico dessa temperatura central ocorre no início da fase escura (REFINETTI, 2010). Camundongos mantidos isolados por 28 dias alteram o perfil circadiano da temperatura corporal central, mostrando um nadir reduzido durante a fase clara, embora apresentem valores de pico semelhantes aos camundongos mantidos agrupados (FERNANDES et al 2021). Interessantemente, animais isolados apresentam uma redução do ganho de peso corporal, indicando alterações metabólicas para a manutenção da temperatura corporal central. Assim, este estudo buscou investigar o impacto do isolamento social no metabolismo energético e a participação do BAT nos mecanismos adaptativos desencadeados para a manutenção do ritmo da Tc através da ativação da termogênese.

3. HIPÓTESE

O isolamento social é capaz de modificar a expressão de UCP1 e de genes do relógio biológico no BAT, a fim de ativar a termogênese em camundongos fora da sua zona termoneutra para adaptação do metabolismo energético desses animais.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral:

Avaliar a participação do BAT nas alterações metabólicas induzidas pelo isolamento social em camundongos mais distantes e mais próximos da zona termoneutra, respectivamente nas temperaturas de 25°C e 28°C.

4.2 Objetivos específicos:

- Avaliar o efeito do isolamento social no ritmo circadiano de Tc e SLA à 25°C e à 28 °C
- Avaliar o efeito do isolamento social sobre a expressão do gene *Ucp1* e das enzimas relacionadas com a termogênese à 25°C e 28°C.
- Avaliar o efeito do isolamento social sobre o metabolismo energético, através do monitoramento do volume do consumo de oxigênio (VO₂) à 25°C.
- Avaliar o efeito do isolamento social sobre a expressão dos genes do relógio circadiano à 25°C e 28°C.

- Avaliar o efeito do isolamento social sobre a ativação farmacológica do BAT pelo agonista beta-3-adrenérgico à 25°C sobre a expressão dos genes de relógio e da via termogênica.

5. MATERIAIS E MÉTODOS:

5.1 Animais:

Foram utilizados camundongos C57BL6/J-UNI machos de 7-8 semanas de idade, provenientes do Biotérico Central da UFMG. Os animais permaneceram em ciclo claro e escuro de 12:12 h (as luzes acenderam as 7:00 AM, ZT0, 300 lux de luz branca), com temperatura ambiente de aproximadamente 25 ± 1 °C e 28 ± 1 °C, com ração e água *ad libitum*. O período de habituação ao ambiente foi de uma semana. Após esse período, os animais foram divididos em: 1) *Groupe housed* (GH) ou grupo controle (4 animais/caixa); ou 2) *Single housed* (SH) (1 animal/caixa). O uso de maravalha teve uma quantidade criteriosamente padronizada para impedir que os animais formassem ninhos, o que seria um fator que poderia influenciar a troca de calor do animal com o ambiente. Sendo utilizado um protocolo de 28 dias de isolamento ou agrupamento social. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (protocolo nº 11/2018).

5.2 Procedimentos cirúrgicos:

5.2.1 Implante de sensor de telemetria

Os animais foram anestesiados com uma mistura de ketamina (cloridrato de Cetamina, Cetamin 80 mg/Kg, i.p.) e xilazina (cloridrato de xilazina, Anasedan 16 mg/Kg i.p.) para implante do sensor de telemetria (modelo G2 EMitter, Mini-MitterCompany, Sun River, OR, USA) na cavidade peritoneal para registro dos ritmos circadianos de atividade SLA e Tc. O procedimento de locação do implante foi realizado sem que ocorre a implantação do sensor de telemetria em outro grupo de animais, para mitigar os efeitos da recuperação pós cirúrgica. Este grupo de animais foram eutanasiados para a remoção de tecidos e/ou registro de consumo de O₂. A cirurgia consistiu em uma incisão ventral de aproximadamente 1 cm realizada, seguida de uma incisão na linha alba do músculo reto abdominal, onde o sensor foi introduzido e fixado junto a parede interna do músculo. Como medida profilática, os animais receberam o antibiótico cefalexina (34 mg/kg, via oral) 12 horas antes, imediatamente após e 12 horas depois da cirurgia, e uma injeção do analgésico anti-inflamatório (Banamine ®, 50 mg/ml, Schering-

Plough) na dose de 1 mg/kg de peso corporal. Apenas um animal de cada caixa de camundongos GH foi implantado com o sensor de telemetria. Após o período de recuperação da cirurgia, esses animais voltaram para os seus respectivos grupos e os animais do grupo SH permaneceram sozinhos.

6. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL:

6.1 Experimento 1: O efeito do isolamento social sobre os ritmos diários de Tc e SLA à 25°C e 28°C:

O objetivo deste experimento foi avaliar o efeito do isolamento social nos ritmos diários de SLA e Tc durante o isolamento social para possível confirmação do padrão do registro e dados anteriormente gerados pelo grupo de pesquisa. Após uma semana da implantação dos probes de telemetria, as caixas contendo um animal implantado dos grupos Agrupados e Isolados foram posicionadas sob uma placa de receptora ER-4000 Energizer/Receiver, Mini-Mitter Company, Sun River, OR, USA) conectada em série a um computador pessoal contendo o software de aquisição de dados (VitalView ® Data Acquisition System, Software version 4.0), e a partir de então os registros foram iniciados. Os registros ocorreram por 28 dias mantidos em temperatura ambiente de 25°C e 28° C. Sendo 25°C mais próximo da temperatura dos laboratórios de experimentação em que normalmente ficam acondicionados. E 28°C sendo mais próxima da zona termoneutra desses pequenos animais (~30°C).

6.2 Experimento 2: O efeito do isolamento social sobre metabolismo energético à 25°C:

O objetivo deste experimento foi avaliar o efeito do isolamento social sobre parâmetros metabólicos. O consumo alimentar e peso corporal dos animais agrupados e isolados foi avaliado semanalmente. Sendo a função metabólica estimada pelo consumo contínuo de oxigênio (VO₂) e liberação de gás carbônico através da calorimetria de fluxo indireto (LE405 Gas Analyzer, Panlab Harvard Apparatus, Spain). Durante a última semana do protocolo de isolamento, os animais foram colocados individualmente na câmara de acrílico, onde permaneceram por 10 minutos para a aclimação. Após 28 dias do início do protocolo o consumo de VO₂ foi medido individualmente nos ZTs 1 a 3 e ZTs 11 a 14. O registro foi realizado a cada minuto usando o sistema computadorizado (Metabolism, Harvard Apparatus, Spain) e ocorreram em temperatura ambiente de 25± 1 °C. O expoente de 0,75ml de VO₂ para a escala alométrica da função metabólica foi utilizado (WEST et al, 1979). A razão entre o

volume de CO₂ e o de O₂ foi calculada para expressão a taxa respiratória dos animais nas diferentes condições experimentais.

6.3 Experimento 3: Efeito do isolamento social sobre a expressão dos genes da via termogênica e dos genes de relógio no BAT a 25°C e 28°C:

O objetivo deste experimento foi avaliar o efeito do isolamento social sobre expressão dos genes da via termogênica e dos genes de relógio no BAT no ZT1 e ZT10. No 28º dia de isolamento ou agrupamento, ocorreu a eutanásia nos Zts 1 e 10 e o BAT interescapular foi retirado para extração de RNA (RT-PCR), e PCR quantitativo (qPCR) dos seguintes genes de interesse: *Cpt1a*, *Pgc1a*, *UCP1*, *Rev-erb-α*, *Per1*, *Per2* e *Bmal1*, e para o gene normalizador *Rpl37*. Foi utilizado par de primers específicos para a espécie, que foram feitos com base nas sequências obtidas a partir do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>), desenhados e sintetizados pela empresa IDT (Coralville, IA, EUA) (Tabela 1). O BAT foi homogeneizado em TRIzol (Thermo Fisher Scientific, USA), e a extração total e purificação do RNA foi realizada de acordo com as instruções do fabricante. A concentração total de RNA foi determinada usando o espectrofotometro (Nanodrop, USA), e 1µg de amostra utilizado para transcrição reversa com a enzima Superscript III Reverse Transcriptase, prime Randon e outros reagentes de acordo com as instruções do fabricante, gerando o DNA complementar (cDNA) para que seja realizado o PCR quantitativo (qPCR).

O qPCR foi realizado em placas de 96 poços, utilizando iTaq™ universal SYBR® Green supermix (BioRad, E.U.A). Os ensaios foram realizados em um termociclador QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR (Thermo Fisher, USA) para selecionar o ciclo de temperatura, seguiu-se as instruções do fabricante do Supermix: 10 ciclos a 95 °C por 30 segundos seguido por 50 ciclos de 15 segundos a 95 °C e, 1 segundo a 60 °C. Com posterior análise da curva de Melt. As soluções para cada gene continham: os primers antisense e senso (300nM), o iTaq™ universal SYBR® Green supermix e água livre de nuclease (Nuclease-Free Water, Ambion, E.U.A).

A análise da amplificação foi realizada pelo número de ciclos equivalente à interseção da curva com o limiar, sendo denominado de ciclos de temperatura (CT) que foram utilizados para a análise do RNAm relativo. Os dados foram analisados pelo método $\Delta\Delta CT$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). O ΔCT foi encontrado pela diferença do valor médio das duplicatas do gene de interesse e do normalizador (*Rpl37*). A maior média de ΔCT apresentado pelos animais

agrupados (controle) foi utilizada como calibrador. O $\Delta\Delta CT$ foi obtido a partir da subtração de cada valor de ΔCT pela média escolhida do ΔCT . Este valor foi utilizado como uma exponencial negativa na base 2 ($2^{-\Delta\Delta CT}$).

Tabela 1: Sequências de primers usados na análise por RT- qPCR

Gene (número de acesso)	Primers
<i>Rpl37a</i> (NM_009084.4)	Forward: 5'-CGGCGACATGGCTAAACG-3' Reverse: 5'-ACGGCTCGTCTCTTCATCTTG-3'
<i>Bmal1</i> (NM_001243048)	Forward: 5'-AAGCTTCTGCACAATCCACAGCAC-3' Reverse: 5'-TGTCTGGCTCATTTGTCTTCGTCCA-3'
<i>Per1</i> (NM_0011065.3)	Forward: 5'-AGCAGGTTTCAGGCTAACCAGGAAT-3' Reverse: 5'-AGGTGTCCTGGTTTCGAAGTGTGT-3'
<i>Per2</i> (NM_011066.3)	Forward: 5'-ACCCTGAAAAGGAAGTGCGA-3' Reverse: 5'-GCCATATCTTCTACCGTCTCTAGC-3'
<i>Ucp1</i> (NM_009463.3)	Forward: 5'-CAGCTTGCTTGGCAGATATCA -3' Reverse: 5'-TTGGATCTGAAGGCGGACTT -3'
<i>Cpt1a</i> (NM_013495.2)	Forward: 5'- CTCCGCCTGAGCCATGAAG-3' Reverse: 5'- CACCAGTGATGATGCCATTCT-3'
<i>Pgc1α</i> (NM_008904.2)	Forward: 5'-CCAGAGTCACCAAATGACCCC-3' Reverse: 5'-GAGGACTTGCTGAGTTGTGC-3'
<i>Rev-erb-α</i> (NM_145,434.4)	Forward: 5'-AAGACATGACGACCCTGGAC-3' Reverse: 5'-CCATGCCATTTCAGCTTGTAAT-3'
<i>Hsl</i> (NM_001039507.2)	Forward: 5'-GGGAGGGCCTCAGCGTTCTCACA 3' Reverse: 5'-ATAGCACGGAGCTGGGTGAGG -3'

6.4 Experimento 4: Efeito do isolamento social sobre a ativação farmacológica do BAT à 25°C:

O objetivo deste experimento foi avaliar o efeito do isolamento social sobre a estimulação farmacológica do BAT. A termogênese do BAT foi estimulada através da ativação do receptor seletivo β_3 -adrenérgico (B3AR), utilizando o agonista CL-316,243 (1mg/kg, Sigma-Aldrich) em dosagem já padronizada para ativação da termogênese sem tremores do BAT (ZOU et al, 2017). Após 28 dias mantidos nas condições de isolamento ou agrupamento, os animais foram injetados entre os ZTs 2 e 3 e eutanasiados 2 horas depois da injeção do

agonista ou salina para coleta do BAT interescapular e análise da expressão gênica (conforme descrita no experimento 3). O experimento foi realizado em temperatura ambiente de 25° C.

7. ANÁLISE ESTATÍSTICAS:

A variação circadiana de SLA e Tc, assim como a ingesta alimentar e ganho de peso corporal foram analisadas pela ANOVA de duas vias seguida de pós-teste *Tukey*. Para as análises de *Cosinor* foram utilizados os registros de telemetria na resolução de 6-min dos 28 dias de registro dos animais mantidos no ciclo luz/escuridão de 12h:12h. Para as análises estatísticas dos parâmetros circadianos de mesor, amplitude e acrofase foi utilizado teste t-*Student* não-pareado. Os resultados de VO₂ e VCO₂ foram analisados por teste t.

A análise da expressão gênica nos diferentes delineamentos foi feita por ANOVA de duas vias seguida de *Sidak*, quando o fator tempo foi considerado uma variável dependente ou por teste t quando o tempo não foi considerado uma variável dependente.

As análises estatísticas e os gráficos foram realizados no programa Graph Pad Prism 9.0.

8. RESULTADOS:

Em relação aos experimentos realizados à 25 ± 1 °C, observamos que a média da Tc e SLA em cada ZT ao longo de 28 dias de registro seguiu um perfil circadiano dessas variáveis (figuras 6a e c). Entretanto, observamos que os animais isolados apresentaram uma diminuição do valor de nadir do ritmo de Tc na fase clara, tendo apresentado também menor mesor em comparação com os agrupados (figura 6b). A amplitude do ritmo de Tc aumentou e do ritmo de SLA diminuiu nos animais isolados, quando comparados com os agrupados (figuras 6a e d). As acrofases dos ritmos de Tc e SLA não diferiram entre camundongos isolados e agrupados (figuras 6b e d).

Conforme podemos observar na figura 6e, o isolamento social levou a um menor ganho de peso corporal ao longo das 4 semanas. O ganho de peso foi menor nos animais isolados, quando comparados com os agrupados a partir do início da segunda semana de protocolo. Observamos que esse menor ganho de peso nos animais isolados não foi relacionado com menor consumo alimentar, já que não houve diferença no consumo de ração entre os animais agrupados e isolados. O consumo alimentar foi relacionado a fase do ciclo, sendo maior em ambos os grupos durante a fase escura, em que os animais são mais ativos (Figura 6f).

O VO₂ consumido foi mensurado para caracterização adicional dos efeitos do isolamento social nos parâmetros metabólicos no início da fase clara e no início da fase escura, e com ele observamos que não houve diferença estatística no VO₂ consumido no início da fase clara (ZTs 1-3) entre os animais isolados e agrupados, porém, no início da fase escura (ZTs 11-14) houve um aumento do consumo de VO₂ nos animais isolados (figura 6g).

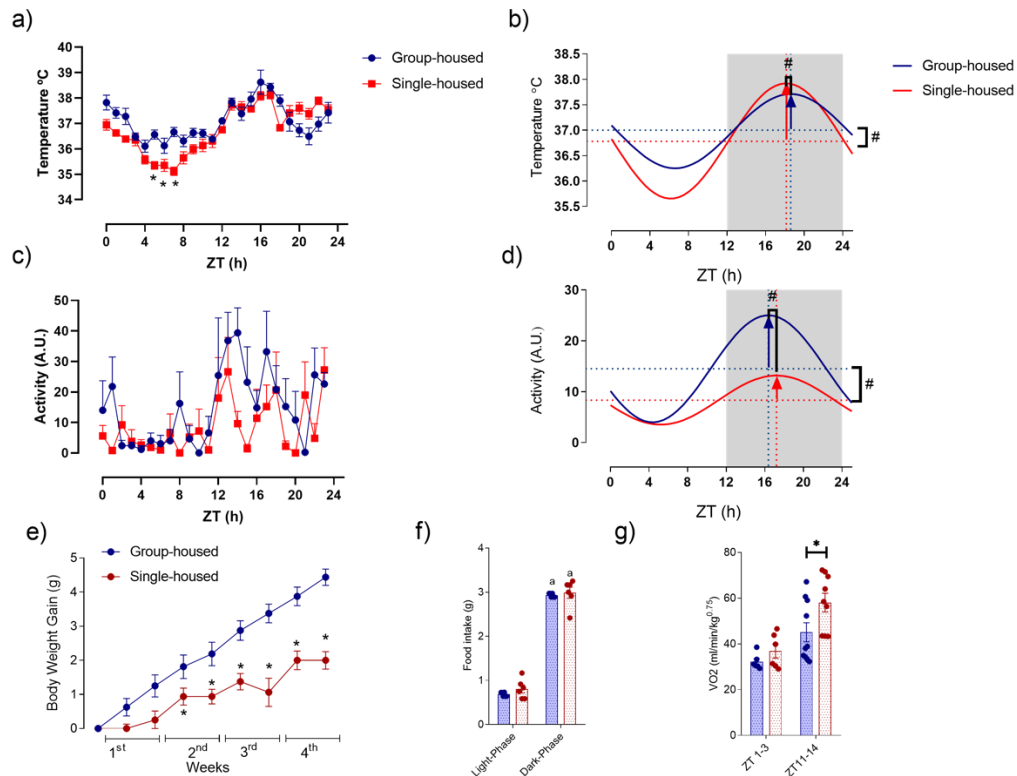


Figura 6: Dados de registros telemétricos de temperatura abdominal (a) e atividade locomotora espontânea (c) de camundongos agrupados ($n = 5$) ou isolados ($n = 5$) na temperatura de 25 ± 1 °C. Curva ajustada (Análise de Cosinor) da temperatura média (b) e atividade (d) registrada em camundongos agrupados ou isolados. Em b e d, linhas tracejadas paralelas aos eixos x e y, indicando respectivamente o mesor e a acrofase da oscilação; a seta desenhada em cada gráfico representa a amplitude da oscilação; a área cinza representa a fase escura. Ganho de peso corporal de camundongos agrupados ($n = 16$) e isolados ($n = 16$) medido ao longo de 28 dias (e). Média da ingestão alimentar ao longo das semanas em cada fase do ciclo circadiano (f). Consumo de oxigênio (VO₂) medido no tempo zeitgeber (ZT) 1–3 de camundongos agrupados ($n = 6$) e isolados ($n = 6$); e medido em ZT11-14 (ZT0 = 7:00 h) de camundongos agrupados ($n = 10$) e isolados ($n = 9$) (g). Os resultados são apresentados como média $\pm$ SEM. Asterisco significa a diferença estatística entre agrupados e isolados, e letra *a* significa a diferença entre fase clara e fase escura (ANOVA de duas vias seguida de Tukey). #, significa a diferença estatística entre agrupados e isolados (teste t).

A partir da avaliação do VO₂ observamos que os animais isolados apresentaram uma menor razão de troca respiratória, quando comparados aos animais agrupados (figura 7a) e maior gasto energético em comparação com os animais agrupados (figura 7b).

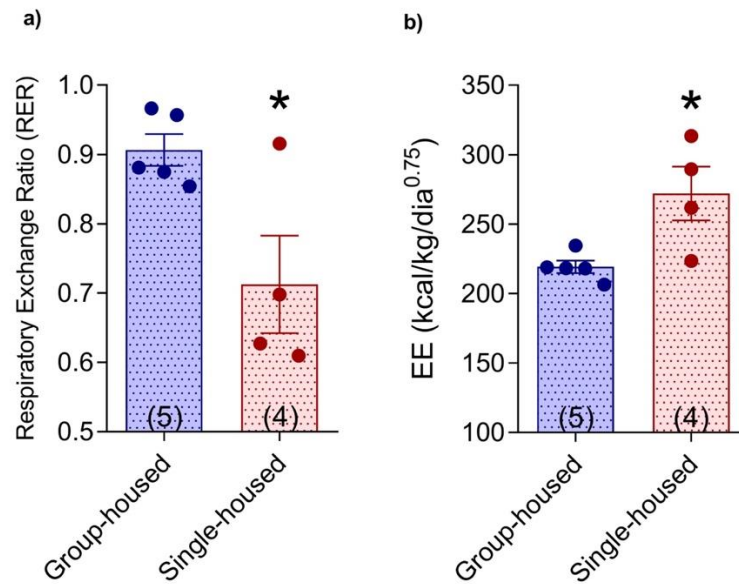


Figura 7: Dados da razão de troca respiratória e gasto energético medido no *zeitgeber time* (ZT) 1–3 de camundongos agrupados (n = 5) e isolados (n = 4); (ZT0 = 7:00 h)) na temperatura de 25 ± 1 °C. Os resultados são apresentados como média $\pm$ SEM. Asterisco significa a diferença estatística entre agrupados e isolados, (ANOVA de duas vias seguida de Tukey).

O desafio adrenérgico foi realizado a 25 ± 1 °C, mostrando que o agonista β 3AR CL-316,243 aumentou acentuadamente a expressão do gene *Ucp1* no BAT de camundongos agrupados em relação ao grupo controle injetado com salina, mas não houve aumento da expressão de *Ucp1* no BAT dos camundongos isolados (figura 8a). O tratamento com o CL-316,243 aumentou a expressão da lipase hormônio sensível (*Hsl*) nos animais agrupados, um alvo secundário da estimulação pelo β 3AR. Porém, a expressão de *Hsl* nos camundongos isolados não foi afetada, sendo a sua expressão menor, quando comparada com a expressão dos animais agrupados (figura 8b). Por outro lado, o estímulo com o agonista β 3AR CL-316,243 aumentou a expressão de *Rev-erba* e *Pgc1a* no BAT de camundongos isolados, mas não aumentou a expressão nos animais agrupados (figura 8c). Os níveis de ambos os transcritos (*Rev-erba* e *Pgc1a*) foram mais elevados nos animais isolados do que nos animais agrupados, após a estimulação adrenérgica (figura 8c e d). Não houve efeito significativo do tratamento com o CL-316,243 na expressão do gene *Cpt1a* nos camundongos agrupados e isolados (figura 8e).

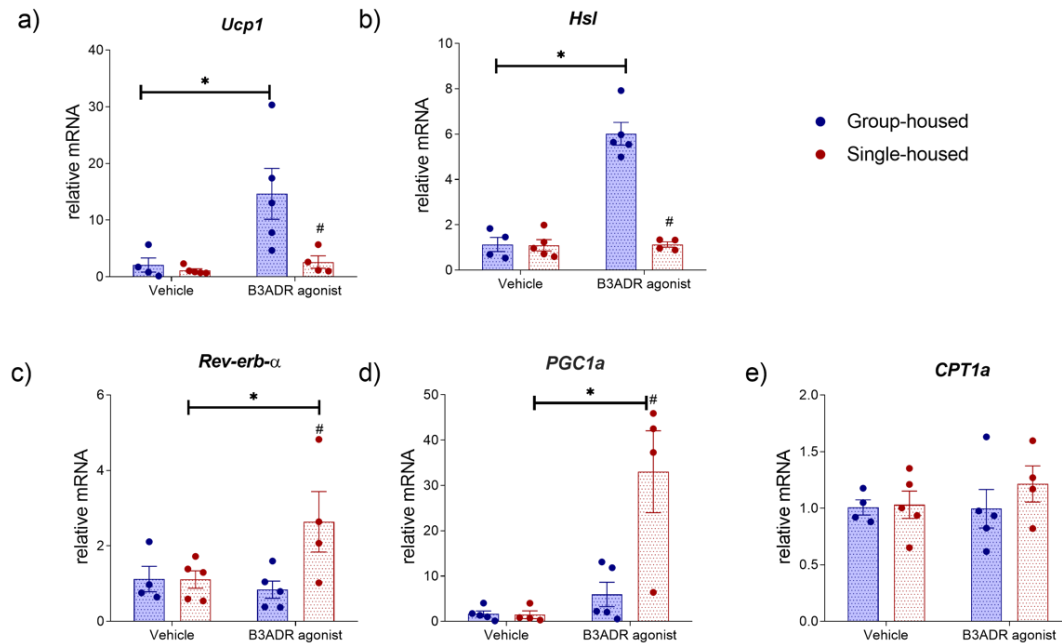


Figura 8: Transcrições de *Ucp1* (a), *Hsl* (b), *Rev-erb-α* (c), *Pgc1α* (d) e *Cpt1a* (e) no BAT de camundongos agrupados e isolados mantidos em 25 ± 1 °C. Os resultados são apresentados como média $\pm$ SEM em relação à média de expressão mínima encontrada no veículo tratado de cada condição de alojamento. Os valores de expressão do transcrito gênico foram normalizados por *Rpl37a*. Asterisco significa veículo versus agonista B3ADR, e # significa alojado em grupo versus alojado individualmente analisado por ANOVA de duas vias seguido de Tukey.

Em relação aos experimentos realizados à 28 ± 1 °C, observamos que a média de Tc e SLA em cada ZT ao longo de 28 dias não apresentou diferença entre os grupos (figuras 9a e c). Entretanto, observamos que os animais isolados apresentaram uma diminuição do mesor do ritmo de Tc, o que pode ser explicado pela tendência apresentada pelos animais isolados em apresentar valores de Tc mais baixos do que os agrupados (figura 9b). Além de Tc e SLA continuarem apresentando variações rítmicas, observamos que não houve diferença estatística em relação a amplitude do ritmo. As acrofases dos ritmos de Tc e SLA não diferiram entre camundongos isolados e agrupados (figuras 9b e d). Conforme observamos na figura 9e, o isolamento social à 28 ± 1 , não foi capaz de alterar significativamente o ganho de peso ao longo das semanas, chegando ao fim dos 28 dias com peso semelhante aos animais agrupados. Observamos também que não houve diferença no consumo alimentar entre os grupos de animais isolados e agrupados, sendo o consumo alimentar relacionado a fase do ciclo circadiano de claro e escuro, sendo maior em ambos os grupos durante a fase escura, em que os animais são mais ativos (Figura 9f).

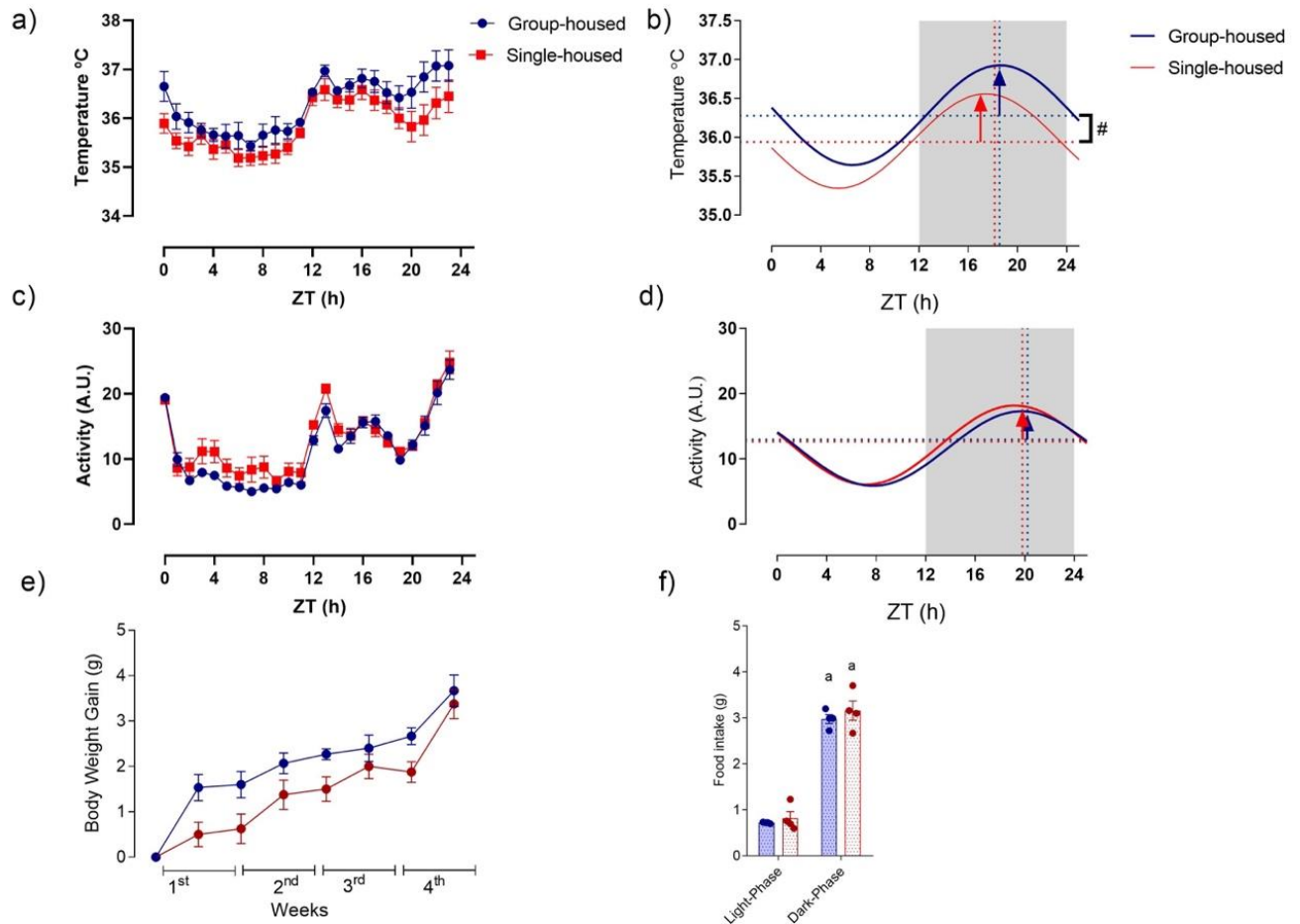


Figura 9: Dados de registros telemétricos de temperatura abdominal (a) e atividade locomotora espontânea (c) de camundongos agrupados ($n = 5$) ou isolados ($n = 5$) alojados em uma temperatura de $28^{\circ}\pm 1$. Curva ajustada (Análise de Cosinor) da temperatura média (b) e atividade (d) registrada em camundongos agrupados ou isolados. Em b e d, linhas tracejadas paralelas aos eixos x e y, indicando respectivamente o mesor e a acrofase da oscilação; a seta desenhada em cada gráfico representa a amplitude da oscilação; a área cinza representa a fase escura. Ganho de peso corporal de camundongos agrupados ($n = 16$) e isolados ($n = 16$) medido ao longo de 28 dias em uma temperatura $28^{\circ}\pm 1$ (e). Média da ingestão alimentar ao longo das semanas em cada fase do ciclo circadiano (f) em animais alojados em uma temperatura $28^{\circ}\pm 1$. Os resultados são apresentados como média $\pm$ SEM. Asterisco significa a diferença estatística entre agrupados e isolados, e a letra a significa a diferença entre fase clara e fase escura (ANOVA de duas vias seguida de Tukey). #, significa a diferença estatística entre agrupados e isolados (teste t).

Analizamos a expressão gênica do mRNA da *Ucp1*, *Pgcl α* e *Cpt1 α* no BAT de camundongos isolados e agrupados a uma temperatura de $28 \pm 1^{\circ}\text{C}$ no início e no final da fase clara, Zt1 e Zt10, respectivamente. A expressão do mRNA de *Pgcl α* e *Ucp1* foi menor nos animais isolados no início da fase clara (figura 10a), ou seja, início da fase de inatividade desses animais. Conforme já descrito, o *Pgcl α* é ativado pela PKA, na cascata de ativação da

termogênese no BAT, após a ligação da NE nos receptores e elevação do AMPc (GHESMATI, et al. 2024). O *Pgc1 α* um fator de estímulo para a transcrição de *Ucp1* (GERHART-HINES et al., 2013). Conforme podemos observar, o mRNA de *Pgc1 α* e *Ucp1* se normalizam no fim da fase clara (Zt 10), não apresentando diferença estatística entre os animais agrupados e isolados (figura 10e). Já em relação ao *Cpt1 α* , apesar da tendência em redução deste transcrito (t-test: $p=0,08$) não foram observadas diferenças estatísticas entre agrupados e isolados.

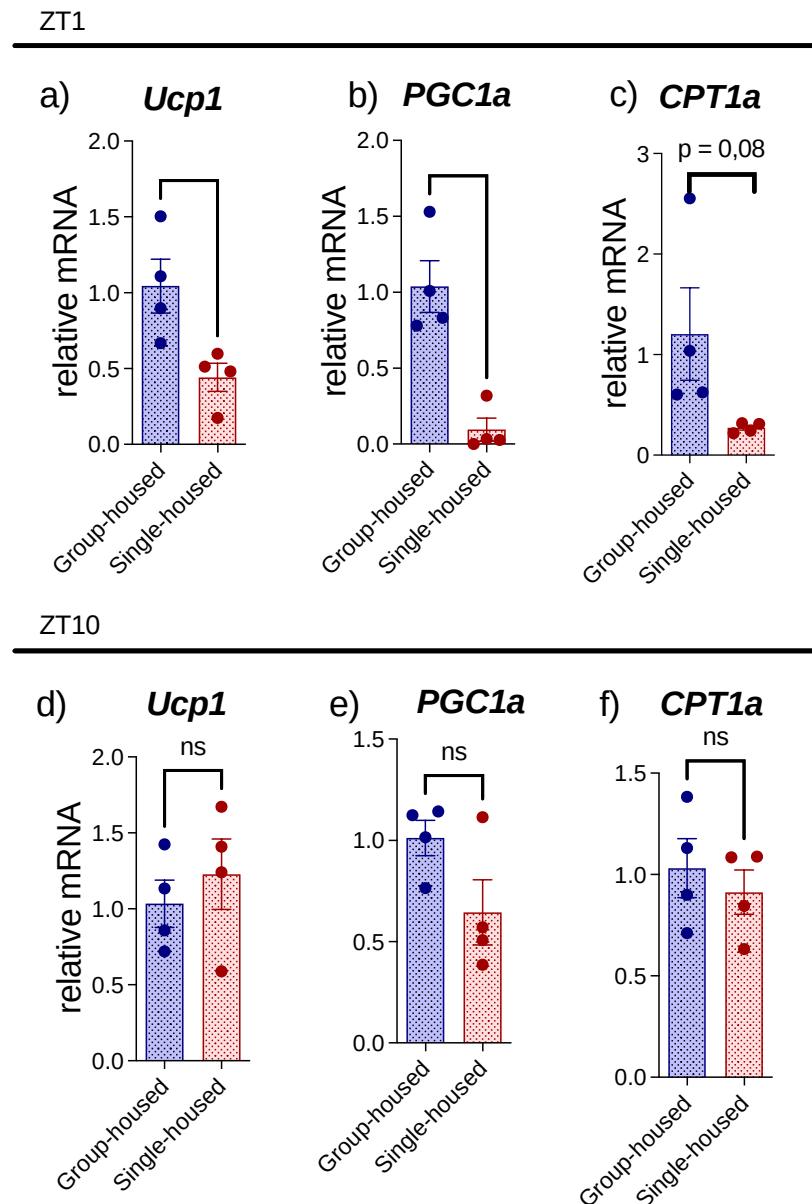


Figura 10: Transcrições de *UCP1* (a,d), *PGC1 α* (b,e), *CPT1 α* (c,f) no tecido adiposo marrom obtidos no zeitgeber time (ZT1) e no ZT10 de camundongos alojados em uma temperatura de $28^{\circ}\pm 1$. Dados são expressos como média $\pm$ SEM. Os valores de expressão do transcrito gênico foram normalizados por

Rpl37 e pela condição Group-housed em cada ZT. *Comparações foram realizadas através do teste t não pareado. NS indica que não foram encontradas diferenças estatísticas.

Quando analisados os genes do relógio circadiano no BAT de animais agrupados e isolados no início e final da fase clara, observamos uma menor expressão de mRNA de *Per2* no Zt1 nos animais isolados (figura 10b). Não havendo diferença persistente quando avaliamos no fim da fase clara. Sabe-se que a proteína PER2 ativa transcricionalmente a expressão de *Ucp1* e que há uma reduzida expressão de UCP1 de camundongos com deficiência de *Per2* após exposição ao frio (SCHIBLER, 2024). Previamente, nosso grupo reforçou estes dados da literatura (Fernandes et al, 2023), mostrando que durante o isolamento o ritmo circadiano da expressão é perdido, refletindo na perda do aumento de *Per2* no final da fase clara.

Os genes *Bmal1* e *Per1* não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos e fases do ciclo (Fig.11a, c, d e f).

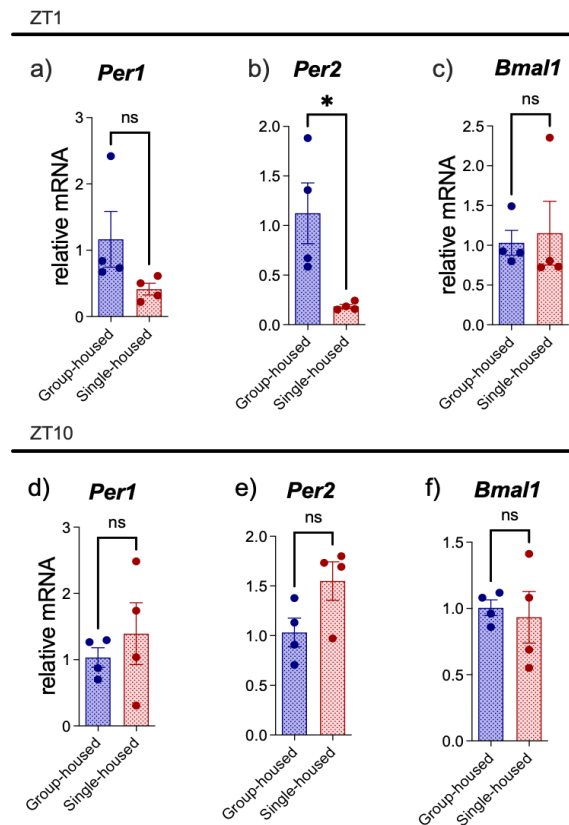


Figura 11: Transcrição de genes de relógio da alça principal do relógio molecular no tecido adiposo marrom (BAT) obtidos no *zeitgeber time* ZT 1 e ZT10 de camundongos alojados em uma temperatura de $28^{\circ}\pm 1$. Dados são expressos como média $\pm$ SEM. Os valores de expressão do transcrito gênico foram normalizados por Rpl37a e pela condição Group-housed. Comparações foram realizadas através do teste t não pareado. NS indica que não foram encontradas diferenças estatísticas.

Quando avaliamos a expressão de mRNA de *Rev-erba* no Zt1 e Zt10, não encontramos diferenças estatísticas entre os grupos, apenas uma tendência de elevação no Zt1 de animais isolados (figura 12a). E conforme demonstrado por Gerhart-Hines e colaboradores (2013), o gene *Rev-erba* inibe diretamente a transcrição de *Ucp1*, o que poderia explicar uma menor expressão de *Ucp1* nesse mesmo Zt no grupo isolado, pois de acordo com os achados desses autores, camundongos *knockout* para esse gene respondem ao frio com aumento na expressão de *Pgc1 α* , sugerindo uma regulação paralela dessa transcrição sob um BAT ativado, porém, os nossos dados não confirmam esse achado da literatura.

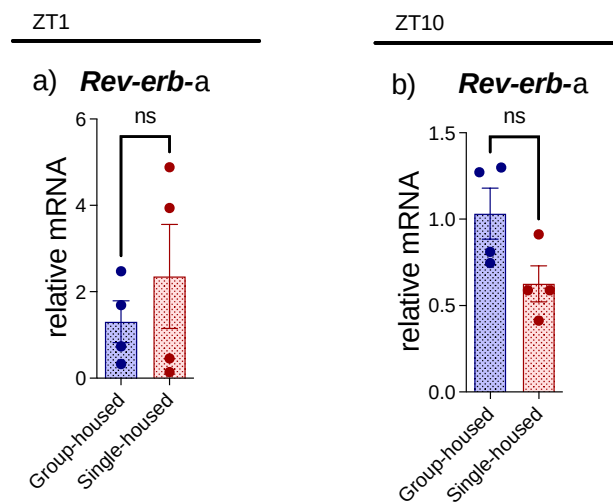


Figura 12: Transcrição do gene *Rev-erba* pertencente à alça acessória do relógio molecular no tecido adiposo marrom (BAT) obtidos no zeitgeber time ZT1 e ZT10 de camundongos alojados em uma temperatura de $28^{\circ}\pm 1$. Dados são expressos como média $\pm$ SEM. Os valores de expressão do transcrito gênico foram normalizados por *Rpl37a* e pela condição Group-housed. Comparações foram realizadas através do t-test não pareado. NS indica que não foram encontradas diferenças estatísticas.

9. DISCUSSÃO

O principal achado do nosso estudo foi que a falta de interação social, um componente essencial da termorregulação, leva a uma redução do ponto mais baixo (nadir) e a um pico circadiano regular no ritmo de Tc de camundongos à 25°C enquanto em condições sub-neutras de ambiente ($\sim 28^{\circ}\text{C}$) os valores de nadir e pico circadiano não diferiram entre camundongos agrupados e isolados. A falta do componente comportamental da termorregulação pode ter ativado alterações moleculares no BAT para garantir o ritmo de Tc em condições de temperatura ambiente mais distante da termoneutralidade. De fato, o estudo mostrou que em resposta a estimulação adrenérgica, animais isolados não elevam a expressão de *Ucp1* e *Hsl* e

sim um aumento de *Rev-erba* e *Pgc1α* no BAT. Além disso, em condições sub-neutras, animais isolados apresentam uma menor expressão do mRNA de *Pgc1α*, *Ucp1* e *Per2* restrita ao início da fase clara. Estes resultados apontam para uma alteração no programa transcricional do BAT induzida pelo isolamento social que depende da temperatura ambiente e do horário do dia.

Em relação ao horário do dia, mostramos anteriormente que a expressão de *Ucp1* no BAT está aumentada no ZT14 nos animais isolados comparada aos agrupados (FERNANDES et.al., 2023). Este resultado somado ao maior aumento no consumo de VO₂ no intervalo entre o ZT11-14 (dados do presente trabalho) nos permite inferir que a capacidade termogênica do BAT pode estar aumentada na condição de isolamento social. Esse dado vai de encontro ao já exposto na literatura, pois conforme Gordon (2012), camundongos isolados apresentam uma maior termogênese do BAT e uma maior concentração de *UCP1*, em comparação com animais agrupados.

O isolamento social também levou à redução do ganho de peso corporal, quando realizado à uma temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, sem alterações na ingestão de alimentos, sugerindo que o isolamento social aumenta o gasto de energia, como uma forma de garantir o aumento circadiano de T_c durante a fase escura. Em contrapartida, próxima à termoneutralidade ($28 \pm 2^\circ\text{C}$) não foram observadas diferenças na T_c ou no ganho de peso corporal entre os animais isolados e agrupados.

E conforme exposto por Gordon (2012) o comportamento de aglomeração tem como objetivo principal ser a resposta de um grupo de animais para limitar fisicamente a perda de calor no frio, tendo o impulso para amontoar-se em camundongos um impacto na dinâmica da regulação da temperatura quando alojados em grupos, e essa aglomeração em camundongos reduz a taxa metabólica basal e o consumo de alimentos em ambientes frios, o que poderia justificar nossos achados de menor peso nos animais isolados fora da termoneutralidade. Além disso, mostramos que camundongos isolados exibiram um aumento do consumo de VO₂ durante a transição para o início da fase escura do ciclo.

Achados anteriores do nosso grupo mostraram que alterações temporais induzidas pelo isolamento social na expressão de *Rev-erba* no BAT podem ser responsáveis pela ativação da termogênese. Embora as nossas descobertas não tenham estabelecido uma relação causal entre

Rev-erba, *Ucp1* e *Tc*, elas indicaram uma reprogramação temporal da transcrição gênica no BAT de animais isolados (FERNANDES, et al. 2023).

O gasto de energia é resultado das alterações em quaisquer uma destas variáveis: TMB, atividade locomotora ou ingestão de alimentos (ABREU-VIEIRA et al. 2015). No presente trabalho, a ingestão de alimentos foi semelhante entre camundongos agrupados e isolados tanto próxima quanto fora da zona termo-neutra. Já animais isolados mostraram redução da atividade locomotora na fase escura. Por outro lado, mostraram um aumento do metabolismo basal no início da fase escura fora em condições fora da termoneutralidade. Este aumento de consumo de VO₂ dependente da hora do dia pode explicar a redução do ganho de peso corporal observada em animais isolados.

A razão de troca respiratória (Respiratory Exchange Rate, RER) é definida como o volume de dióxido de carbono liberado sobre o volume de oxigênio absorvido durante a respiração. É um número adimensional utilizado para o cálculo da taxa metabólica basal:

$$RER = Vol\ CO_2\ liberado / Vol\ O_2\ absorvido$$

Em condições basais, o RER normalmente reflete o quociente respiratório (PÉRONNET e MASSICOTTE, 1991) ou seja, a estequiometria de CO₂ produzido em relação ao O₂ consumido pela oxidação metabólica da glicose em comparação com os ácidos graxos. Assim, analisando a oxidação dos diferentes substratos energéticos temos que, para os carboidratos oxidados através da respiração aeróbica há uma proporção igual de liberação de gás carbônico (CO₂) e consumo de oxigênio (O₂). Isso implica que cem por cento dos carboidratos é consumido para produzir ATP, tendo um RER igual a 1,0. Na matriz mitocondrial, os acil-Coas vindo da degradação dos ácido- graxos passam pelo processo de beta-oxidação resultando na formação de acetil-CoA que será o substrato respiratório. Este processo não gera dióxido de carbono, por isso, o resultado é a redução da produção de CO₂ para cada molécula de oxigênio consumida, tendo como resultado um RER de 0,7. Já quando a proteína é o substrato respiratório, também há uma redução da produção de CO₂ e o RER é igual a 0,9 (PATEL, et al. 2023).

O isolamento social provocou uma diminuição da RER, e um maior gasto energético, quando comparado com os animais agrupados. Mostrando que os animais que enfrentaram o desafio do isolamento fora da sua zona termoneutra tiveram um RER entre 0,7 e 0,8, tendo

como predominância de lipídios como principal substrato energético, o que pode estar diretamente relacionado com um menor ganho de peso ao longo das semanas. Diferente dos animais agrupados, que apresentaram RER próximo de 1,0, o que indica a predominância do carboidrato como substrato energético. Como já visto por Ravussin (2012), há um maior gasto de energia em camundongos isolados fora da sua termoneutralidade, devido às demandas energéticas aumentadas, mostrando que a temperatura ambiente deve ser cuidadosamente considerada ao quantificar o metabolismo energético em roedores.

Em camundongos a relação do gasto energético total com a temperatura ambiente tem uma forma de "U", com um menor gasto energético total ocorrendo entre 30°C e 40°C, ou seja, dentro da sua zona de termoneutralidade, embora essa relação possa ser alterada por diversos fatores, como o peso corporal (TAM et al, 2012). E conforme exposto por Gordon (1998), camundongos isolados, aclimatados a 22°C, quando colocados em gradientes de temperatura, preferem valores de temperatura ambiente mais quentes, de aproximadamente 30°C, sendo a temperatura de preferência, similar à sua zona de termoneutralidade.

Os receptores β_3 adrenérgicos são encontrados em alta densidade em tecidos adiposos, sendo o tecido adiposo branco inerte em relação ao consumo de oxigênio, e a resposta à sua estimulação emana principalmente do BAT (CANNON e NEDERGAARD, 2011). Portanto, a ativação desses receptores leva a indução da termogênese do BAT.

Sabe-se que o silenciamento dos receptores β_3 compromete genes essenciais para a termogênese, metabolismo de ácidos graxos e massa mitocondrial (CERO, et al. 2021). Dessa forma, avaliamos a resposta dos genes envolvidos com a estimulação adrenérgica em animais isolados e agrupados fora da zona termoneutra.

Não houve aumento do mRNA da *Hsl* e *Ucp1* no BAT dos animais isolados após o tratamento com agonista B3ADR, confirmando uma ausência de resposta do tecido ao estímulo do agonista, uma vez que *Hsl* é um alvo da estimulação adrenérgica. A *Hsl* é uma enzima chave envolvida na liberação de ácidos graxos livres por meio da quebra de triglicerídeos. A ativação de B3ADR no BAT aumenta a produção de AMPc, que ativa *PKA* desencadeando a fosforilação de *Hsl*. Conforme demonstrado por Fedorenko e colaboradores (2012), o aumento do ácido graxo livre celular ativa diretamente a *Ucp1*, o que explica o aumento concomitante de *Ucp1* e *Hsl* em camundongos agrupados após a estimulação com o agonista.

Porém, há de se observar que, conforme exposto por Cannon e colaboradores, a resposta do BAT pode não representar a verdadeira capacidade do tecido, pois além dos receptores β_3 , outros receptores adrenérgicos podem ser necessários para provocar a resposta adrenérgica total, tais como o β_1 e o α -adrenérgico. Por isso, há de se salientar que com o tratamento realizado pudemos avaliar a resposta via receptor β_3 e não a contribuição total da NE agindo em outros receptores. Além disso, pode ter havido uma dessensibilização dos receptores adrenérgicos para a condição de isolamento. É sabido que a exposição prolongada ao frio ou repetidas doses de agonista adrenérgico leva à dessensibilização da sinalização adrenérgica (HERTEL et al, 1984). Embora o tratamento utilizado foi de dose única, durante o protocolo de isolamento, o nadir do ritmo de Tc foi mais baixo, mantendo o animal mais resfriado, pelo menos durante a fase clara. Isso pode ter deflagrado mecanismos de compensação térmica semelhante à adaptação a exposição prolongada ao frio ambiental.

Achados de Nam (2016) mostraram que *Rev-erba* promove adipogênese e desenvolvimento do BAT, além de modular sua capacidade de resposta a estímulos externos. Como ambos contribuem para a capacidade termogênica total, essas camadas de ação do *Rev-erba* podem refletir a complexidade dos papéis regulatórios de longo prazo em relação aos agudos de um mecanismo de controle temporal nesse órgão. Conforme demonstrado por Fernandes e colaboradores (2023), o isolamento social avançou o pico de expressão de *Rev-erba*, que ocorreu mais cedo, na fase de luz, resultando na redução de sua expressão no ZT14 no BAT, sendo acompanhado de um aumento da expressão de *Ucp1*. Em contrapartida, não houve alteração de mesor e amplitude de oscilação diária de *Rev-erba* no BAT, reforçando uma reprogramação temporal do BAT induzida pelo isolamento social.

Então levantamos a hipótese de que a adaptação temporal do BAT de camundongos isolados pode envolver mudanças no relógio circadiano desse tecido. Avaliamos genes do *loop* de *feedback* negativo que regula o relógio circadiano, *Per1/Per2*, e do *loop* de *feedback* positivo, *Bmal1* (BUHR e TAKAHASHI, 2013). O gene *Per2*, que inibe a atividade transcricional do heterodímero *CLOCK/BMAL1*, pode ativar transcricionalmente a expressão de UCP1, promovendo termogênese (D. NAM et al. 2016) sob a estimulação do agonista B3ADR. De fato, observamos uma redução da expressão de *Per2* no ZT1. Não foram avaliadas, contudo, as concentrações de mRNA de *Per2* no BAT após a estimulação adrenérgica.

Por outro lado, a descoberta notável de um aumento de *Rev-erba* após o tratamento com o agonista B3ADR pode explicar o fato de não ter havido alteração na *UCP1* nos animais isolados. Pois, conforme descrito anteriormente por Gerhart-Hines (2013), o *Rev-erba* é um regulador negativo da expressão de *UCP1*.

Ainda em resposta à estimulação adrenérgica, camundongos agrupados não apresentaram alterações em *Cpt1a* e *Pgc1a*. No entanto, camundongos isolados aumentaram a expressão de *Pgc1a*, indicando que este fator de transcrição pode ser um alvo das adaptações do BAT induzidas por isolamento social à estimulação adrenérgica. Curiosamente, camundongos *knockout* para *Rev-erba* respondem ao frio com aumento na expressão de *Pgc1a*, sugerindo uma regulação paralela dessas transcrições sob um BAT ativado (GERHART-HINES, et al. 2013). Embora não demonstrado em adipócitos marrons, é tentador especular que o aumento de *Pgc1a* encontrado em camundongos isolados pode ter sido responsável pelo aumento de *Rev-erba* após a injeção com B3ADR.

Considerando que a temperatura ambiente da maioria das instalações de animais é em torno de 20-22 °C, o que está dentro da zona de conforto térmico de humanos vestidos; no entanto, abaixo da zona termoneutra de camundongos, o protocolo de isolamento realizado a 25 ± 1 °C está mais alto do que a maioria das instalações de animais, mas ainda mais baixo do que a zona termoneutra de camundongos. Assim, consideramos que em torno de 25 ± 1 °C, o desafio térmico tenha sido significativo para animais isolados, o que pode explicar as diferenças encontradas entre agrupados e isolados neste protocolo. De fato, o isolamento social quando realizado à 28 ± 2 °C não levou a alterações no ritmo de Tc e SLA, ganho de peso corporal ao longo das semanas e consumo alimentar, reforçando a ideia de os fenótipos observados em 25 ± 1 °C dever-se ao maior desafio térmico encontrado nesta faixa de temperatura pelos animais isolados. De fato, alojamento a 20-24°C induz um estresse crônico pelo frio que pode influenciar os resultados metabólicos em experimentos (APPANA, et al. 2023).

Os mamíferos são animais endotérmicos, ou seja, são capazes de manter a temperatura corporal central constante através da produção de calor pelo metabolismo interno. No entanto, essa capacidade de termorregulação ativa, apresenta uma grande desvantagem, visto que o seu custo energético significativo requer um maior consumo de oxigênio (U-DIN, et al. 2023), tal afirmação pode explicar o fato de não termos encontrado alterações quanto ao ganho de peso

corporal quando comparamos os animais isolados e agrupados na temperatura condizente com a sua zona termoneutra (28 ± 2 °C).

Para melhor avaliar o impacto da termoneutralidade na adaptação metabólica do BAT de animais isolados, avaliamos, a expressão do seu mRNA da *Ucp1*, *Pgc1 α* , *Cpt1 α* no início e fim da fase clara (ZTs 1 e 10 respectivamente), uma vez que eles participam da biogênese mitocondrial e a termogênese adaptativa no BAT (GOFFART e WIESNER, 2003).

O *Pgc1 α* é um coativador transcricional que regula além da biogênese mitocondrial, vários processos metabólicos, tais como a homeostase energética e termogênese (NOMURA, et al. 2024). Nos nossos achados, a expressão de mRNA do *Pgc1 α* e *Ucp1* está diminuída no BAT de camundongos isolados em termoneutralidade na fase clara do ciclo. Reforçando os achados da literatura de que o *Pgc1 α* atua aumentando o estímulo de transcrição da UCP1, visto que há uma relação correspondente na expressão reduzida do transcrito. No fim da fase clara (Zt10), porém, não há diferença entre os grupos, indicando a importância da regulação temporal para os mecanismos de compensação dos animais isolados na ativação de *Pgc1 α* e expressão de *Ucp1* no BAT.

Salientamos que na zona termoneutra os animais isolados não são expostos ao desafio do frio, o que pode estar regulando, negativamente, a expressão do *Pgc1 α* , pois o aumento da sua expressão seria fundamental para uma elevação adaptativa do gasto energético e da produção de calor, regulando o metabolismo de todo o corpo. Especulamos então, se a expressão de *Pgc1 α* e, conseqüentemente da regulação negativa da termogênese, estaria relacionada sob influência circadiana, uma vez que ocorrem dependente do horário do dia. Além disso, conforme mencionado anteriormente, camundongos *knockout* para o gene *Rev-erba* respondem ao frio com aumento na expressão de *Pgc1 α* .

Sabemos que a base das oscilações circadianas envolve dois *loops* de feedback interconectados, e o gene *Per2* constitui uma das porções negativas, inibindo a transcrição de *CLOCK-BMAL*. O gene *Per2* interage com o receptor nuclear *Rev-erba* para sincronizar o *loop* de *feedback* positivo e negativo (BUTTGEREIT, et al. 2015). Porém, *Per2* desempenha um papel mais proeminente no relógio circadiano do que *Per1*, pois, conforme Kim e colaboradores (2018), camundongos mutantes para o gene *Per2* mostraram um período circadiano mais curto do que camundongos selvagens, e reduzem a expressão de *Per1* no NSQ, indicando que *Per2* regula *Per1*. Nossos dados mostram uma diminuição da expressão de mRNA de *Per2* no BAT

dos animais isolados no ZT1, coincidindo com uma menor expressão de *UCP1*, confirmando os dados da literatura, visto que *Per 2* ativa transcricionalmente a expressão de *UCP1*, quando há exposição ao frio, o que poderia estar relacionado com o aumento da tolerância ao frio (NAM, et al. 2015).

Além dos efeitos fisiológicos e metabólicos, o isolamento social pode ter um impacto significativo no bem-estar emocional e psicológico dos animais. Estudos demonstram que o isolamento social pode induzir comportamentos relacionados ao estresse, como aumento da ansiedade e da depressão, ou que pode interferir em diversos processos biológicos, incluindo a regulação da temperatura corporal. Em camundongos, o isolamento social tem sido associado a uma maior expressão de marcadores de estresse, como o aumento do cortisol, o que pode alterar não apenas a resposta ao estresse térmico, mas também outros sistemas biológicos, como o sistema imunológico (Cacioppo et al., 2015). Além disso, o isolamento pode levar a hipoatividade, possivelmente associado a uma redução no prazer de explorar o ambiente, o que pode alterar o gasto energético e o metabolismo (Kikusui et al., 2006). Esse contexto emocional pode, portanto, ser um fator mediador adicional para os resultados observados na termorregulação, principalmente em modelos experimentais em que os animais são submetidos a desafios sociais e térmicos simultâneos. Estudos mais aprofundados sobre a interação entre estresse emocional e termorregulação seriam necessários para compreender melhor as interações complexas entre os aspectos comportamentais e a termorregulação.

CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que o isolamento social pode modificar significativamente a termorregulação e o metabolismo energético em camundongos, especialmente quando os animais são expostos a temperaturas fora da zona termoneutra. A reprogramação do BAT, com alterações na expressão de genes termogênicos e a mudança no substrato energético utilizado, sugere que o isolamento social impõe um desafio térmico adicional aos animais, exigindo adaptações fisiológicas. Embora o isolamento social não tenha afetado diretamente o consumo alimentar, os camundongos isolados apresentaram um aumento no gasto energético e uma redução no ganho de peso corporal, possivelmente devido ao maior uso de lipídios como fonte de energia. Além disso, o impacto emocional do isolamento social, como o aumento do estresse, pode ter um papel mediador nas respostas observadas. Esses achados ressaltam a importância

de considerar tanto os aspectos fisiológicos quanto os emocionais no estudo da termorregulação e metabolismo em modelos animais.

10. REFERÊNCIAS

ABREU-VIEIRA G., Xiao C., Gavrilova O., Reitman M. L. Integration of body temperature into the analysis of energy expenditure in the mouse. **Molecular Metabolism**. 2015 Mar 10;4(6):461-70. doi: 10.1016/j.molmet.2015.03.001. PMID: 26042200; PMCID: PMC4443293.

APPANA B., Queen N. J., Cao L. Protocol to minimize the confounding effect of cold stress on socially isolated mice using thermoneutral housing. **STAR Protocols**. 2023 Sep 15;4(3):102533. doi: 10.1016/j.xpro.2023.102533. Epub 2023 Sep 2. PMID: 37660300; PMCID: PMC10491848.

ASCHOFF J, Pohl H. Phase relations between a circadian rhythm and its zeitgeber within the range of entrainment. **Naturwissenschaften**. 1978 Feb;65(2):80-4. doi: 10.1007/BF00440545. PMID: 345129.

BATCHELDER P., R. O. Kinney, L. Demlow, and C. B. Lynch. Effects of temperature and social interactions on huddling behavior in *Mus musculus*. **Physiology & Behavior**, vol 31, nº1, 1983. doi: 10.1016/0031-9384(83)90102-6.

BALSALOBRE A., Brown, S. A., Marcacci, L., Tronche, F., Kellendonk, C., Reichardt, H. M., Schutz, G., & Schibler, U. (2000). Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. **Science**. <https://doi.org/10.1126/science.289.5488.2344>

BASS, J., Takahashi, J.S., 2010. Circadian Integration of Metabolism and Energetics. **Science** 330, 1349–1354. <https://doi.org/10.1126/science.1195027>

BARTH, J.; Schneider, S.; Von känel, R. Lack of Social Support in the Etiology and the Prognosis of Coronary Heart Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Psychosomatic Medicine**, v. 72, n. 3, p.229- 238, 2010.

BASSUK, S. S.; Glass, T. A.; Berkman, L. F. Social Disengagement and Incident Cognitive Decline in Community-Dwelling Elderly Persons. **Annals Of Internal Medicine**, v. 131, n. 3, p.165-173, 1999.

BUHR E. D., Takahashi J. S. Molecular components of the Mammalian circadian clock. **Handbook Experimental Pharmacology**. 2013;(217):3-27. doi: 10.1007/978-3-642-25950-0_1. PMID: 23604473; PMCID: PMC3762864.

BRYCHTA R. J. and K. Y. Chen. Cold-induced thermogenesis in humans. **European Journal of Clinical Nutrition**, vol. 71, nº 3. 2017. doi: 10.1038/ejcn.2016.223.

BUIJS, R. M., & Kalsbeek, A. (2001). Hypothalamic integration of central and peripheral clocks. **Nature Reviews Neuroscience**. <https://doi.org/10.1038/35081582>

BUTTGEREIT F., Smolen J. S., Coogan A. N., Cajochen C. Clocking in: chronobiology in rheumatoid arthritis. **Nature Reviews Rheumatology**. 2015 Jun;11(6):349-56. doi: 10.1038/nrrheum.2015.31. Epub 2015 Mar 24. PMID: 25800214.

CACIOPPO, JT, Hawkey, LC, & Thisted, RA (2015). O isolamento social percebido me deixa triste: análises de 5 anos de defasagem cruzada de solidão e depressão no Chicago Health, Aging, and Social Relations Study. **Psicologia e Envelhecimento**, 30 (2), 4.

CAMBRAS T. et al. Circadian desynchronization of core body temperature and sleep stages in the rat. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, 2017, n. 18, p. 7634–7639.

CAMBRAS, T.; CASTEJÓN, L.; DÍEZ-NOGUERA, A. Social interaction and sex differences influence rat temperature circadian rhythm under LD cycles and constant light. **Physiology & Behavior**, v. 103, 2011, n. 3–4, p. 365–371.

CAMBRAS, T.; CASTEJÓN, L.; DÍEZ-NOGUERA, A. Social interaction with a rhythmic rat enhances the circadian pattern of the motor activity and temperature of LL-induced arrhythmic rats. **Physiology & Behavior**, v. 105, 2012, n. 3, p. 835–840.

CANNON B., Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. **Physiology Rev.** 2004 Jan;84(1):277-359. doi: 10.1152/physrev.00015.2003. PMID: 14715917.

CERO C., Lea HJ, Zhu KY, Shamsi F, Tseng YH, Cypess AM. β 3-Adrenergic receptors regulate human brown/beige adipocyte lipolysis and thermogenesis. **JCI Insight**. 2021 Jun 8;6(11):e139160. doi: 10.1172/jci.insight.139160. PMID: 34100382; PMCID: PMC8262278.

CHAIX A.; Zarrinpar, A.; Miu, P.; Panda, S. Time-restricted feeding is a preventative and therapeutic intervention against diverse nutritional challenges. **Cell Metabolism**. 2014, 20, 991–1005.

CLEMENZA K., S. H. Weiss, K. Cheslack, D. B. Kandel, E. R. Kandel, and A. A. Levine, ‘Social isolation is closely linked to a marked reduction in physical activity in male mice’, **Journal of Neuroscience**. Res, vol. 99, no. 4, 2021, doi: 10.1002/jnr.24777.

ENERBÄCK, Sven. Human Brown Adipose Tissue. **Cell Metabolism**, Volume 11, Issue 4, 248 – 252, doi: 10.1016/j.cmet.2010.03.008

FERNANDES P., Nunes H., Marinho T. A., Barsanele, P. S. Moraes M. N., Poletini M. O. Social isolation increases metabolic rate in the transition of light- to dark- phase and advances Rev-erb- α expression in brown adipose tissue to regulate daily rhythm of core body temperature in mice, **Journal of Photochemistry and Photobiology**, Volume 16, 2023,100198, ISSN 2666-4690,

FERNANDES P., Pereira L. M, Horta N. A. C., Cardoso T. S. R, Coimbra C. C, Szawka R. E, Pereira GS, Poletini M. O. Social interaction masking contributes to changes in the activity of the suprachiasmatic nucleus and impacts on circadian rhythms. **Physiology & Behavior**. 2021 Aug 1;237:113420. doi: 10.1016/j.physbeh.2021.113420. Epub 2021 Apr 18. PMID: 33878315.

FRONTINI A., Cinti S. Distribution and development of brown adipocytes in the murine and human adipose organ. **Cell Metabolism**. 2010 Apr 7;11(4):253-6. doi: 10.1016/j.cmet.2010.03.004. PMID: 20374956.

FUNABASHI D, Wakiyama Y, Muto N, Kita I, Nishijima T. Social isolation is a direct determinant of decreased home-cage activity in mice: A within-subjects study using a body-implantable actimeter. **Exp Physiology** 2022 Feb;107(2):133-146. doi: 10.1113/EP090132. Epub 2022 Jan 11. PMID: 34921441.

GANESHAN K. and A. Chawla, 'Warming the mouse to model human diseases', **Nature Reviews Endocrinology**, vol. 13, no. 8. 2017. doi: 10.1038/nrendo.2017.48.

GHEMATI Z., Rashid M., Fayezi S., Gieseler F., Alizadeh E., Darabi M. An update on the secretory functions of brown, white, and beige adipose tissue: Towards therapeutic applications. **Reviews Endocrine & Metabolic Disorders**. 2024 Apr;25(2):279-308. doi: 10.1007/s11154-023-09850-0. Epub 2023 Dec 5. PMID: 38051471; PMCID: PMC10942928.

GERHART-HINES Z., Feng, D., Emmett, M. *et al.* The nuclear receptor Rev-erb α controls circadian thermogenic plasticity. **Nature** 503, 410–413 (2013). <https://doi.org/10.1038/nature12642>

GOFFART S, Wiesner R. J. Regulation and co-ordination of nuclear gene expression during mitochondrial biogenesis. **Experimental Physiology**. 2003 Jan;88(1):33-40. doi: 10.1113/eph8802500. PMID: 12525853.

GORDON C. J., Lee KL, Chen TL, Killough P, Ali JS. Dynamics of behavioral thermoregulation in the rat. **American Journal of Physiology**. 1991 Sep;261(3 Pt 2):R705-11. doi: 10.1152/ajpregu.1991.261.3.R705. PMID: 1887959.

GORDON C. J. Relationship between autonomic and behavioral thermoregulation in the mouse. **Physiology & Behavior**. 1985 May;34(5):687-90. doi: 10.1016/0031-9384(85)90365-8. PMID: 4034706.

GORDON C. J. Twenty-four hour rhythms of selected ambient temperature in rat and hamster. **Physiology & Behavior**. 1993 Feb;53(2):257-63. doi: 10.1016/0031-9384(93)90202-q. PMID: 8446688.

GUO H, Guo H, Brewer JM, Lehman MN, Bittman EL. Suprachiasmatic regulation of circadian rhythms of gene expression in hamster peripheral organs: effects of transplanting the pacemaker. **Journal of Neuroscience**. 2006; 26:6406–6412. [PubMed: 16775127]

HAMADA, T., LeSauter, J., Venuti, J. M., & Silver, R. (2001). Expression of period genes: Rhythmic and nonrhythmic compartments of the suprachiasmatic nucleus pacemaker. **Journal of Neuroscience**. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.21-19-07742.2001>

HAMILTON A, Rizzo R, Brod S, Ono M, Perretti M, Cooper D, D'Acquisto F. The immunomodulatory effects of social isolation in mice are linked to temperature control. **Brain, Behavior, and Immunity**. 2022 May;102:179-194. doi: 10.1016/j.bbi.2022.02.022. Epub 2022 Feb 22. PMID: 35217174.

HARDIN P. E. and Panda S (2013). Circadian timekeeping and output mechanisms in animals. **Current Opinion in Neurobiology**. 23, 724–731. [PubMed: 23731779]

HELDMAIER G. A influência da termorregulação social no crescimento adaptativo ao frio do BAT em camundongos sem pelos e peludos. **Pflugers Archiv**. 355, 261–266 (1975). <https://doi.org/10.1007/BF00583688>

HEINE P.A.; Taylor, J.A.; Iwamoto, G.A.; Lubahn, D.B.; Cooke, P.S. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. USA 2000, 97, 12729–12734

HERTEL C., Perkins J. P. Receptor-specific mechanisms of desensitization of beta-adrenergic receptor function. **Molecular and cellular endocrinology**. 1984 Oct;37(3):245-56. doi: 10.1016/0303-7207(84)90094-7. PMID: 6094283.

HUANG W., Ramsey, K.M., Marcheva, B., Bass, J., 2011. Circadian rhythms, sleep, and metabolism. **Journal of Clinical Investigation** 121, 2133–2141. <https://doi.org/10.1172/jci46043>

KIKUSUI, T., Winslow, JT, & Mori, Y. (2006). Amortecimento social: Alívio do estresse e da ansiedade. **Farmacologia, Bioquímica e Comportamento**, 84 (3).

KIM M., de la Peña JB, Cheong JH, Kim HJ. Neurobiological Functions of the Period Circadian Clock 2 Gene, *Per2*. **Biomolecules Therapeutic** (Seoul). 2018 Jul 1;26(4):358-367. doi: 10.4062/biomolther.2017.131. PMID: 29223143; PMCID: PMC6029676.

LEE C. R., Chen A., Tye K. M. The neural circuitry of social homeostasis: Consequences of acute versus chronic social isolation. **Cell**. 2021 Mar 18;184(6):1500-1516. doi: 10.1016/j.cell.2021.02.028. Epub 2021 Mar 9. Erratum in: *Cell*. 2021 May 13;184(10):2794-2795. doi: 10.1016/j.cell.2021.04.044. PMID: 33691140; PMCID: PMC8580010.

LESAUTER J., Silver R. Output signals of the SCN. **Chronobiology**. Int. 1998. Doi: 10.3109/07420529808998706

LIVAK K., Shmittgen T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. **Methods**, Volume 25, Issue 4, December 2001, Pages 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

MCNEILL B. T., Suchacki KJ, Stimson RH. MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: Human brown adipose tissue as a therapeutic target: warming up or cooling down? **European Journal of Endocrinology**. 2021 May 4;184(6):R243-R259. doi: 10.1530/EJE-20-1439. PMID: 33729178; PMCID: PMC8111330.

MIYAKE T., Inoue Y., Maekawa Y., Doi M. Circadian Clock and Body Temperature. **Advances Experimental Medicine and Biology**. 2024;1461:177-188. doi: 10.1007/978-981-97-4584-5_12. PMID: 39289281.

MORRISON S. F., C. J. Madden, and D. Tupone. Central neural regulation of brown adipose tissue thermogenesis and energy expenditure. **Cell Metabolism**, vol. 19, nº 5. 2014. doi: 10.1016/j.cmet.2014.02.007

NAGASHIMA K., Nakai S., Tanaka M., Kanosue K. Neuronal circuitries involved in thermoregulation. **Autonomic Neuroscience**. 2000 Dec 20;85(1-3):18-25. doi: 10.1016/S1566-0702(00)00216-2. PMID: 11189023.

NAM D., Yechoor VK, Ma K. Molecular clock integration of brown adipose tissue formation and function. **Adipocyte**. 2015 Aug 12;5(2):243-50. doi: 10.1080/21623945.2015.1082015. PMID: 27385482; PMCID: PMC4916866.

NEDERGAARD J., Von Essen G., Cannon B. Brown adipose tissue: can it keep us slim? A discussion of the evidence for and against the existence of diet-induced thermogenesis in mice and men. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**. 2023 Oct 23;378(1888):20220220. doi: 10.1098/rstb.2022.0220. Epub 2023 Sep 4. PMID: 37661736; PMCID: PMC10475870.

NEGROIU C. E., Tudoraşcu I., Bezna C. M., Godeanu S., Diaconu M., Danoiu R., Danoiu S. Beyond the Cold: Activating Brown Adipose Tissue as an Approach to Combat Obesity. **Journal Clinical Medicine**. 2024 Mar 28;13(7):1973. doi: 10.3390/jcm13071973. PMID: 38610736; PMCID: PMC11012454.

NOMURA K., Kinoshita S., Mizusaki N., Senga Y., Sasaki T., Kitamura T., Sakaue H., Emi A., Hosooka T., Matsuo M., Okamura H., Amo T., Wolf A. M., Kamimura N., Ohta S, Itoh T, Hayashi Y, Kiyonari H, Krook A, Zierath JR, Kasuga M, Ogawa W. Adaptive gene expression of alternative splicing variants of PGC-1 α regulates whole-body energy metabolism. **Molecular Metabolism**. 2024 Aug; 86:101968. doi: 10.1016/j.molmet.2024.101968. Epub 2024 Jun 15. PMID: 38885788; PMCID: PMC11254180.

OLESÇUCK I. F., L. S. D. Camargo, P. V. V. D. Carvalho, C. A. P. D. Souza, C. C. Gallo, F. G. Amaral. Melatonin and brown adipose tissue: novel insights to a complex interplay. **Melatonin Research**. 2019, Vol 2 (4) 25-41; doi: 10.32794/mr11250039

PATEL H., Kerndt C. C., Bhardwaj A. Fisiologia, Quociente Respiratório. [Atualizado em 13 de fevereiro de 2023]. Em: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. **Disponível em:** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK531494/>

PÉRONNET F., MASSICOTTE D. Table of nonprotein respiratory quotient: an update. **Canadian Journal Sport Sciences**. 1991 Mar;16(1):23-9. PMID: 1645211.

PITTENDRIGH C. S. (1993). Temporal Organization: Reflections of a Darwinian Clock-Watcher. **Annual Review of Physiology**. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.55.030193.000313>

RAZZOLI M., M. J. Emmett, M. A. Lazar, and A. Bartolomucci, 'b-Adrenergic receptors control brown adipose UCP-1 tone and cold response without affecting its circadian rhythmicity', **FASEB Journal**, vol. 32, no. 10, 2018, doi: 10.1096/fj.201800452R.

REFINETTI R. The circadian rhythm of body temperature. **Front Biosci** (Landmark Ed). 2010 Jan 1;15(2):564-94. doi: 10.2741/3634. PMID: 20036834.

SANCAR G., Brunner M. Circadian clocks and energy metabolism. **Cellular and Molecular Life Sciences**. 2014 Jul;71(14):2667-80. doi: 10.1007/s00018-014-1574-7. Epub 2014 Feb 12. PMID: 24515123; PMCID: PMC11113245.

SAKAGUCHI M. Adipose Tissue Dynamics, Thermogenesis, and Interorgan Connections for Preventing Obesity and Metabolic Disorders. **JMA Journal**. 2024 Apr 15;7(2):172-177. doi: 10.31662/jmaj.2023-0218. Epub 2024 Mar 18. PMID: 38721091; PMCID: PMC11074534.

SCHRADER L. A., Ronnekleiv-Kelly SM, Hogenesch JB, Bradfield CA, Malecki KM. Circadian disruption, clock genes, and metabolic health. **Journal of Clinical Investigation**. 2024 Jul 15;134(14):e170998. doi: 10.1172/JCI170998. PMID: 39007272; PMCID: PMC11245155.

SCHREIBER R., Diwoky C, Schoiswohl G, Feiler U, Wongsiriroj N, Abdellatif M, Kolb D, Hoeks J, Kershaw EE, Sedej S, Schrauwen P, Haemmerle G, Zechner R. Cold-Induced Thermogenesis Depends on ATGL-Mediated Lipolysis in Cardiac Muscle, but Not Brown Adipose Tissue. **Cell Metabolism**. 2017 Nov 7;26(5):753-763.e7. doi: 10.1016/j.cmet.2017.09.004. Epub 2017 Oct 5. PMID: 28988821; PMCID: PMC5683855.

SCHMIDT-NIELSEN, K. (1990) Animal Physiology. Cambridge University Press, Cambridge. 4th edition.

SCHLAEPFER, I. R., Joshi M. CPT1A-mediated Fat Oxidation, Mechanisms, and Therapeutic Potential. **Endocrinology**. 2020 Feb 1;161(2):bqz046. doi: 10.1210/endocr/bqz046. PMID: 31900483.

SCHEER, F.A., Hilton MF, Mantzoros CS, Shea SA. Adverse metabolic and cardiovascular consequences of circadian misalignment. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. U S A. 2009; 106:4453–4458. [PubMed: 19255424]

SCHIBLER, U., Ripperger, J., Brown, S.A., 2003. Peripheral Circadian Oscillators in Mammals: Time and Food. **Journal of Biological Rhythms** 18, 250–260. <https://doi.org/10.1177/0748730403018003007>

SCHIBLER, U. Steven A. Brown and the synchronization of circadian rhythms by body temperature cycles. **European Journal of Neuroscience**. 2024;60:3891–3900.

STOKKAN K.-A., Yamazaki, S., Tei, H., Sakaki, Y., Menaker, M., 2001. Entrainment of the Circadian Clock in the Liver by Feeding. **Science** 291, 490–493. <https://doi.org/10.1126/science.291.5503.490>

TAM C. S., Lecoultre V., Ravussin E. Brown adipose tissue: mechanisms and potential therapeutic targets. **Circulation**. 2012 Jun 5;125(22):2782-91. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.042929. PMID: 22665886.

TOMOVA L., Wang, K.L., Thompson, T. *et al.* Acute social isolation evokes midbrain craving responses similar to hunger. **Nature Neuroscience**. 23, 1597–1605 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41593-020-00742-z>

TERAZONO H., Mutoh, T., Yamaguchi, S., Kobayashi, M., Akiyama, M., Udo, R., Ohdo, S., Okamura, H., & Shibata, S. (2003). Adrenergic regulation of clock gene expression in mouse liver. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. <https://doi.org/10.1073/pnas.0936797100>

U-DIN M., de Mello V.D., Tuomainen M., Raiko J., Niemi T., Fromme T., Klåvus A., Gautier N., Haimilahti K., Lehtonen M., Kristiansen K., Newman J. W., Pietiläinen K. H., Pihlajamäki J., Amri E. Z., Klingenspor M., Nuutila P., Pirinen E., Hanhineva K., Virtanen K. A. Cold-stimulated brown adipose tissue activation is related to changes in serum metabolites relevant to NAD⁺ metabolism in humans. **Cell Rep**. 2023 Sep 26;42(9):113131. doi: 10.1016/j.celrep.2023.113131. Epub 2023 Sep 13. PMID: 37708023.

VOLLMERS C., Gill, S., DiTacchio, L., Pulivarthy, S.R., Le, H.D., Panda, S., 2009. Time of feeding and the intrinsic circadian clock drive rhythms in hepatic gene expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 106, 21453–21458. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909591106>

WELSH D. K., Logothetis DE, Meister M, Reppert SM. Individual Neurons Dissociated from Rat Suprachiasmatic Nucleus Express Independently Phased Circadian Firing Rhythms. **Cell**. 1995; 14:697–706.

WELSH D.K., Takahashi JS, Kay SA. Suprachiasmatic nucleus: cell autonomy and network properties. **Annual Review of Physiology**. 2010; 72:551–577. [PubMed: 20148688]

WEST G. B., Brown J. H., Enquist B. J., The fourth dimension of life: fractal geometry and allometric scaling of organisms, **Science** 284 (5420) (1979) 1999, <https://doi.org/10.1126/science.284.5420.1677>.

WHITE J. D., Dewal RS, Stanford KI. The beneficial effects of brown adipose tissue transplantation. **Molecular Aspects of Medicine**. 2019 Aug;68:74-81. doi: 10.1016/j.mam.2019.06.004. Epub 2019 Jun 21. PMID: 31228478; PMCID: PMC6708446.

WINDRED D. P., Anderson, C., Jeppe, K.J. *et al.* Higher central circadian temperature amplitude is associated with greater metabolite rhythmicity in humans. **Scientific Reports**. 14, 16796 (2024). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-67297-y>

YAMAZAKI S., Numano, R., Abe, M., Hida, A., Takahashi, R. I., Ueda, M., Block, G. D., Sakaki, Y., Menaker, M., & Tei, H. (2000). Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. **Science**. <https://doi.org/10.1126/science.288.5466.682>

ZHANG F., Hao G., Shao M., Nham K., An Y., Wang Q., Zhu Y., Kusminski C. M., Hassan G., Gupta R. K., Zhai K., Sun X., Scherer P., Oz O. K.. An Adipose Tissue Atlas: An Image-Guided Identification of Human-like BAT and Beige Depots in Rodents. **Cell Metabolism**. Volume 27, Issue 1P252-262.E3 January 09, 2018, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.12.004>.

ZOU, Y., Lu P., Shi J., Liu W., Yang M., Zhao S. *IRX3* Promotes the Browning of White Adipocytes and Its Rare Variants are Associated with Human Obesity Risk. **eBioMedicine**, Volume 24, 64 - 75