

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E BIOFÍSICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**

**A IMPORTÂNCIA DA INTERAÇÃO SOCIAL PARA O FUNCIONAMENTO DO
SISTEMA CIRCADIANO DE CAMUNDONGOS**

Paola Fernandes

**BELO HORIZONTE – MG
AGOSTO/2017**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E BIOFÍSICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

**A IMPORTÂNCIA DA INTERAÇÃO SOCIAL PARA O FUNCIONAMENTO DO
SISTEMA CIRCADIANO DE CAMUNDONGOS**

Paola Fernandes

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Fisiologia

Orientadora: Profa. Dra. Maristela de Oliveira Poletini

Co-orientadora: Profa Grace Schenatto Pereira Moraes

Belo Horizonte, MG

2017

043

Fernandes, Paola.

A importância da interação social para o funcionamento do sistema circadiano de camundongos [manuscrito] / Paola Fernandes. – 2017.

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

Orientadora: Profa. Dra. Maristela de Oliveira Poletini. Co-orientadora: Profa. Grace Schenatto Pereira Moraes.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

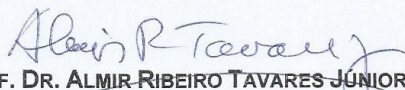
1. Fisiologia. 2. Ritmo circadiano. 3. Interação social. 4. Isolamento social. 5. Núcleo supraquiasmático. I. Poletini, Maristela de Oliveira. II. Moraes, Grace Schenatto Pereira. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 612

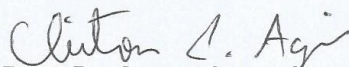
**"A IMPORTÂNCIA DA INTERAÇÃO SOCIAL PARA O
FUNCIONAMENTO DO SISTEMA CIRCADIANO DE
CAMUNDONGOS"**

PAOLA FERNANDES

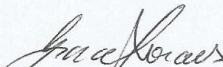
Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia **19 de setembro de 2017**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:




PROF. DR. ALMIR RIBEIRO TAVARES JUNIOR
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROF. DR. CLEITON LOPES AGUIAR
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROFA. DRª. GRACE SCHENATTO PEREIRA MORAES
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COORIENTADORA



PROFA. DRª. MARISTELA DE OLIVEIRA POLETINI
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ORIENTADORA

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

Belo Horizonte, 19 de setembro de 2017

Dedicatória

Este trabalho é dedicado aos meus amados pais, Alúcio e Elizabete, pelo incentivo e amor incondicionais.

Ao meu amor, Lucas, pelo companheirismo e parceria diários.

Aos amigos e familiares que sempre me apoiaram!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois, apesar de não ser uma pessoa muito religiosa, tenho certeza que Ele olha e zela por mim todos os dias.

Aos meus pais, pessoas nas quais eu me espelho todos os dias para ser uma pessoa melhor. Obrigada pelo amor e incentivo de sempre, por acreditarem que eu era capaz mesmo quando eu dizia que não, e por nunca medirem esforços para nos ver felizes e realizados!

Ao Lucas, por esses dois anos intensos que mudaram completamente as nossas vidas. Obrigada pelo carinho, amor, incentivo, apoio e palavras de conforto sempre que eu precisei. Com certeza você foi uma peça fundamental para que eu tivesse estrutura emocional para concluir essa etapa da minha vida.

Aos todos os meus familiares pelo amor, carinho e apoio de sempre!

Agradeço imensamente a Prof^a Maristela por ter me recebido de braços abertos, mesmo não me conhecendo, e por ter me proporcionado à oportunidade de trabalhar no seu laboratório e de aprender tanto. Obrigada por ser uma orientadora tão atenciosa, acolhedora, paciente, competente e amiga. Sua paixão pela ciência nos inspira todos os dias a continuar nesse caminho.

À co-orientadora Prof^a Grace, pelos ensinamentos e, principalmente, por ter sido tão solícita comigo desde o primeiro contato. Sem sombra de dúvidas, você contribuiu de inúmeras formas para que este trabalho fosse concretizado.

A todos os meus amigos de Formiga e de BH, pela amizade sincera, apoio e momentos de descontração.

Às minhas amigas de laboratório Nayara, Thaís e Flávia. Obrigada por todos os ensinamentos, ajudas nos experimentos, risadas, “manotas”, conselhos sinceros, e momentos agradáveis. Sem dúvida, a boa convivência e o apoio mútuo que damos umas as outras faz a nossa rotina ser bem mais fácil e divertida. Admiro cada uma de vocês, não apenas pela inteligência e competência, mas também pela essência.

A Luciana Melo, pela amizade dentro e fora do laboratório, pela valiosa ajuda ao longo desses dois anos. Você é admirável como pesquisadora e como pessoa.

Aos queridos amigos Matheus e Luciana Consenza. Lu esteve comigo desde o primeiro dia de mestrado e se tornou uma grande amiga. Obrigada aos dois pelas conversas jogadas fora, risadas, ensinamentos, seminários em grupo, e por serem essas pessoas tão calmas e tranquilas que davam equilíbrio emocional a esse trio.

A todos os colegas e professores do Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo pela convivência, seminários, ensinamentos, e por estarem sempre de portas abertas para ajudar no que fosse necessário. Em especial a Patrícia que me ensinou com muita paciência a técnica de imunohistoquímica.

A técnica do laboratório Simone, por ser sempre tão solícita em me ajudar no que fosse preciso.

Aos professores do departamento pelos valiosos ensinamentos que contribuíram para minha formação acadêmica.

Aos bioteristas atuais e que passaram por aqui durante esses dois anos, obrigada pelo cuidado e zelo pelo bem estar dos nossos animais.

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação, Cynthia e Rodner, pela prontidão e atenção de sempre.

Às agências de fomento CAPES (bolsa de mestrado), FAPEMIG (APQ-01173-17) e CNPq pelo financiamento da pesquisa.

LISTA DE ABREVIATURAS

3V – 3º ventrículo

5HIAA - ácido 5-hidroxiindoleacético

5-HT – serotonina

All - angiotensina II

ALE – atividade locomotora espontânea

ARC - núcleo arqueado

AVP – arginina-vasopressina

Bmal1 - *Brain and muscle Arnt-like protein 1*

BO - bulbo olfatório

BSA – albumina bovina

CALB – calbidina

CALR – calretinina

Ck - Caseína quinase

Clock - *Circadian Locomotor Output Cycles Kaput*

Cry – *Cryptochrome*

DM – dorsomedial

GABA – ácido gama-aminobutírico

Glu – glutamato

GRP - peptídeo liberador de gastrina

HDM - hipotálamo dorso-medial

HHA – hipotálamo-hipófise-adrenal

HIPOC - Hipocampo

i.p. – Intraperitoneal

IGL- intergeniculato lateral

ipRGCs - células ganglionares da retina intrinsecamente fotossensíveis

LCE - labirinto em cruz elevado

LHb – habenula lateral

mENK - met-enkefalina

NPAS2 - *Neuronal PAS Domain Protein 2*

NPY – neuropeptídeo Y

NSQ – núcleo supraquiasmático

NT – neurotensina

PACAP - peptídeo hipofisário ativador de adenilato ciclase

PBS - tampão fosfato salina

Per – *Period*

PFA – paraformaldeído

PK2 – prokinectina 2

qo – quiasma óptico

s.c. – subcutâneo

TAB - tecido adiposo branco

TAM - tecido adiposo marrom

TC - tronco cerebral

TGH - trato geniculohipotalâmico

TGI - trato gastrointestinal

T_{interna} – Temperatura corporal interna

TNF- teste do nado forçado

TPS- teste de preferência à sacarose

TRH – trato retino hipotalâmico

TX-100 - Triton X-100

U.A. – unidades arbitrárias

VIP - polipeptídeo vasoativo intestinal

VL – ventrolateral

ZT – *zeitgeber*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema representativo de parâmetros analisados no estudo de uma variável rítmica	14
Figura 2: Representação esquemática das divisões morfofuncionais do NSQ	18
Figura 3: Esquema representativo que resume o funcionamento do relógio biológico	20
Figura 4: Modelo heurístico proposto por Mistlberger e Skene (2004) sobre possíveis mecanismos pelas quais a pista social pode participar da sincronização do relógio biológico	28
Figura 5: Representação esquemática do protocolo de avaliação dos comportamentos tipo anedônico e ansioso, através do TPS e LCE, respectivamente	33
Figura 6: Representação esquemática do protocolo de avaliação do comportamento de desamparo aprendido, através do TNF	34
Figura 7: Representação esquemática do protocolo de registro de ALE e $T_{interna}$ de camundongos mantidos agrupados e isolados	35
Figura 8: Representação esquemática do protocolo de isolamento social seguido de perfusão transcardíaca, para avaliação da atividade temporal do NSQ.....	35
Figura 9: Representação esquemática do protocolo de <i>Jet lag</i> para avaliação da resposta de foto-arrastamento	36
Figura 10: Efeito do isolamento social sobre comportamentos relacionados ao humor	45
Figura 11: Efeito do isolamento social sobre o ganho de peso corporal ao longo de 4 semanas.....	45
Figura 12: Efeito do isolamento social sobre a variação do ritmo de ALE na fase de luz e escuridão, e sobre a amplitude do ritmo de ALE	46
Figura 13: Efeitos do isolamento social sobre a variação do ritmo de $T_{interna}$ na fase de luz e escuridão, e sobre a amplitude do ritmo de $T_{interna}$	47
Figura 14: Análise de distribuição do <i>onset</i> , acrofase e <i>offset</i> de ALE correspondentes a 8 dias de registro de telemetria de animais agrupados e isolados	49

Figura 15: Análise de distribuição de <i>onset</i> , acrofase e <i>offset</i> de T_{interna} correspondentes de a 8 dias de registro de telemetria de animais agrupados e isolados	50
Figura 16: Efeito do isolamento social sobre o acoplamento do <i>onset</i> e <i>offset</i> de ALE e T_{interna} em animais agrupados e isolados	51
Figura 17: Efeito do isolamento social sobre a atividade neuronal do NSQ no ZT2 e ZT14 em animais isolados e agrupados.....	52
Figura 18: Efeito do isolamento social sobre a atividade neuronal das regiões DM e VL do NSQ no ZT2 e ZT14.....	53
Figura 19: Actogramas representativos do ritmo circadiano de ALE e T_{interna} de um animal do grupo agrupado e um animal do grupo isolado antes e durante o protocolo de <i>Jet lag</i>	54
Figura 20: Efeito do isolamento social sobre a resposta de foto-arrastamento em animais agrupados e isolados	55
Figura 21: Participação dos <i>zeitgebers</i> não-fóticos, como agentes reforçadores que potencializam a sincronização do sistema circadiano	68

RESUMO

O isolamento social induz diversas alterações em humanos e em roedores. Neste último, destacam-se alterações em comportamentos relacionados ao humor. Desordens de humor, como depressão, são acompanhadas por alterações em diversos parâmetros do ritmo circadiano. O núcleo supraquiasmático do hipotálamo (NSQ) direciona os ritmos circadianos, como os ritmos de atividade locomotora espontânea (ALE) e temperatura corporal (T_{interna}), que por sua vez são arrastados pelos ciclos de luz e escuridão, o que é crítico para nosso relógio biológico se antecipar a mudanças do ambiente externo e ajustar nosso comportamento e metabolismo. Além da luz, estímulos não-fóticos, tal como a interação social, parece contribuir para a sincronização do relógio biológico. Neste estudo, avaliamos o efeito da perda da interação social sobre comportamentos relacionados ao humor; bem como o seu impacto sobre os eventos de saída do relógio biológico, tais como os ritmos circadianos de ALE e T_{interna} ; além do seu efeito sobre a plasticidade do sistema circadiano e atividade temporal dos neurônios do NSQ. Camundongos adultos machos C57Bl/6J foram mantidos isolados ou agrupados por 4 semanas em ciclo de luz e escuridão padrão de 12:12h. Um sensor de telemetria foi implantado na cavidade intraperitoneal no 15º dia do protocolo para analisar os ritmos circadianos de ALE e T_{interna} . A fim de avaliar se a plasticidade do sistema circadiano é afetada pelo isolamento social, os animais foram submetidos a um protocolo de *Jet lag*, onde o ciclo de luz foi avançado por 6 horas a partir do 29º ao 35º dia (luzes acesas às 11:00h e apagadas às 23:00h), e a partir do 36º dia ao 42º, o ciclo de luz foi atrasado por 6 horas (luzes acesas às 5:00h a apagadas às 17:00h). Um grupo de animais foi perfundido transcárdialmente nos ZT2 e ZT14 do ciclo claro escuro para análise do número de neurônios c-Fos+ no NSQ. Outro conjunto de animais isolados e agrupados foram testados para o comportamento de desamparo, tipo anedônico e tipo ansioso através dos testes de nado forçado, preferência à sacarose, e labirinto em cruz elevado, respectivamente. Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de ética da UFMG (nº 12/2015). O protocolo de isolamento social utilizado neste trabalho induziu o comportamento de desamparo, comportamento hedônico de busca à sacarose, mas não comportamento tipo-ansioso. Um prejuízo significativo no ganho de peso ao longo do período de isolamento também foi observado no grupo isolado. Além disso, o isolamento social

induziu uma diminuição da ALE total tanto na fase de luz quanto na fase de escuridão, bem como um aumento na amplitude do ritmo de T_{interna} . Apesar de não terem sido observadas alterações no horário de início, pico e fim de ALE, o isolamento social causou um avanço no horário de início, bem como um atraso no fim do ritmo de T_{interna} . Estes resultados sugerem que o isolamento social provoca um desacoplamento dos ritmos de ALE e T_{interna} . Em acordo com esses resultados, a atividade temporal dos neurônios do relógio central foi abolida pelo isolamento. Ademais, o isolamento social parece prejudicar a resposta de foto-arrastamento, visto que os animais isolados apresentaram um arraste mais rápido do seu início de ALE em relação aos animais agrupados. Estes resultados indicam que a perda da interação social provoca perturbações no relógio biológico, afetando os ritmos circadianos de ALE e T_{interna} e mecanismos de foto-arrastamento, possivelmente através de perturbações na função do núcleo supraquiasmático, podendo contribuir para a causa de alterações relacionadas ao humor.

Palavras-chave: ritmo circadiano, interação social, isolamento social, núcleo supraquiasmático

ABSTRACT

Social isolation induces several changes in humans and rodents. In the latter, changes in mood-related behaviors are highlighted. Mood disorders, such as depression, are accompanied by changes in various circadian rhythm parameters. The suprachiasmatic nucleus of the hypothalamus (SCN) directs the circadian rhythms, such as the rhythms of spontaneous locomotor activity (SLA) and core body temperature (T_{core}), which in turn are entrained by cycles of light and darkness, which is critical for our clock to anticipate, internally, the changes in the external environment in order to adjust our behavior and metabolism. In addition to light, non-photic stimuli, such as social interaction, seem to contribute to the synchronization of the biological clock. In this study, we evaluated the impact of loss of social interaction on mood-related behaviors; as well as on the circadian rhythms of SLA and T_{core} , plasticity of the circadian system, and neuronal activity of NSQ. Male C57BL / 6J male mice were kept isolated or grouped for 4 weeks in light:dark cycles of 12:12 h. A telemetry sensor was implanted in the intraperitoneal cavity on the 15th day of the protocol to analyze the circadian rhythms of SLA and T_{core} . In order to evaluate whether the photo-entrainment response is affected by isolation, the animals were subjected to a jetlag protocol, where the light phase was advanced for 6 h from the 29th to the 35th day (lights on at 11:00 a.m. and lights off at 11:00 p.m.), and from the 36th day to the 42th, the light phase was delayed by 6 h (lights on at 5:00 a.m. and lights off at 5:00 p.m.). One group of animals under light:dark cycles of 12:12 h was transcardially perfused on ZT2 and ZT14 for analysis of c-Fos expression in the SCN. Another set of isolated and grouped animals were tested for the behavioral despair, anhedonic like behavior and anxious like behavior through forced swimming tests, sucrose preference test, and elevated plus maze, respectively. The experiments were approved by UFMG Ethics Committee (n^o 12/2015). The social isolation protocol used in this study induced behavioral despair and hedonic seeking behavior to sucrose, but not anxiety-like behavior. A significant loss in body weight gain was also observed in the isolated group along with social isolation period. In addition, social isolation induced a decrease in total SLA both in the light and dark phase, as well as an increase in the amplitude of the T_{core} rhythm. Although there were no changes in the onset, offset and acrophase of SLA, social isolation caused an advance in the T_{core} onset, as well as a delay in the offset of the T_{core} rhythm. Thus,

social isolation causes an uncoupling of the SLA and T_{core} rhythms. In agreement with these results, the temporal activity of SCN neurons was lost after isolation. In addition, social isolation seems to impair the photo-entrainment responses, since the isolated animals showed a faster entrainment of their SLA onset compared to grouped animals. These results indicate that loss of social interaction causes disturbances in the SLA and T_{core} circadian rhythms and affects the photo-entrainment mechanisms through disturbances in the central clock function, what may cause mood-related changes.

Key words: circadian rhythm, social interaction, social isolation, suprachiasmatic nucleus

SUMÁRIO

1. JUSTIFICATIVA.....	11
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1. RITMO CIRCADIANO E RELÓGIO BIOLÓGICO	12
2.1.1. Marcapasso central: o núcleo supraquiasmático	15
2.1.2. Maquinaria molecular do relógio biológico.....	21
2.1.3. <i>Zeitgebers</i> não-fóticos	22
2.2. INTERAÇÃO SOCIAL COMO PISTA DO RELÓGIO BIOLÓGICO	24
2.2.1. Isolamento social e ritmo circadiano.....	29
3. OBJETIVOS.....	31
3.1. Objetivo geral	31
3.2. Objetivos específicos	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1. Animais	32
4.2. Delineamento experimental.....	32
4.2.1. Experimento 1: Efeito do isolamento social sobre os comportamentos tipo depressivo e ansioso e sobre o ganho de peso.....	32
4.2.2. Experimento 2: Efeito do isolamento social sobre a variação circadiana de ALE e $T_{interna}$	34
4.2.3. Experimento 3: Efeito do isolamento social sobre a atividade temporal neuronal do NSQ.	35
4.2.4. Experimento 4: Efeito do Isolamento social sobre a resposta de foto- arrastamento induzido por protocolo de <i>Jet lag</i>	36
4.3. Implantação do sensor de telemetria e registro da $T_{interna}$ e ALE	36
4.4. Testes comportamentais	38
4.4.1. Teste de preferência à sacarose.....	38
4.4.2. Teste do nado forçado.....	38

4.4.3. Labirinto em cruz elevado.....	39
4.5. Perfusão transcardíaca e preparação dos cérebros para imunohistoquímica 39	
4.6. Imunohistoquímica para c-Fos.....	40
4.7. Obtenção das imagens e contagem de células.....	41
4.8. Análise estatística	41
5. RESULTADOS	44
5.1. Efeito do isolamento social sobre comportamentos relacionados ao humor e sobre o ganho de peso	44
5.2. Efeito do isolamento social sobre o ritmo circadiano de ALE e $T_{interna}$	46
5.3. Efeito do Isolamento social sobre a atividade temporal do NSQ.....	52
5.4. Efeito do Isolamento social sobre a resposta de foto-arrastamento.....	54
6. DISCUSSÃO.....	56
7. CONCLUSÃO.....	67
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

1. JUSTIFICATIVA

O protocolo de isolamento social é conhecido por induzir alterações comportamentais relacionadas ao humor e alterações neuroquímicas em roedores, semelhantes às observadas em indivíduos depressivos (ZALETEL; FILIPOVIĆ; PUŁKAŁ, 2017). Em humanos, o isolamento social está associado à maior probabilidade de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (BARTH; SCHNEIDER; VON KÄNEL 2010) e infecciosas (COHEN et al., 1997), problemas cognitivos (BASSUK.; GLASS; BERKMAN, 1999) depressão (MATTHEWS et al. 2016), além de estar associado com o aumento da mortalidade em homens e mulheres acima de 52 anos (STEPTOE et al., 2013), sendo comparada a outros fatores de risco bem conhecidos como tabagismo, obesidade e sedentarismo (HOLT-LUNSTAD; SMITH; LAYTON, 2010).

Sabe-se que em desordens de humor como a depressão, na qual o isolamento social e o sentimento de solidão estão diretamente relacionados (MATTHEWS et al. 2016), são observadas alterações em diversos parâmetros circadianos, como no ritmo de temperatura corporal, nas variações diurnas de humor, na secreção cíclica de hormônios e neurotransmissores, no padrão do ciclo sono/vigília e diminuição na amplitude da expressão de genes do relógio em várias regiões do cérebro (EDGAR; MCCLUNG, 2013; SCHNELL; ALBRECHT; SANDRELLI, 2014).

Uma vez que evidências apontam para um papel da interação social sobre a regulação do relógio biológico em diversas espécies, é possível imaginar que a privação do contato social através do isolamento social pode ser capaz de provocar efeitos significativos sobre o ritmo circadiano. Deste modo, o presente trabalho tem como finalidade investigar o impacto da perda da interação social, através do protocolo de isolamento social, sobre o funcionamento do sistema circadiano em camundongos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. RITMO CIRCADIANO E RELÓGIO BIOLÓGICO

O movimento de rotação da Terra em torno do seu próprio eixo permite a geração dos dias e das noites, ou ciclo de luz e escuridão, uma das características mais marcantes do nosso planeta (VITATERNA; TAKAHASHI; TUREK, 2001). Este ciclo com duração de aproximadamente 24 horas, permitiu a evolução de um relógio circadiano (*circa diem*, cerca de um dia) autônomo em praticamente todas as formas de vida existentes, permitindo mudanças fisiológicas e comportamentais diárias (VITATERNA; TAKAHASHI; TUREK, 2001; KALSBECK; FLIERS, 2013). Este relógio, também chamado de relógio biológico, tem como função coordenar e antecipar nosso comportamento e metabolismo de acordo com a periodicidade ambiental (ciclo de luz e escuridão), mudanças de temperatura, disponibilidade ou não de alimentos, e interação social (KALSBECK et al., 2012; KALSBECK; FLIERS, 2013). Deste modo, destaca-se a capacidade do relógio biológico de antecipar-se às mudanças do ambiente, permitindo que os indivíduos se preparem previamente com uma resposta adequada (GOLOMBEK; ROSENSTEIN, 2010).

Apesar de o relógio biológico ser diariamente sincronizado com o ciclo de luz e escuridão, ele apresenta uma ritmicidade endógena marcante, que está presente mesmo na ausência total de luz. Algumas das primeiras observações de que seres vivos apresentavam mudanças cíclicas ao longo do dia, foi realizada em meados de 1729, por Jean Jacques d'Ortois De Mairan. Observando os movimentos periódicos de abrir e fechar da planta *Mimosa pudica*, ele demonstrou que tal fenômeno ocorria mesmo em condições de escuridão constante, concluindo assim que este movimento não seria controlado apenas por um ciclo de luz e escuridão ambiental, mas sim por uma periodicidade endógena da planta. Décadas mais tarde, esta afirmação foi comprovada, e quase um século depois, mostrou-se em animais e humanos a presença desta natureza endógena. O chamado período *free-running*, ou de livre curso, caracteriza o período intrínseco do indivíduo na ausência de pistas

temporais, como a luz (ROENNEBERG; MERROW, 2005; LIMA E VARGAS, 2014).

As pistas ambientais que contribuem para a sincronização do relógio biológico com o meio externo são conhecidas como *zeitgebers*, ou “doadores de tempo”, que atuam como agentes sincronizadores, sendo a luz considerada a mais importante. Entretanto, existem pistas não-fólicas ambientais e endógenas que também contribuem para esta sincronização. Dentre elas estão: a alimentação, temperatura, atividade física, interação social, e hormônios como glicocorticóides e melatonina (SCHNELL; ALBRECHT; SANDRELLI, 2014; OSTER et al., 2017). O funcionamento do relógio biológico como um todo depende da ação reforçadora ou potencializadora destes *zeitgeber* para garantir a sincronia de fase entre os múltiplos relógios (WEST; BECHTOLD, 2015)

Os *zeitgebers* possuem a capacidade de alterar ou ajustar parâmetros importantes do relógio biológico, o período (τ); que caracteriza a duração de um ciclo completo, e a fase do relógio (ϕ); que caracteriza a posição dentro do ciclo, ou seja, a fase de luz (dia) ou a fase de escuridão (noite) (MISTLBERGER; ANTLE, 2011) (Figura 1). Portanto, a exposição a estes *zeitgebers* ajustam o período e a fase do relógio biológico de acordo ciclo ambiental (GOLOMBEK; ROSENSTEIN, 2010).

Além do período e da fase de um ciclo, outros parâmetros específicos dos ritmos circadianos são normalmente analisados para avaliar o padrão da ritmicidade de uma variável. Dentre eles estão: o horário dos valores máximos, denominado acrofase; bem como o horário de seus níveis mínimos ou nadir, denominado *offset*; o horário em que tal variável rítmica inicia, denominado *onset*; e por fim, a diferença entre os valores na acrofase e no *offset* de uma determinada variável circadiana, conhecida como amplitude do ritmo. Tais parâmetros podem ser alterados pelos *zeitgebers*, conseqüentemente, afetando o período e a fase circadiana (MARQUES; GOLOMBEK; MORENO, 1999) (Figura 1).

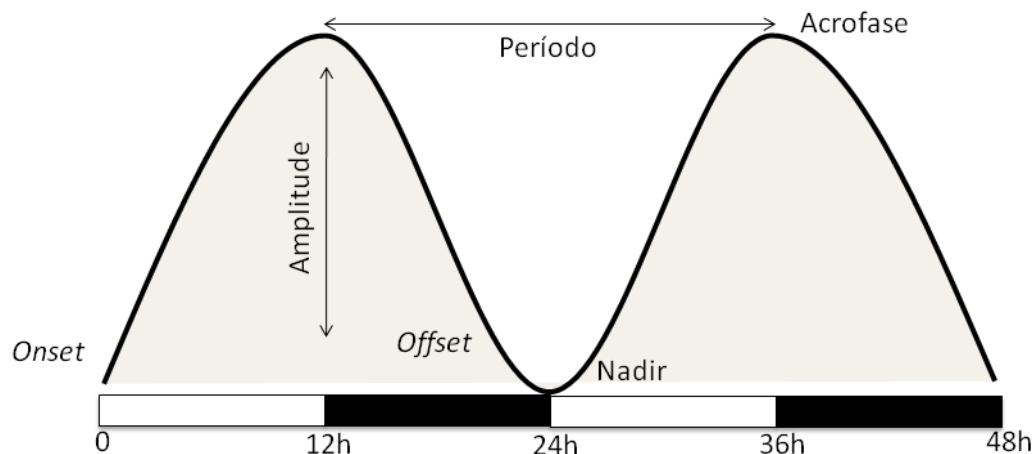


Figura 1: Esquema representativo de parâmetros analisados no estudo de uma variável rítmica. As barras brancas representam a fase de luz e as barras pretas representam a fase de escuridão.

É importante termos em mente que os *zeitgebers* possuem a capacidade de sincronizar e arrastar o relógio biológico diante de sua exposição. Por exemplo, quando roedores noturnos são expostos à luz em um horário não habitual, como no início da sua fase de alerta (fase de escuridão), isto acarreta em um arraste do ritmo circadiano de atividade locomotora espontânea (ALE), temperatura (T_{interna}), expressão gênica, dentre outros parâmetros. Neste caso, considera-se que o animal sofreu um atraso de fase, ou seja, ocorreu um atraso no início da sua fase de atividade. O contrário ocorre quando estes animais recebem um estímulo luminoso no final da fase de alerta, provocando um avanço de fase, ou seja, um avanço do início da fase de repouso (GOLOMBEK; ROSENSTEIN, 2010; MISTLBERGER; ANTLE, 2011; TAHARA; AOYAMA; SHIBATA, 2017). Um exemplo prático destes eventos em seres humanos é observado em viagens transmeridionais. Indivíduos que viajam para lugares com dois ou mais fusos horários de diferença apresentam sintomas de *Jet lag*, que compreende um efeito do desalinhamento entre o relógio circadiano interno com o ciclo de luz e de atividade ambiental, acarretando em sintomas como prejuízo do sono e cognitivo, sonolência ou insônia, dentre outros desconfortos. Viagens para o leste causam um avanço de fase, e para o oeste um atraso de fase dos ritmos circadianos. Isso acontece porque o relógio biológico não se adapta tão rapidamente a estas mudanças repentinas no ciclo

de luz e escuridão, demorando dias para o arrastamento completo em direção ao novo fuso horário (REID; ABBOTT, 2015).

No mundo moderno, a duração da exposição a estas pistas ambientais, como por exemplo, a exposição à luz durante a noite, é significativamente maior em relação aos nossos antepassados (RADETSKY et al., 2013). Por exemplo, indivíduos que trabalham em turnos e que, conseqüentemente, alternam o seu ciclo de luz e escuridão, apresentam um risco maior para desenvolver transtornos de humor e metabólicos (como obesidade e diabetes), doenças cardiovasculares, além de um aumento no risco no desenvolvimento de câncer de mama (ARENDR, 2010; KECKLUND; AXELSSON, 2016). Essa dessincronização do relógio biológico interrompe o ciclo sono e vigília levando o indivíduo a apresentar alterações fisiológicas e cognitivas, que podem ocasionar em conseqüências graves, e até mesmo fatais devido ao comprometimento do estado de alerta. De fato, diversas condições psiquiátricas, neurológicas e neurodegenerativas são caracterizadas pela perturbação do sono (KYRIACOU; HASTINGS, 2010).

2.1.1. Marcapasso central: o núcleo supraquiasmático

A informação sobre luminosidade do ambiente é transmitida e percebida pelo marcapasso central do relógio biológico, que em mamíferos está localizado no cérebro, mais precisamente no núcleo supraquiasmático (NSQ). Este núcleo bilateral, localizado no hipotálamo anterior acima do quiasma óptico (qo), apresenta aproximadamente 600 μ m de extensão longitudinal (em camundongos) e é composto por cerca de 20.000 neurônios que oscilam de maneira robusta conferindo a ele uma característica de marcapasso, com a função de controlar ritmos diários de diversas funções fisiológicas, como o sono e vigília, alimentação, homeostase de glicose, metabolismo lipídico, $T_{interna}$, ALE, produção e secreção de hormônios, divisão celular e reparo do DNA. Além disso, este núcleo tem a função de sincronizar o relógio biológico ao ciclo de luz e escuridão ambiental (ABRAHAMSON; MOORE, 2001;

ROENNEBERG; MERROW, 2005; ALBRECHT, 2012; RADETSKY et al., 2013; SCHNELL; ALBRECHT; SANDRELLI, 2014).

A descoberta da existência de um marcapasso central em mamíferos foi iniciada no ano de 1972 com experimentos de lesão no NSQ em ratos, os quais apresentaram perda dos comportamentos noturnos de atividade locomotora e ingestão hídrica, bem como perda na ritmicidade da secreção de corticosterona (MOORE; EICHLER, 1972; STEPHAN; ZUCKER, 1972). Da mesma maneira, experimentos de transplante do NSQ em animais lesionados restabeleciam o ritmo circadiano destes animais, sendo que o genótipo do período observado no receptor era aquele correspondente ao do doador (RALPH et al., 1990; ROENNEBERG; MERROW, 2005, SUJINO, 2003). Com base nesses e diversos outros trabalhos realizados não apenas em mamíferos, foi estabelecida a existência de um relógio central, que “orquestra” o funcionamento do relógio biológico.

Sabe-se atualmente que a informação sobre a luminosidade do ambiente é transmitida ao NSQ através do trato retino-hipotalâmico (TRH) (MOORE; LENN, 1972). Utilizando a técnica de autoradiografia com aminoácidos marcados, Moore e Lenn (1972) observaram que as projeções que tinham origem na retina, terminavam no NSQ. Dentre as células que dão origem aos axônios que trafegam pelo TRH, estão um conjunto de células denominadas células ganglionares da retina intrinsecamente fotossensíveis (ipRGCs). Estas células possuem a função de fornecer sinais de luz ao NSQ para a sincronização (ou arrastamento) do ritmo biológico através da luz, sem participar da formação de imagem. Além do NSQ, as ipRGCs também se projetam para outras regiões cerebrais como o núcleo pretectal olivar, núcleo geniculado lateral no tálamo (áreas relacionadas à respostas fóticas não formadoras de imagem, como o reflexo pupilar, por exemplo), habenula lateral, núcleo dorsal da rafe, hipotálamo lateral (área envolvida na homeostase energética), zona subparaventricular e núcleo pré óptico (áreas envolvidas na promoção e regulação do sono) (PANDA et al., 2003; MARKWELL; FEIGL; ZELE, 2010; ROECKLEIN et al., 2013; LI et al., 2015; SAKHI et al., 2016). Estas células expressam um único pigmento, a melanopsina, uma proteína do tipo opsina que compõe o quinto fotopigmento da retina, sendo os outros

quatro encontrados nos cones e bastonetes (HATTAR, 2002; PROVENCIO; ROLLAG; BAKUN, 2002; MARKWELL; FEIGL; ZELE, 2010; LEGATES et al., 2012).

Apenas uma pequena porção dos neurônios do NSQ recebe a informação fóptica que chega através do TRH, transmitindo tal informação para as células vizinhas através de sinais neuroquímicos e junções comunicantes, possibilitando manter a sincronização entre estas células e produzindo assim uma oscilação consistente dentro do núcleo (ALBRECHT, 2012; BOLLINGER; SCHIBLER, 2014). Cada neurônio do marcapasso oscila de maneira independente, sendo que cada célula autônoma apresenta uma gama de períodos circadianos que variam entre 22 e 30 horas. Esta propriedade é extremamente importante para a função do NSQ, pois confere a ele uma plasticidade que é fundamental. De forma simplificada, isso significa que o NSQ apresenta um mecanismo que facilite a sincronização do relógio biológico diante de mudanças no ciclo de luz ambiental, como um encurtamento ou aumento do fotoperíodo, troca do dia pela noite, ou um pulso de luz durante a noite subjetiva (MOHAWK; GREEN; TAKAHASHI, 2012).

Em relação às características morfológicas, o NSQ em várias espécies de mamíferos (incluindo roedores, humanos e macacos) é subdividido em região ventrolateral (VL) e dorsomedial (DM), que são distintas quanto à distribuição de neuropeptídeos e projeções aferentes (Figura 2). A região VL do NSQ é rica em neurônios que sintetizam polipeptídeo vasoativo intestinal (VIP) e recebe sinais visuais vindos de projeções diretas do TRH, recebendo informações sobre o ciclo de luz do ambiente; além de sinais visuais secundários vindos folheto intergeniculato do complexo geniculato lateral (IGL) por meio do trato geniculohipotalâmico (TGH). Além do VIP, os neurônios desta região sintetizam ácido gama-aminobutírico (GABA), calbidina (CALB), calretinina (CALR), peptídeo liberador de gastrina (GRP), e neurotensina (NT). Já a região DM do hipotálamo é rica principalmente em neurônios que sintetizam arginina-vasopressina (AVP), recebendo informações vindas de regiões do sistema límbico, hipotálamo e núcleos do tronco encefálico. Por não receber informações diretas da retina sobre o meio externo, a região DM apresenta uma ritmicidade endógena, sendo considerada importante para a

geração de ritmos de livre curso, e transmitindo informações de tempo para os tecidos periféricos através de sinais autonômicos e/ou hormonais (Figura 2). Dentre outros neuropeptídeos sintetizados pela região DM estão GABA, CALB, angiotensina II (All) e met-enkefalina (mENK) (ABRAHAMSON; MOORE, 2001; MILLER; MCAULEY; PANG, 2005; TAPIA-OSORIO et al., 2013).

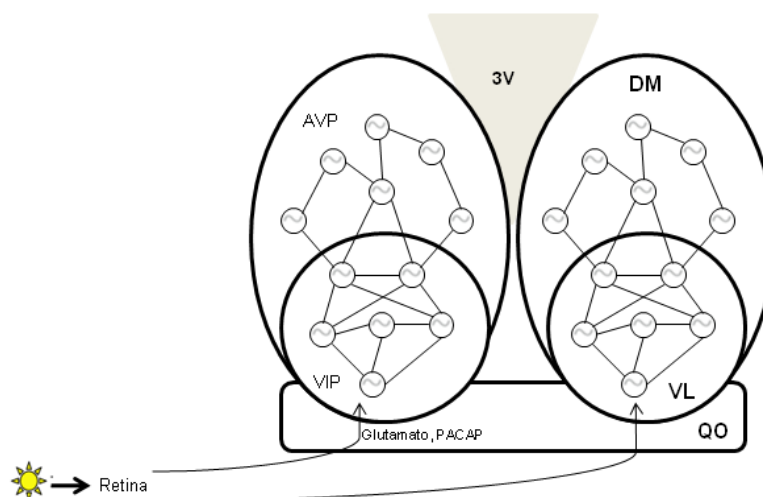


Figura 2: Representação esquemática das divisões morfofuncionais do NSQ. A imagem representa as delimitações das regiões VL e DM do NSQ, destacando os principais neuropeptídeos expressos pelos neurônios das duas regiões, AVP e VIP. A região VL recebe projeções vindas da retina, e, deste modo recebe informação sobre a fotoperiodicidade ambiental através do TRH, sendo glutamato (Glu) e o peptídeo hipofisário ativador de adenilato ciclase (PACAP) as moléculas envolvidas nessa transmissão. Os círculos na figura representam os neurônios do NSQ, que são sincronizados entre si através da transmissão VIPérgica, vasopressinérgica e gabaérgica. QO: quiasma óptico; 3V: 3º ventrículo. (Adaptado de Hafner; Koepl e Gonze, 2012)

A atividade dos neurônios do NSQ varia de maneira circadiana. Trabalhos mostram que a expressão de c-Fos, um membro da família de genes de expressão imediata amplamente utilizada como marcador de atividade neuronal, compreende um importante marcador para avaliar a atividade temporal do relógio central ou mesmo sua resposta frente à exposição à luz ou a outra pista ambiental. Em condições de escuridão constante, o NSQ de ratos exibe um ritmo espontâneo de expressão de c-Fos, apresentando uma atividade máxima no início da manhã e mínima durante a noite subjetiva. Além disso, nestas condições observa-se uma oscilação circadiana de atividade de

c-Fos na região DM, com níveis elevados no início do dia subjetivo; e, por outro lado, o pico de expressão de c-Fos na região VL é observado após estimulação fótica no meio da noite subjetiva (SUMOVÁ, 1998; SCHWARTZ et al., 2000; MILLER; MCAULEY; PANG, 2005). Schwartz et al. (1994) mostram que sob um ciclo de luz e escuridão de 12:12 h, ratos apresentaram uma expressão de c-Fos rítmica na região VL do NSQ, com pico no ZT (*zeitgeber*) 2 (duas horas após o início da fase de luz) e níveis mínimos de expressão de c-Fos) aproximadamente no ZT 14 (duas horas após o início da fase de escuridão). Estes resultados vão de acordo com o que se sabe sobre a recepção de informação fótica no NSQ. Entretanto, pouco se sabe a respeito de como outras pistas do relógio biológico podem sinalizar ou afetar a atividade do NSQ.

Embora esteja claro que o NSQ consiste no relógio central que controla os ritmos circadianos, certas proteínas, denominadas proteínas do relógio, já foram identificadas em vários tecidos, como em outras áreas cerebrais e tecidos periféricos como fígado, pulmão, rins e músculo esquelético, *in vitro* e *in vivo* (BALSALOBRE; DAMIOLA; SCHIBLER, 1998; YAMAZAKI, 2000). Portanto, cada célula do organismo apresenta osciladores circadianos periféricos, que são sincronizados com o relógio central por meio de sinais autonômicos e humorais (glicocorticóides, por exemplo), bem como pela temperatura corporal e alimentação (MOHAWK; GREEN; TAKAHASHI, 2012). Deste modo, os relógios periféricos são sincronizados pelo relógio central, e na ausência do NSQ, estas células apenas conseguem sustentar uma oscilação circadiana por alguns dias *in vivo* (REPPERT; WEAVER, 2002).

Portanto, de forma resumida e simplificada, o funcionamento do relógio biológico em mamíferos pode ser explicado da seguinte maneira: pistas ambientais fornecem informação sobre o tempo (sinais de entrada ou *zeitgebers* de primeira ordem) para o marcapasso central. Este, por sua vez, gera respostas rítmicas (sinais de saída) e fornece informações sobre o tempo para os relógios periféricos (ROENNEBERG; MERROW, 2005). Como resposta ao arraste do relógio biológico de acordo com o ciclo de luz e escuridão ambiental, indivíduos expressam seus sinais de saída de acordo com seus cronotipos, diurno (p. ex. humanos) ou noturno (p. ex. roedores), como aumento da ALE, T_{interna} , e alimentação na sua fase de alerta, e atenuação

destes parâmetros na fase de repouso, estes ritmos, por sua vez, podem funcionar como *zeitgebers* internos ou de segunda ordem, os quais potencializam a sincronia da fase circadiana (MISTLBERGER; ANTLE, 2011) (Figura 3).

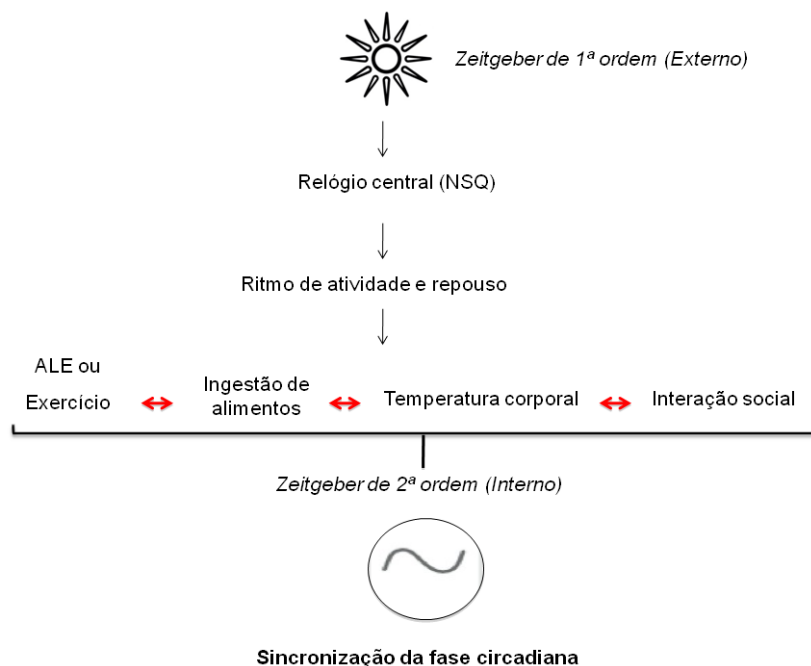


Figura 3: Esquema representativo que resume o funcionamento do relógio biológico. O sistema circadiano é sincronizado com o meio externo através de agentes de sincronização (*zeitgebers*), sendo a luz considerada o principal *zeitgeber* (ou *zeitgeber* de 1ª ordem). A informação sobre a fotoperiodicidade ambiental é transmitida ao relógio central (NSQ) pelo TRH, ditando, dessa forma os ritmos circadianos, sendo o ritmo de atividade e repouso o mais proeminente. A partir do ritmo de atividade e repouso são desencadeados os ritmos de ALE, T_{interna} , ingestão de alimentos e interação social, sendo estes considerados *zeitgebers* não-fóticos (ou *zeitgebers* de 2ª ordem) que participam da sincronização da fase circadiana do relógio biológico em mamíferos. (Adaptado de Husse; Eichele e Oster, 2015)

2.1.2. Maquinaria molecular do relógio biológico

A nível celular, o funcionamento do relógio biológico depende da expressão de determinadas proteínas, chamadas de proteínas do relógio (EDGAR; MCCLUNG, 2013). Essas proteínas são auto-reguladas por meio de alças de retroalimentação positiva e negativa que ocorrem em aproximadamente 24 horas, envolvendo principalmente os genes *Clock* (*Circadian Locomotor Output Cycles Kaput*), *Bmal1* (*Brain and muscle Arnt-like protein 1*), *Per1*, *Per2* (*Period*), *Cry1* e *Cry2* (*Cryptochrome*) (GOLOMBEK; ROSENSTEIN, 2010). A alça positiva consiste no heterodímero formado pelas proteínas CLOCK (e seu parólogo NPAS2) e BMAL1, dois ativadores transcricionais que se ligam à região E-box, localizada na região regulatória dos genes *Per1* e *Per2* e *Cry1* e *Cry2*. As consequentes proteínas CRY e PER, são transportadas do citoplasma para o núcleo, onde reprimem a sua própria transcrição pela inibição de CLOCK/BMAL1, formando a alça negativa (REPPERT; WEAVER, 2002; ALBRECHT; EICHELE, 2003; MOHAWK; GREEN; TAKAHASHI, 2012). Outra alça de retroalimentação interligada às alças principais, envolve a expressão do receptor órfão nuclear Rev-erba, o qual tem sua expressão ativada pela ligação de CLOCK/BMAL1 na sua região E-box. Este receptor, por sua vez, irá suprimir a transcrição de *Bmal1*, por meio da sua ligação no elemento de reposita no promotor de *Bmal1* (ALBRECHT; EICHELE, 2003; MOHAWK; GREEN; TAKAHASHI, 2012; GOLOMBEK; ROSENSTEIN, 2010).

CLOCK, BMAL1, PER1, PER2, CRY1 E CR2 são fosforiladas temporalmente *in vivo*, sendo a fosforilação máxima correlacionada ao tempo de retroalimentação negativa sobre a transcrição de *Per* e *Cry*. Envolvidas nesse processo estão as caseína quinase ϵ (CK ϵ) e caseína quinase δ (CK δ), sendo estas altamente homólogas (REPPERT; WEAVER, 2002). A CK ϵ fosforila PER1 e PER2, permitindo a rápida degradação dessas proteínas por proteossomas, evitando sua acumulação (OKAMURA; YAMAGUCHI; YAGITA, 2002; ALBRECHT; EICHELE, 2003). No núcleo celular, a proteína CRY se liga a PER impedindo a sua saída. Quando a concentração de PER se torna muito baixa devido à degradação, a retroalimentação negativa não é mais mantida e um novo ciclo se inicia. Dessa forma, a periodicidade de 24 horas do relógio

biológico resulta de uma combinação de retroalimentação transcricional positiva e negativa, de transporte citoplasma-núcleo; fosforilação e degradação de PER (ALBRECHT; EICHELE, 2003).

2.1.3. *Zeitgebers* não-fóticos

A alimentação e a temperatura corporal são variáveis rítmicas controladas pelo relógio central, entretanto, essas variáveis também possuem um papel na sincronização do relógio biológico, sendo consideradas *zeitgebers* não-fóticos (GOLOMBEK; ROSENSTEIN, 2010).

A alimentação possui um papel importante na sincronização dos relógios periféricos. Órgãos periféricos envolvidos no metabolismo energético, como fígado e pâncreas, por exemplo, apresentam variações rítmicas na liberação hormonal e/ou expressão de genes envolvidos no metabolismo e genes do relógio, que por sua vez são sincronizadas ao ritmo de alimentação/jejum. Portanto, a alimentação restrita a fase de repouso, induz arraste de fase dos genes do relógio em órgãos periféricos, sincronizando-os ao horário em que a alimentação é disponibilizada (MORAN-RAMOS et al., 2016). Além disso, esses animais também apresentam alterações no ciclo sono/vigília, na variação circadiana de hormônios e de temperatura, além de alterações metabólicas (MORAN-RAMOS et al., 2016; TAHARA; AOYAMA; SHIBATA, 2016). Desta forma, a alimentação possui o papel de sincronizar os relógios periféricos, tendo pouco ou nenhum efeito sobre o relógio central (MISTLBERGER; ANTLE, 2011; MORAN-RAMOS et al., 2016). Prova disso, a alimentação restrita a fase de repouso causa arraste na expressão dos genes de relógio no fígado, sem afetar o NSQ, gerando um desacoplamento entre os relógios periféricos e o relógio central (DAMIOLA et al., 2000).

Do mesmo modo, a temperatura corporal é considerada um *zeitgeber* para os relógios periféricos de animais homeotérmicos e poicilotérmicos (neste último caso, a temperatura ambiental). Em mamíferos, tanto a variação circadiana de temperatura corporal quanto do ambiente participam da

sincronização dos relógios periféricos, e da mesma maneira que a alimentação parece não afetar relógio central (BROWN et al., 2002; BUHR; YOO; TAKAHASHI, 2010).

Algumas das primeiras evidências de que a luz não era a única pista que contribui para o ajuste do relógio biológico, veio a partir de experimentos utilizando o benzodiazepínico triazolam. Foi observado um arraste de fase na ALE de hamsters após a administração desse ansiolítico, devido a um aumento na ALE, ao invés de sedação. Ao imobilizar os animais impedindo o uso da roda de atividade após a injeção da droga, este arraste de fase não foi observado, sugerindo que o aumento da ALE provocada pelo triazolam era a causa deste fenômeno (VAN REETH; TUREK, 1989). Portanto, a indução do estado de alerta durante a fase de repouso seria a causa da mudança na fase circadiana observada. Diversos tipos de estímulos podem provocar o estado de alerta em roedores, como uma novidade na gaiola, interação social com coespecíficos do sexo oposto ou do mesmo sexo, roda de atividade na caixa, e até mesmo a troca de gaiola do animal (MROSOVSKY, 1996; GOLOMBEK; ROSENSTEIN, 2010; MISTLBERGER; ANTLE, 2011).

O estímulo social em determinados horários do dia tem a capacidade de avançar ou atrasar o ritmo de ALE de hamsters (MROSOVSKY, 1988), embora não tenha sido observado o mesmo em ratos submetidos à interação social com machos dominante e fêmea no período de estro (MEERLO; DAAN, 1988). Espécies sociáveis (como morcegos, camundongos, e pássaros) utilizam a interação social com indivíduos coespecíficos ou de outras espécies para obter informações sobre o tempo quando submetidos à escuridão constante (LONE; SADANANDAPPA; SHARMA, 2011). Desta forma, a fisiologia e o comportamento de um indivíduo podem ser sincronizados aos ritmos de atividade de outros animais, sejam eles da mesma espécie ou não (MISTLBERGER; ANTLE, 2011).

2.2. INTERAÇÃO SOCIAL COMO PISTA DO RELÓGIO BIOLÓGICO

Na natureza, indivíduos precisam se adaptar aos ritmos de atividade de seus parceiros sexuais, familiares, presas e predadores com o objetivo de formar grupos, obterem sucesso reprodutivo e na procura de alimentos, e, conseqüentemente, para garantir sua sobrevivência (REGAL; CONNOLLY, 1980; MISTLBERGER; SKENE, 2004; FAVREAU et al., 2009; BLOCH et al., 2013). Deste modo, é possível imaginar que a interação social diária represente uma pista temporal do ambiente que contribui para a sincronização do relógio biológico.

O trabalho realizado por Mrosovsky (1987) se encontra entre os pioneiros a esse respeito, onde foi investigado o efeito da interação social como *zeitgeber* em determinados horários do dia. Hamsters isolados foram expostos a um coespecífico por 30 minutos na metade do dia e ao final da noite subjetiva e, como resposta, alguns animais apresentaram avanço e atraso de fase de ALE, respectivamente. Todavia, o autor sugere que este efeito possa ter ocorrido devido à estimulação do estado de alerta provocado pela interação social, semelhante ao que ocorre quando o animal é exposto à roda de atividade nestes mesmos horários, indicando que os mecanismos neurais desencadeados pela interação social ou pela roda de atividade sejam comuns e incluem o aumento do estado de alerta (REEBS; MROSOVSKY, 1989).

Desse modo, uma das maneiras de entendermos a pista social diária é como resultante do período de atividade do animal, sendo este por sua vez, determinado pelos ciclos de luz e escuridão. Esta seria uma forma de interpretar a interação social como um segundo *zeitgeber*, ou um sincronizador endógeno (HUSSE et al., 2015).

É possível observar exemplos claros da importância da interação social sobre o relógio biológico em mamíferos altriciais, nos quais a interação entre mãe e filhote é essencial para a manutenção da sincronização da cria com o ambiente. Já foi demonstrado em diferentes espécies de roedores que o ciclo de presença e ausência da mãe é essencial para sincronizar o ciclo sono e vigília dos filhotes durante os primeiros dias de vida, uma vez que eles ainda

não possuem a capacidade de perceber a presença de luz do ambiente (VISWANATHAN; CHANDRASHEKARAN, 1985; DAVIS; GORSKI, 1985; VISWANATHAN, 1999). Prova disso, quando ratas prenhas foram submetidas à lesão no NSQ foi observada uma perturbação do ritmo de utilização de glicose pelo NSQ dos fetos, bem como no ritmo de atividade da enzima N-acetiltransferase na glândula pineal de filhotes, enfatizando a importância da mãe para a sincronização e desenvolvimento do sistema circadiano dos filhotes, tanto pré e pós-natal (REPPERT; SCHWARTZ, 1986). Em humanos recém nascidos, durante as primeiras semanas de vida, o ritmo de atividade materno também parece ser importante para moldar e/ou aprimorar o ciclo sono e vigília dos infantes (TSAI et al., 2011; THOMAS; BURR; SPIEKER, 2016).

Além do contato materno, existem evidências de que a pista social pode ser importante, e, até mesmo essencial, para sincronizar grupos de animais que não possuem referências luminosas do ambiente externo. Marimuthu, Rajan, e Chandrashekar (1981) mostraram que morcegos da espécie *Hipposideros speoris* mantidos com seus coespecíficos em cavernas completamente escuras, exibiram um ritmo de atividade e repouso marcante com um período próximo de 24 horas, mesmo quando mantidos em gaiolas próximas à caverna habitada. Entretanto, quando um morcego foi mantido isolado em outra caverna, observaram-se ritmos de livre curso de vôo do animal com um período <24 horas, sugerindo assim que a pista social para estes animais contribui de maneira importante para o ritmo de atividade e repouso (FAVREAU et al., 2009; MARIMUTHU; RAJAN; CHANDRASHEKARAN, 1981).

Outro exemplo de uma possível sincronização grupal foi observado em castores da espécie *Castor canadensis*. Durante os meses de inverno quando esses animais se alojam em suas tocas cobertas pela neve, um ritmo de atividade de livre curso do grupo foi observado, sugerindo um acoplamento entre os ritmos endógenos de cada indivíduo, causando um arraste grupal (BOVET; OERTLI, 1974; MISTLBERGER; SKENE, 2004; FAVREAU et al., 2009). Além disso, em condições experimentais de laboratório sob ciclos de iluminação ou escuridão constante, foi observado que peixes da espécie *Fundulus heteroclitus* apresentaram uma sincronização mútua do ritmo de

atividade e no comprimento do período quando o cardume foi composto por vinte e cinco peixes, o que não foi observado em grupos de cinco animais (FAVREAU et al., 2009; KAVALIERS, 1980). Deste modo, é possível que a formação de grupos de coespecíficos facilite, ou até mesmo seja um fator fundamental para a sincronização entre os indivíduos em diferentes espécies, contribuindo para a sobrevivência e sucesso evolutivo.

Especificamente em roedores, o efeito da pista social sobre o ritmo circadiano já foi analisado, e as respostas observadas variaram entre espécies (rato, camundongos, hamsters, etc), linhagens, hierarquia dentro do grupo, dentre outros fatores (MISTLBERGER E SKENE, 2004). Por exemplo, camundongos dominantes e subordinados da espécie *Peromyscus maniculatu* mantidos em isolamento apresentaram um ritmo circadiano de atividade, mas quando colocados em contato entre si, foi observada uma sincronização mútua no ritmo de atividade desses animais, sugerindo que, possivelmente, o animal dominante influenciou no ritmo de atividade do subordinado (CROWLEY et al., 1980). Por outro lado, hamsters da espécie *Mesocricetus auratus* não sofrem qualquer alteração no ritmo de atividade e repouso quando expostos a um coespecífico do sexo oposto (DAVIS; STICE; MENAKER, 1987), resultado semelhante ao observado em ratos expostos à interação social com uma fêmea e um macho dominante durante a metade do dia subjetivo, onde não foi observada mudança de fase de temperatura e no período em condições de escuridão constante (MEERLO; DAAN, 1998).

Existem fortes evidências de que não apenas o contato social influencie na sincronização do relógio em roedores, mas o estímulo olfatório também foi explorado nesse sentido. No roedor diurno *Octodon degus*, o estímulo olfatório a partir de coespecíficos acelera o arraste do ritmo de atividade após avanço e atraso de fase no ciclo de luz e escuridão (JECHURA; STIMPSON; LEE, 2006; GOVERNALE; LEE, 2001), prova disso, esse efeito é perdido nesses animais quando o bulbo olfatório é cirurgicamente removido (GOEL; LEE, 1997).

Em seres humanos a importância da interação social como pista do relógio biológico também foi avaliada e, por um tempo, acreditava-se que ela compreendia o principal estímulo ambiental para a sincronização dos ritmos

biológicos (ASCHOFF et al., 1971; MISTLBERGER; SKENE, 2004). Posteriormente, surgiram evidências de que o relógio biológico de seres humanos também é sensível a estímulos luminosos, destacando a luz como principal *zeitgeber*, e colocando a pista social na posição de um *zeitgeber* secundário (SACK et al., 1992; DUFFY; KRONAUER; CZEISLER, 1996; MISTLBERGER; SKENE, 2004; LIEVERSE et al., 2013). Entretanto, em distúrbios psicológicos como depressão e transtorno bipolar, em que se observam alterações psicossociais, bem como nos ritmos biológicos, a manutenção de uma rotina social diária (como refeições, encontros pessoais, exercícios, trabalho, escola, dentre outros; considerados *zeitgebers* sociais) parece ser de grande importância para diminuir a ocorrência de episódios maníacos e sintomas depressivos, bem como para regular os ritmos biológicos muitas vezes afetados em tais distúrbios, como por exemplo, o ritmo de sono e vigília (EHLERS; FRANK; KUPFER, 1988; FRANK; SWARTZ; KUPFER, 2000; GRANDIN; ALLOY; ABRAMSON, 2006; SHEN et al. 2008; SYLVIA et al. 2009; LEVENSON et al., 2015). Por outro lado, Stetler, Dickerson e Miller (2004) observaram em seu estudo que pacientes depressivos, embora tivessem apresentado rotinas diárias regulares (ou seja, manutenção da exposição aos *zeitgebers* sociais), apresentaram um desacoplamento entre essas atividades e a variação nos níveis de cortisol salivar, indicando que, possivelmente, o *zeitgeber* social em pacientes depressivos seja menos efetivo em sincronizar os ritmos biológicos, aqui representados pelo cortisol. Entretanto, o mais curioso neste estudo é que no grupo composto por indivíduos saudáveis houve uma relação entre as atividades diárias regulares e o declínio esperado dos níveis de cortisol ao longo do dia, contudo, esse efeito foi significativamente maior quando as atividades regulares foram realizadas juntamente com outras pessoas (STETLER; DICKERSON; MILLER, 2004; GRANDIN; ALLOY; ABRAMSON, 2006), destacando, desse modo, a importância do contato social sobre os ritmos biológicos de pessoas saudáveis. Tais evidências apontam que as pistas sociais influenciam o relógio biológico em humanos, compreendendo um fator importante não só para a saúde mental, mas também para parâmetros fisiológicos e comportamentais relacionados ao relógio.

Portanto, devido à complexidade das respostas observadas nos diferentes tipos de interações sociais já investigadas, ainda não está estabelecido quais mecanismos estariam envolvidos na influência da pista social sobre o relógio biológico (MISTLBERGER; SKENE, 2004; FAVREAU et al., 2009). No entanto, o modelo heurístico proposto por Mistlberger e Skene (2004) a respeito de como pistas ambientais (sendo a luz a dominante) podem influenciar no comportamento temporal de mamíferos, traz a luz possíveis mecanismos pelo qual o estímulo social pode operar sobre o relógio (Figura 4). Segundo este modelo, o estímulo social poderia influenciar na programação comportamental circadiana de três maneiras: 1) de forma indireta, determinando o estado comportamental do indivíduo, e, conseqüentemente, controlando sua exposição à luz ambiente e possivelmente modulando sinais fóticos à retina e NSQ; 2) se comunicando diretamente ao NSQ ou regiões cerebrais subjacentes envolvidas na estimulação não fótica (por ex. rafe mediana e IGL) ou por meio de vias sensoriais ou vias envolvidas no estado comportamental (alerta, locomoção, estresse, etc.); e 3) através de processos de aprendizagem e memória, utilizando o tempo circadiano como um estímulo discriminatório ou condicionado.

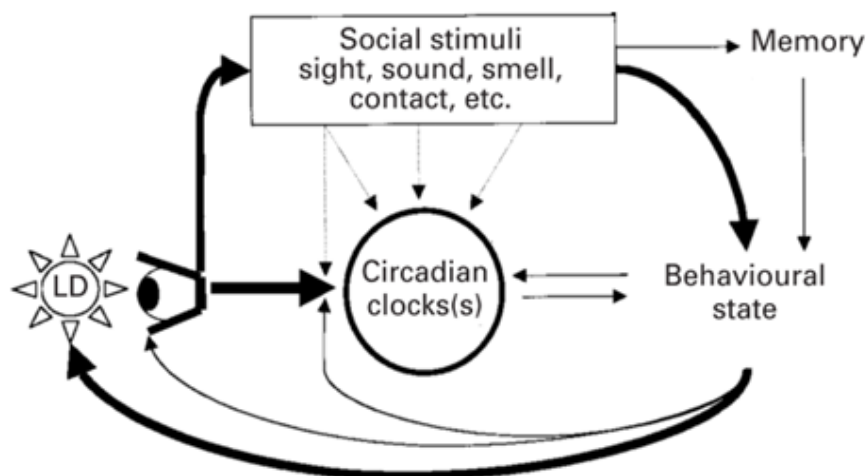


Figura 4: Modelo heurístico proposto por Mistlberger e Skene (2004) sobre possíveis mecanismos pelas quais a pista social pode participar da sincronização do relógio biológico. (Adaptado de Mistlberger e Sakene (2014).

Diante do exposto, embora a capacidade de zeitgeber não fóticos tais como o horário da alimentação e hormônios esteja mais esbapecido na literatura, não está claro se o estímulo social é um fator importante que potencializa o efeito da luz sobre o arraste do relógio biológico ou se ele pode atuar de maneira independente.

2.2.1. Isolamento social e ritmo circadiano

Um modo de avaliar a importância da interação social sobre a sincronização do relógio biológico seria através da privação do contato social, ou isolamento social. Entretanto, pouco se sabe sobre os efeitos do isolamento sobre o ritmo circadiano de roedores. Existem evidências na literatura de que o isolamento social em roedores e primatas seja capaz de induzir alterações no ritmo circadiano a nível neuroquímico e hormonal (GRECO et al., 1989, 1990, 1992; LEVINE, 1995; SAYEGH et al., 1990; PERRELO et al., 2006; LYONS; HÁ).

Por outro lado, o impacto do isolamento social em roedores acerca de parâmetros comportamentais é amplamente descrito na literatura. Dentre as alterações comportamentais observadas está o fenótipo tipo depressivo e ansioso (GRIPPO et al., 2007; ZHANG et al., 2012; IERACI; MALLEI; POPOLI, 2016), aumento na agressividade (GRECO et al., 1989; MA et al., 2011) bem como prejuízos na memória de reconhecimento social (SHAHAR-GOLD; GUR; WAGNER, 2013; LESER; WAGNER, 2015) e na neurogênese no hipocampo, bulbo olfatório e regiões límbicas (LIEBERWIRTH et al., 2012; MONTEIRO; MOREIRA; MASSENSINI, 2014; CHAN et al., 2017). Além disso, assim como outros protocolos que induzem estresse e, conseqüentemente, alterações dos comportamentos relacionados ao humor (RYGULAA et al., 2005), o isolamento social pode levar a uma diminuição no ganho de peso, além de alterações na variação circadiana de hormônios envolvidos no metabolismo energético e saciedade (VÖIKAR et al., 2005; PERELLÓ et al., 2006).

Outros tipos de estresses psicossociais, como o protocolo de derrota social ou teste residente-intruso, o qual consiste em conflitos sociais entre membros

da mesma espécie (HOLLIS; KABBAJ, 2014), provocam além de mudanças comportamentais relacionadas ao humor, alterações em parâmetros importantes do ritmo circadiano em roedores, tais como a ALE e a $T_{interna}$ (MEERLO et al., 1996, 1997; MEERLO; SGOIFO; TUREK, 2002). No entanto, até o momento, não foram investigados os efeitos do isolamento social sobre esses parâmetros marcantes controlados pelo relógio central.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar o impacto da perda da interação social, através do protocolo de isolamento social, sobre o funcionamento do relógio biológico de camundongos C57Bl/6J.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do isolamento social sobre o comportamento tipo-depressivo e tipo-ansioso;
- Avaliar o efeito do isolamento social sobre o ganho de peso;
- Avaliar o efeito do isolamento social sobre a variação circadiana de ALE e T_{interna} ;
- Avaliar o efeito do isolamento social sobre a atividade temporal dos neurônios NSQ;
- Avaliar o efeito do isolamento social sobre o mecanismo de arraste dos ritmos de ALE e T_{interna} após o protocolo de *Jet lag*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados camundongos machos C57Bl/6J, com aproximadamente 7-8 semanas de idade, provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os animais foram mantidos em ambientes aclimatados, com ciclo de luz e escuridão de 12:12 horas e temperatura ambiente de aproximadamente 25°C, com ração e água *ad libitum*. Os procedimentos experimentais realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA/UFMG), protocolo de número 12/2015. Ao final de cada delineamento experimental, os animais foram sacrificados por decapitação, com exceção do delineamento onde os animais foram perfundidos transcardialmente, quando a eutanásia ocorreu por meio de sobredosagem de anestésicos. Os procedimentos realizados durante a fase de escuridão foram realizados sob luz vermelha (intensidade <1 lux).

Após uma semana de habituação ao local de experimentação, os animais foram aleatoriamente divididos em dois grupos: 1) Agrupado ou grupo controle, os quais permaneceram ao longo de todo protocolo acondicionados em grupos de 3 a 4 animais/caixa; e 2) Isolado, os quais foram alojados individualmente ao longo do protocolo, privados de contato tátil com coespecíficos, mas com experiências olfatórias; visuais e auditivas normais. Os animais de ambos os grupos foram acomodados em caixas padrão de polipropileno com 41x34x16 cm³ de dimensão. Foi utilizado um protocolo de 4 semanas de isolamento e/ou agrupamento social, segundo descrito por Ieraci, Mallei e Popoli, 2016.

4.2. Delineamento experimental

4.2.1. Experimento 1: Efeito do isolamento social sobre os comportamentos tipo depressivo e ansioso e sobre o ganho de peso

O objetivo deste experimento foi avaliar se o isolamento social foi eficiente em induzir alterações comportamentais relacionadas ao humor, bem como mudanças no ganho de peso. Para tal, os animais foram submetidos ao teste de preferência à sacarose (TPS), labirinto em cruz elevado (LCE) e teste do nado forçado (TNF). Para avaliação do ganho de peso, os animais foram pesados duas vezes por semana em horários aleatórios.

A habituação às garrafinhas do TPS foi realizada 24 horas antes do início do teste, no 28º dia de isolamento ou agrupamento. Durante o teste, os animais do grupo controle permaneceram três dias isolados para possibilitar a medida do consumo de sacarose, e após o teste eles foram reagrupados em suas respectivas caixas. Após um dia, os animais foram submetidos ao teste do LCE (Figura 5). Outro grupo experimental foi submetido ao TNF ao final do protocolo (29º dia) (Figura 6). Não foram utilizados os mesmos animais para todos os testes comportamentais para evitar um efeito do estresse da manipulação e do LCE sobre o TNF, que por si só é considerado um teste comportamental estressante para o animal.

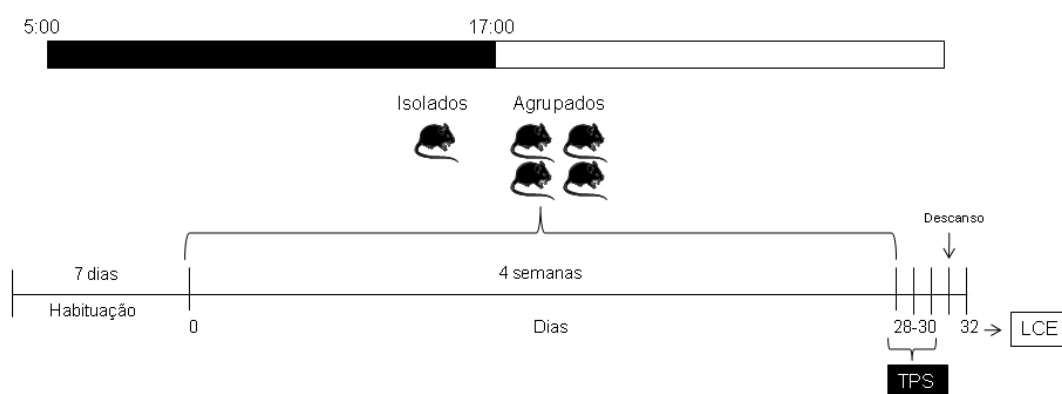


Figura 5: Representação esquemática do protocolo de avaliação dos comportamentos tipo anedônico e ansioso, através do TPS e LCE, respectivamente. Os animais deste grupo foram mantidos em ciclo invertido e pesados 2 vezes por semana ao longo do protocolo. O TPS foi realizado durante a fase de escuridão e o LCE durante o início da fase de luz.

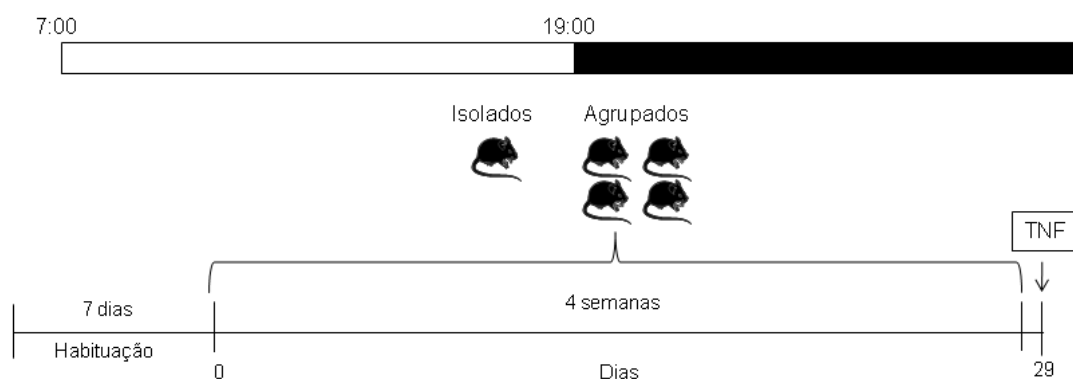


Figura 6: Representação esquemática do protocolo de avaliação do comportamento de desamparo aprendido, através do TNF. O experimento foi realizado no início da fase de luz.

4.2.2. Experimento 2: Efeito do isolamento social sobre a variação circadiana de ALE e T_{interna}

O objetivo deste experimento foi avaliar o efeito da perda da interação social sobre a variação circadiana e sobre os parâmetros de *onset*, *offset*, acrofase, e amplitude de ALE e T_{interna} . Os animais foram acondicionados em uma sala com ciclo de luz invertido (12:12 horas), onde a luz foi ascendida às 17:00 horas e apagada às 5:00 horas. Isso foi feito com o objetivo da fase de repouso destes animais ocorrer durante um horário em que não houvesse movimentação no laboratório. Após uma semana de adaptação ao ciclo invertido, os animais foram aleatoriamente divididos em grupo Agrupado ou Isolado ($n = 5-6$). No 15º dia de isolamento ou agrupamento, os animais foram submetidos à cirurgia de implantação do sensor de telemetria. No grupo controle, um animal por caixa foi escolhido para receber o implante e permaneceram isolados por 2 dias para melhor recuperação pós operatória, após este período os animais retornaram para suas respectivas caixas, e os registros de ALE e T_{interna} foram iniciados (Figura 7).

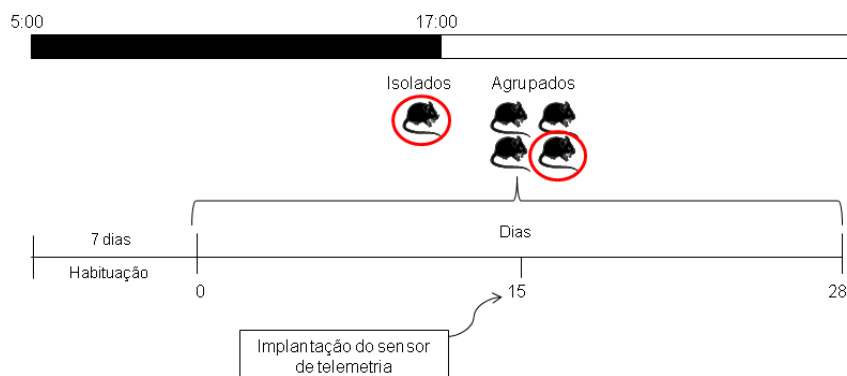


Figura 7: Representação esquemática do protocolo de registro de ALE e T_{interna} de camundongos mantidos agrupados e isolados. As barras acima representam as fases do ciclo de luz e escuridão. Os círculos vermelhos representam os animais de cada grupo que foram implantados com o sensor para registros de telemetria.

4.2.3. Experimento 3: Efeito do isolamento social sobre a atividade temporal neuronal do NSQ.

O objetivo deste experimento foi avaliar o efeito da perda da interação social sobre as mudanças temporais de atividade dos neurônios do NSQ. Para isso, os animais foram perfundidos transcardialmente no 28º e 29º dias de isolamento ou agrupamento ($n = 10$), às 9:00 horas (ZT2) e 21:00 horas (ZT14), para posterior análise imunohistoquímica da expressão da proteína c-Fos no NSQ (Figura 8).



Figura 8: Representação esquemática do protocolo de isolamento social seguido de perfusão transcardíaca, para avaliação da atividade temporal do NSQ.

4.2.4. Experimento 4: Efeito do Isolamento social sobre a resposta de foto-arrastamento induzido por protocolo de *Jet lag*

O objetivo deste experimento foi avaliar se a perda da interação social afeta a resposta de foto-arrastamento após uma alteração no ciclo de luz. Os animais submetidos ao experimento descrito no item 4.2.2 foram utilizados neste experimento. Deste modo, no 29º dia de isolamento ou agrupamento os animais foram submetidos a um avanço de fase de 6 horas no ciclo de luz durante sete dias, no qual as luzes passaram a ascender às 11:00 horas e apagar às 23:00 horas. No 36º dia, os animais foram submetidos a um atraso de fase durante sete dias, no qual as luzes voltaram a ascender às 17:00 horas e apagar às 5:00 horas. No 43º dia, os registros foram interrompidos e colhidos para posterior análise dos parâmetros do ritmo circadiano.

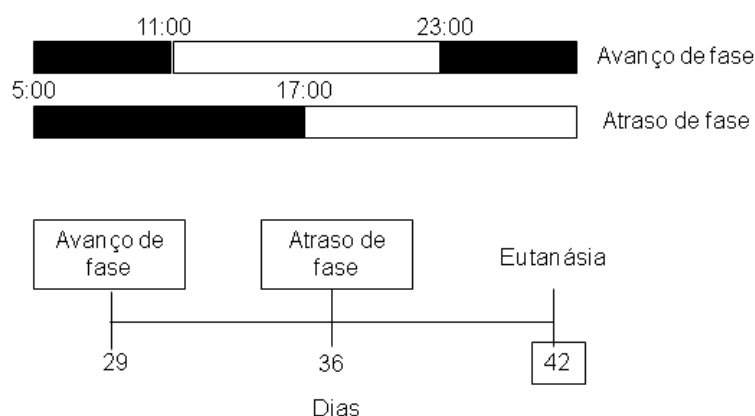


Figura 9: Representação esquemática do protocolo de *Jet lag* para avaliação da resposta de foto-arrastamento de animais Agrupados e Isolados. As barras acima representam os novos horários de início da fase de luz e da fase de escuridão durante os períodos de avanço e atraso de fase, os quais perduraram por 7 dias cada.

4.3. Implantação do sensor de telemetria e registro da T_{interna} e ALE

No 15º dia do protocolo de isolamento ou agrupamento, os animais foram implantados com o sensor de telemetria para registro da variação circadiana de temperatura interna (T_{interna}) e a atividade locomotora (ALE),

utilizando o programa de processamento e armazenamento de dados, Vital View Software (VitalView® Data Acquisition System, Software version 4.0). 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.) e cada animal recebeu um sensor de telemetria (modelo G2 E-Mitter, Mini-Mitter Company, Sun River, OR, USA) na cavidade peritoneal. Foi realizada uma incisão na região ventral de aproximadamente 1 cm, e posteriormente foi feita uma incisão na linha Alba do músculo reto abdominal, onde o sensor foi introduzido e fixado junto a parede interna do músculo. Os animais foram administrados com o antibiótico cefalexina (34 mg/kg, via oral), 12 horas antes da cirurgia, imediatamente após e 12 horas após o procedimento. Ao término da cirurgia, também foi administrada uma injeção s.c. do analgésico antiinflamatório (Banamine®, 50 mg/ml, Schering-Plough) na dose de 1 mg/kg de peso corporal.

Cada caixa contendo o animal implantado com o sensor foi posicionada sobre uma placa 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. Apenas um animal de cada caixa correspondente ao grupo controle foi implantado com o sensor de telemetria. Entretanto, após a cirurgia estes animais foram mantidos sozinhos em caixas individuais para uma melhor recuperação pós-cirúrgica. Após dois dias de recuperação, os animais foram acondicionados novamente em suas respectivas caixas juntamente com seus coespecíficos, permanecendo assim até o fim do experimento. Os registros da T_{interna} e da ALE foram iniciados assim que os animais foram colocados sobre os receptores. O movimento total do animal é registrado a cada segundo gerando um valor de unidade arbitrária que representa a ALE. A T_{interna} é registrada a partir de um termistor, cuja frequência está calibrada para detectar variações de temperatura da ordem de $0,1^{\circ}\text{C}$, sendo que aproximadamente 800 Hz indicam 37°C . Da mesma maneira, estas frequências são registradas a cada segundo gerando um valor de frequência que é convertido em temperatura pela fórmula: $\ln(F) = \beta + \alpha T$.

4.4. Testes comportamentais

4.4.1. Teste de preferência à sacarose

O TPS foi conduzido conforme descrito por LeGates (2012). O teste tem como premissa que um menor consumo de sacarose é indicativo de comportamento tipo anedônico, ou seja, de uma perda e/ou atenuação da sensibilidade à recompensa (PAPPET et al, 1991).

Um dia antes do teste os animais foram habituados a duas garrafinhas contendo apenas água, e nos próximos dois dias, a preferência à sacarose foi avaliada. No início da fase de escuridão, os animais foram expostos a uma garrafa contendo uma solução de 1% de sacarose e outra contendo água. Seis horas após o início do teste, as garrafas foram alternadas. Ao final da fase de escuridão, as garrafas foram retiradas, e no dia seguinte o mesmo protocolo descrito anteriormente foi repetido. As garrafas foram pesadas no início e no fim da fase de escuridão a cada dia. Ao longo do teste os animais tiveram livre acesso à ração. A preferência à sacarose sobre a água, ou seja, o consumo de sacarose dividido pela soma do total de água acrescido pelo consumo de sacarose $[\text{sacarose}/(\text{sacarose}+\text{água})]$, foi utilizado como medida para a sensibilidade à recompensa.

4.4.2. Teste do nado forçado

O TNF foi conduzido conforme descrito por LeGates (2012), com algumas modificações. Os animais foram individualmente colocados em um cilindro de vidro (17 cm de diâmetro x 27 cm de altura) contendo água à aproximadamente 25° C, durante 6 minutos, no início da fase de luz. O teste foi registrado com uma câmera de vídeo para posterior análise da latência e tempo de imobilidade de cada animal.

A premissa desse teste é de que o comportamento tipo depressivo é mensurado pelo tempo de imobilidade e pela latência para o primeiro episódio

de imobilidade ao longo do teste. Deste modo, um maior tempo de imobilidade e uma menor latência, são indicativos de comportamento tipo depressivo (PORSOLT et al, 1990).

4.4.3. Labirinto em cruz elevado

O LCE foi conduzido conforme descrito por Lister (1987). O teste tem como premissa que o animal tende a explorar menos os braços abertos quando apresentam um comportamento tipo ansioso (LISTER, 1987; PELLOW et al., 1985).

O aparato consiste em dois braços abertos e dois braços fechados opostos, elevados a 45 cm do nível do chão. Os braços abertos apresentam uma barra lateral de 0,25 cm como proteção, evitando a queda dos animais. Os animais foram colocados individualmente no centro do labirinto com a cabeça voltada para um dos braços abertos e seu comportamento avaliado durante 5 minutos, no início da fase de luz. O teste foi registrado com uma câmera de vídeo posicionada acima do labirinto para posterior análise do tempo de permanência no braço fechado e no braço aberto. Foi considerado que o animal estava em determinado braço quando as 4 patas se encontravam no braço correspondente.

4.5. Perfusão transcardíaca e preparação dos cérebros para imunohistoquímica

Após 4 semanas de agrupamento e isolamento, os animais foram anestesiados i.p. com uma sobredosagem de solução anestésica (ketamina (80 mg/kg) e xilasina (16 mg/kg), e perfundidos com 20 ml de tampão fosfato salina (PBS) 0,01M, e em seguida, com 20 ml de paraformaldeído (PFA) 4% através de um sistema de perfusão. O procedimento ocorreu às 9:00 (ZT2) ou 21:00 (ZT14), horários em que ocorrem o pico e o nadir de atividade dos neurônios

do NSQ (MILLER; MCAULEY; PANG, 2005; SCHWARTZ et al., 1994). Após a perfusão, os cérebros foram removidos e imediatamente pós-fixados em PFA 4% por aproximadamente 4 horas à 4°C. Em seguida, foram armazenados em solução de sacarose 30% até a saturação, o que ocorre em aproximadamente 48 horas. Após a saturação, os cérebros foram congelados, mantidos por 1 minuto a -45°C em isopentano 99%, e imediatamente armazenados a -80°C até serem fatiados.

Os cérebros foram fatiados em três séries de secções coronais de 40 µm com um criostato mantido a -20°C. Foram adquiridas 3 séries da extensão rostrocaudal do NSQ de acordo com o Atlas de Paxinos e Franklin (1997). As fatias foram mantidas em solução crioprotetora (PBS, sacarose 30%, etilenoglicol 30%, PVP 1%) até serem utilizadas para imunohistoquímica.

4.6. Imunohistoquímica para c-Fos

Para a técnica de marcação do c-Fos foi utilizado o método *free-floating*. Entre todas as etapas, as fatias foram lavadas em PBS 0,01M. Para remoção da solução crioprotetora, as fatias foram inicialmente lavadas 10 vezes por 6 minutos. As fatias foram lavadas com glicina 0,1M com a finalidade de expor os sítios antigênicos que podem ser mascarados pela fixação com PFA 4%, e, em seguida, incubadas em Triton X-100 (TX-100) 0,4% para permeabilização da membrana celular facilitando a posterior difusão dos anticorpos. A fim de bloquear peroxidases endógenas do tecido, as fatias foram incubadas em H₂O₂ 1%, e posteriormente incubadas com albumina bovina (BSA 3%) para reduzir ligações inespecíficas dos anticorpos primário e secundário. As etapas descritas até o momento foram realizadas à temperatura ambiente. Finalmente, as fatias foram incubadas com o anticorpo anti-cFos (1:3000, Santa Cruz Biotechnology, sc-253 anticorpo policlonal produzido em coelho) por aproximadamente 48 horas à 4°C, e após a lavagem com PBS, incubadas com anticorpo secundário (1:2000, biotinilado anti-coelho, anti-IgG, Vector Laboratories) por 2 horas em temperatura ambiente. Os anticorpos foram diluídos em solução contendo TX-100 0,3% e BSA1%.

Após a incubação com os anticorpos, as fatias foram lavadas e posteriormente incubadas em avidina-biotina peroxidase (1:500 em PBS, Vector Laboratories) durante 1 hora em temperatura ambiente. A marcação das fatias foi revelada com solução contendo 3'diaminobenzidina-HCl (DAB, 0,2 mg/mL; Sigma-Aldrich), sulfato de níquel (Ni, 25 mg/mL) e H₂O₂ 0,083 µL/mL de solução de H₂O₂ 30%) em Tris-HCl 0,05 M (pH 7,6), deixadas em imersão por aproximadamente 10 minutos. Após a revelação, as fatias foram posicionadas em lâminas gelatinizadas, permitidas secarem ao ar ambiente, desidratados em álcool e xilol, e em seguida cobertas com lamínulas e fixadas com entellan (Merck).

4.7. Obtenção das imagens e contagem de células

Para quantificar o número de neurônios imunorreativos para c-Fos, foram utilizadas aproximadamente 5 secções coronais por animal referente às porções anterior, medial e posterior do NSQ, correspondente à distância de -0,22 a -0,82 do bregma (PAXINOS; FRANKLIN, 1997). Foi utilizada a objetiva de 10x e 20x para obtenção das fotomicrografias bilaterais do NSQ no microscópio óptico. Os neurônios imunorreativos para c-Fos foram contados manualmente com o uso do software *ImageJ*, sem conhecimento prévio do grupo experimental analisado. Foram consideradas células imunorreativas aquelas apresentando o núcleo corado em preto. O número de células positivas para c-Fos foi normalizado pelo número de secções por animal.

4.8. Análise estatística

Para confecção dos gráficos e análises estatísticas, foi utilizado o programa GraphPrism 6 (San Diego, CA, EUA). Para a confecção dos gráficos polares, foi utilizado o programa Sigma Plot versão 11.0 (San Jose, CA, EUA). O intervalo de confiança foi de 0,05.

Para analisar o efeito do isolamento social sobre os comportamentos tipo depressivo e tipo ansioso, sobre o *onset*, *offset*, acrofase e amplitude de ALE e T_{interna} , sobre ganho de peso total, sobre a média total de ALE e T_{interna} na fase de luz e de escuridão, bem como sobre o mapa de fase de ALE e T_{interna} , foi utilizado o teste *t-Student* não pareado. A análise de variância de duas vias seguido do teste de *Bonferroni* foi utilizada para a análise da expressão de c-fos no NSQ, delta do ganho de peso, variação circadiana de ALE e T_{interna} , bem como para analisar o tempo de arraste entre grupo agrupado e isolado. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. A análise da distribuição do *onset*, *offset*, e acrofase foram realizadas pelo teste z de Rayleigh, o qual avalia o grau de dispersão da amostra.

Os actogramas e valores de *onset*, *offset*, acrofase e amplitude foram adquiridas a partir do *software* ClockLab (*Actimetrics*, IL, USA), utilizando um arquivo derivado dos registros de telemetria de ALE e T_{interna} de cada animal do programa de processamentos e armazenamento de dados Vital View (item 4.3). Os registros foram agrupados em blocos de 2, plotados numa resolução de 30 pontos por hora. Os actogramas foram construídos com a finalidade de analisar os padrões rítmicos de ALE e T_{interna} . O programa utiliza o teste estatístico Periodograma Qui-quadrado descrito por Sokolove e Bushell (1978) para calcular o período do ritmo. Os valores de amplitude de ALE e T_{interna} foram calculados como a diferença entre os valores máximos (acrofase) e mínimos (nadir) encontrados no periodograma. A partir do programa Vital View também foram extraídas planilhas contendo os valores de ALE e T_{interna} registradas a cada segundo para confecção dos gráficos de variação circadiana de ALE e T_{interna} e média total de ALE e T_{interna} na fase de luz a fase de escuridão.

Para calcular os horários de *onset* e *offset*, o programa combina o padrão de atividade a um modelo de 6 horas de inatividade seguido de 6 horas de alta atividade (para *onset*, e o contrário para *offset*). Em outras palavras, é determinado o limiar de registro considerado atividade ou repouso, sendo este limiar traçado de acordo com o nível de registro do percentil 20 (registros que

excederam exatamente em 20% do total). Este registro de limiar de atividade é então comparado ao modelo padrão de 6h/6h. Os dados obtidos em formato de horas foram convertidos em minutos, e em seguida em ângulo e média angular através de um *script* desenvolvido para o programa MATLAB (MathWorks, Natick, MA, USA) para a confecção dos gráficos polares e gráficos de *onset*, *offset*, e acrofase. Para a confecção dos gráficos polares foi utilizada a média angular do *onset*, *offset* e acrofase de cada dia de registro.

5. RESULTADOS

5.1. Efeito do isolamento social sobre comportamentos relacionados ao humor e sobre o ganho de peso

A permanência de roedores isolados de seus coespecíficos pode levar a comportamentos relacionados ao humor (KWAK; LEE; KAANG, 2009; TAKATSU-COLEMAN et al., 2013; IERACI; MALLEI; POPOLI, 2016). Dessa forma, a primeira etapa do estudo consistiu em validar um protocolo de isolamento social que induzisse alterações comportamentais. O isolamento social de camundongos por 4 semanas aumentou a preferência a sacarose (Figura 10 A), e não interferiu com o tempo de permanência em cada um dos braços do LCE, nem tão pouco com o número de entradas no braço aberto (Figura 10 B e C). No entanto, o isolamento social levou a um aumento no tempo de imobilidade e uma menor latência para o primeiro episódio de imobilidade no TNF (Figura 10 C). Em conjunto, estes resultados indicam que o protocolo utilizado neste estudo induziu comportamento hedônico e comportamento de desamparo aprendido, mas não comportamento tipo ansioso. Além disso, este protocolo levou a uma redução acentuada do ganho de peso corporal avaliado ao longo das 4 semanas (Figura 11B). O ganho de peso nos animais isolados foi menor em comparação aos animais agrupados a partir do final da segunda semana (Figura 11 A).

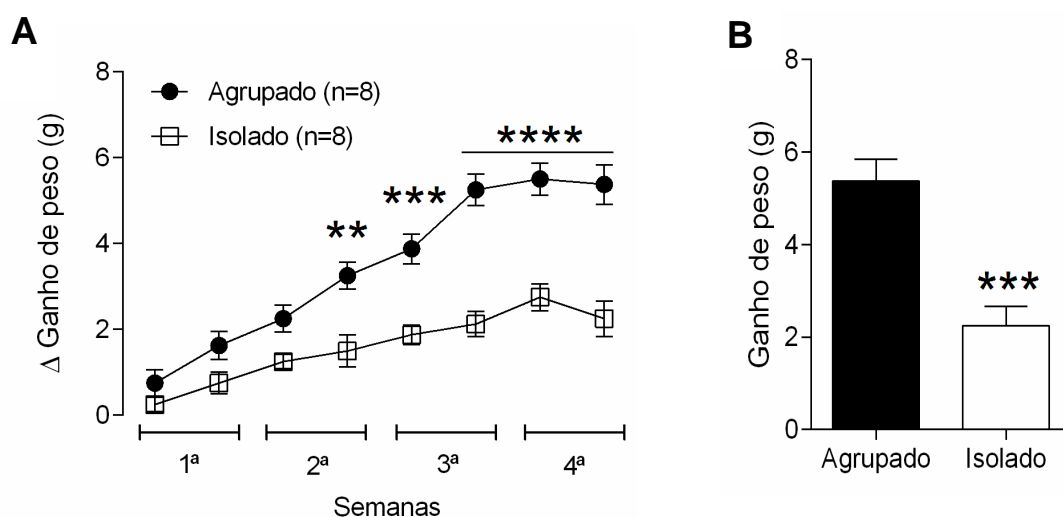
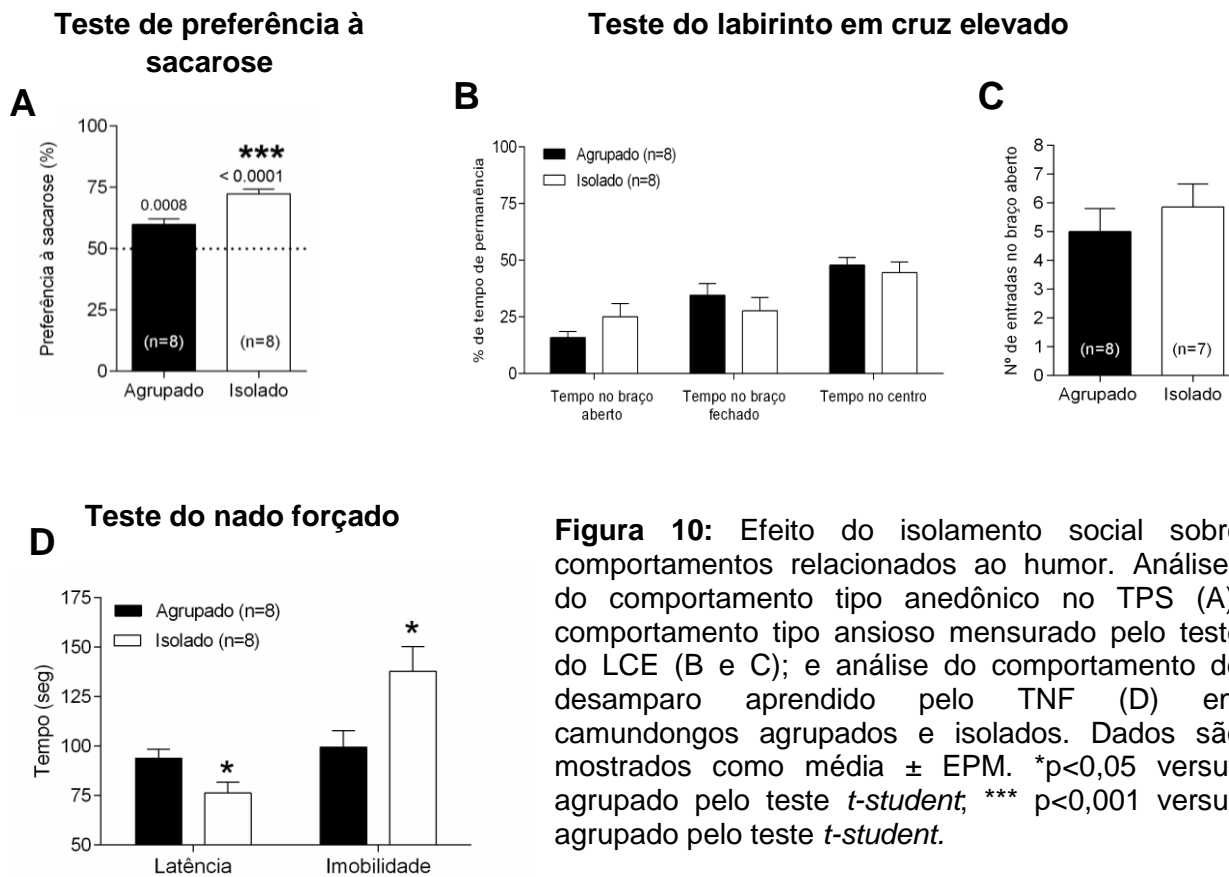


Figura 11: Efeito do isolamento social sobre o ganho de peso corporal ao longo de 4 semanas (A e B). Dados são mostrados como média \pm EPM; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ versus agrupado pelo teste de ANOVA de duas vias seguido pelo teste *Bonferroni*, *** $p < 0,001$ versus agrupado pelo teste *t-Student*.

5.2. Efeito do isolamento social sobre o ritmo circadiano de ALE e T_{interna}

Analisando a média de ALE e T_{interna} em cada ZT ao longo de 8 dias de registro, observamos que o isolamento social não alterou o perfil do ritmo circadiano de ALE (Figura 12 A). Entretanto, observamos que os animais isolados apresentaram uma diminuição da ALE total tanto na fase de luz (Figura 12 B) quanto na de escuridão (Figura 12 C), sem alteração na amplitude do ritmo de ALE (Figura 12 D).

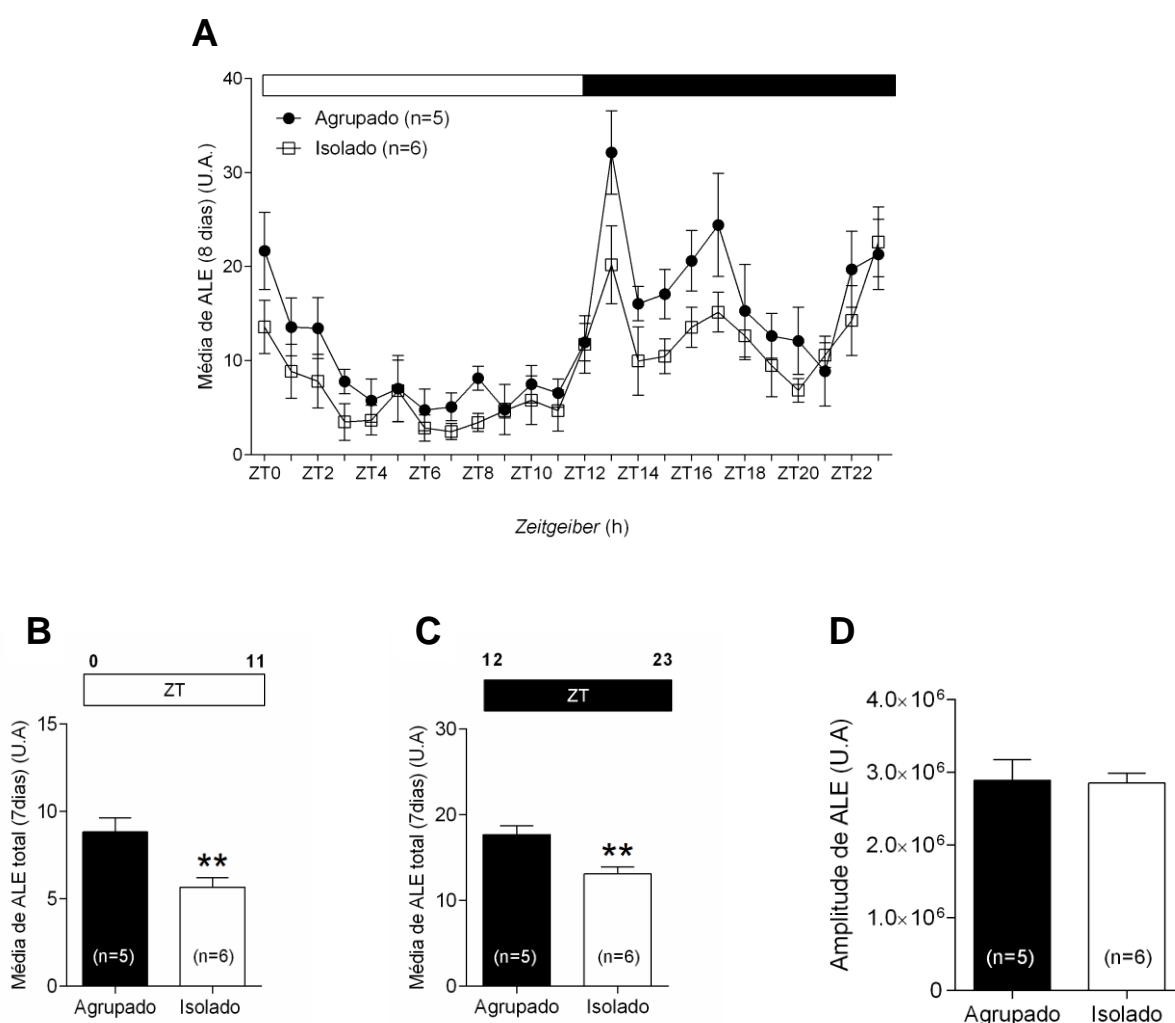


Figura 12: Efeito do isolamento social sobre a variação do ritmo de ALE na fase de luz e escuridão, e sobre a amplitude do ritmo de ALE. Média total de ALE por ZT correspondente a 8 dias de registro de telemetria (A); média total de ALE durante a fase de luz/repouso (B), e durante a fase de escuridão/atividade (C). Amplitude do ritmo circadiano de ALE (D). Dados são mostrados como média \pm EPM. ** $p < 0,01$ versus agrupado pelo teste *t-student*.

Apesar da T_{interna} continuar apresentando variações rítmicas (Figura 13 A) após o isolamento social, observamos um aumento na amplitude destas variações (Figura 13 D), sem alterações na média de T_{interna} em ambas as fases (Figura 13 B e C).

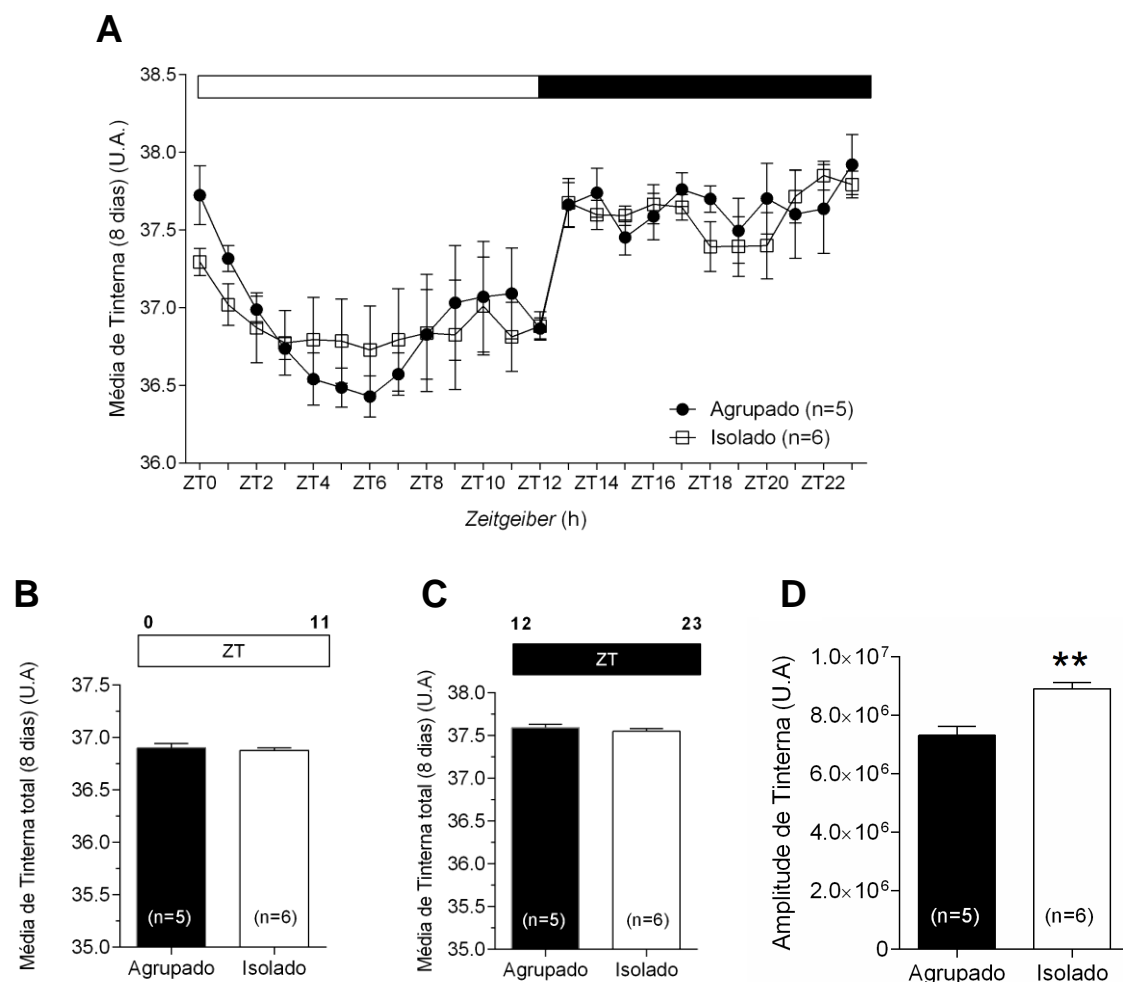


Figura 13: Efeitos do isolamento social sobre a variação do ritmo de T_{interna} na fase de luz e escuridão, e sobre a amplitude do ritmo de T_{interna} . Média da T_{interna} por ZT correspondente a 8 dias de registro de telemetria (A); média total de T_{interna} durante a fase de luz/reposo (B), e durante a fase de escuridão/atividade (C). Amplitude do ritmo circadiano de T_{interna} (D). Dados são mostrados como média \pm EPM. ** $p < 0,01$ versus agrupado pelo teste *t*-student.

A avaliação de parâmetros do ritmo circadiano nos permite identificar o horário de início (*onset*), de pico (acrofase) e do final (*offset*) em que uma variável rítmica aumenta a partir de seus valores basais. Esta análise é crucial para entendermos a sincronia de fase de variáveis múltiplas de um sistema circadiano. Neste trabalho, utilizamos o cálculo da dispersão de cada um dos parâmetros descritos por meio do teste z de Rayleigh. A direção das setas nos gráficos polares das figuras 14 e 15 indicam a média angular de cada parâmetro e o tamanho indica o grau de dispersão da amostra, quanto maior a seta, menor a dispersão da amostra; amostras com tamanho de seta menor que o círculo representado no centro do gráfico polar são consideradas dispersas (PEZÜK et al., 2012; MURPHY et al., 2013; PEZUK et al., 2014). Nossos resultados mostram que o *onset*, acrofase e o *offset* da ALE concentra-se num mesmo horário em ambos os grupos.

O ZT0 corresponde ao horário em que as luzes ascendem, e ZT 12 corresponde ao horário em que as luzes apagam em ciclo de luz e escuridão padrão de 12:12 h. O *onset* de ALE de ambos os grupos aconteceu por volta do ZT12 (equivalente às 5:00 h, horário em que as luzes se apagaram, Figura 14 A e D), com acrofase entre os ZTs 18 e 19 (equivalente às 11:00 h e 12:00 h, Figura 14 B e E) e *offset* por volta do ZT1 (equivalente às 18:00 h, Figura 14 C e F). A análise desses mesmos parâmetros para o ritmo de T_{interna} , no entanto, mostrou que, embora ainda concentrados num horário específico do dia (Figura 15 A, B e C), o isolamento social levou a um avanço no *onset* (Figura 15 A e D), não alterou a acrofase (Figura 15 B e E) e atrasou o *offset* do ritmo de T_{interna} (Figura 15 C e F).

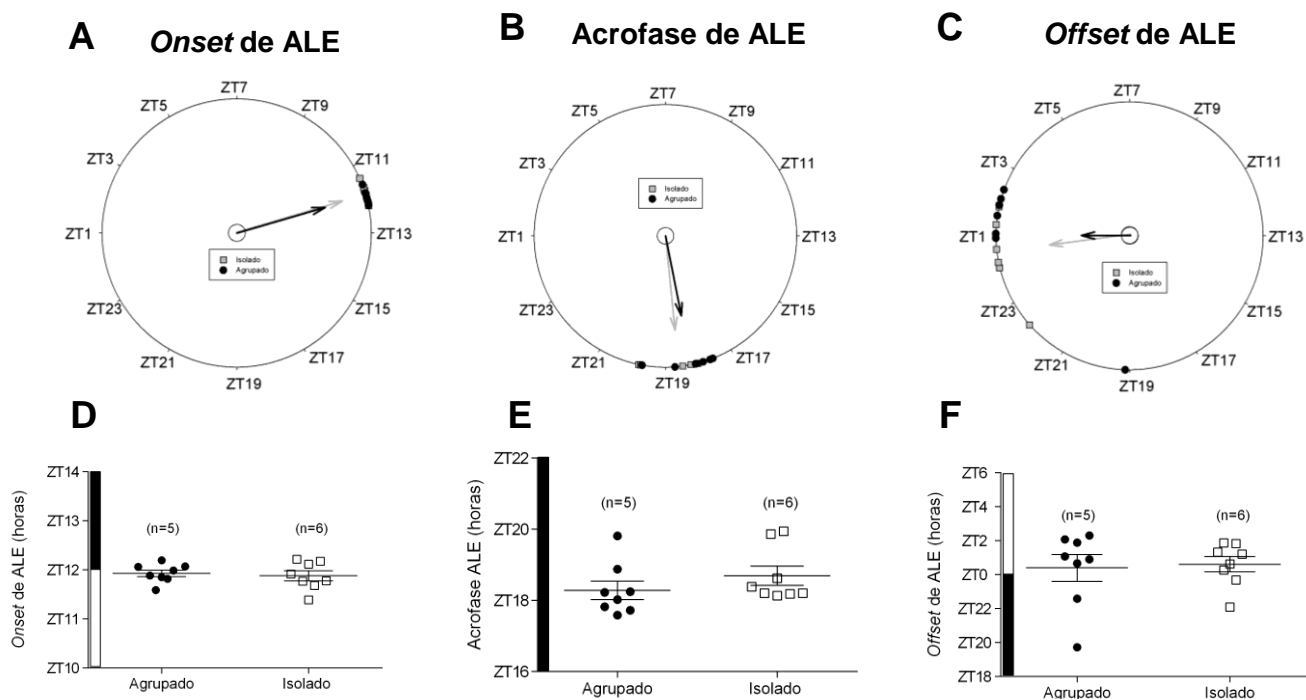


Figura 14: Análise de distribuição do *onset* (A), *acrofase* (B) e *offset* (C) de ALE correspondentes a 8 dias de registro de telemetria de animais agrupados e isolados. A direção das setas representa a média angular desta distribuição e seu tamanho representa o valor de z calculado (teste z de Rayleigh). O círculo localizado no centro indica o valor de z tabelado. Média do *onset* (D), *acrofase* (E) e *offset* (F) de ALE representado em ZT de animais agrupados e isolados. Dados são mostrados como média ± EPM.

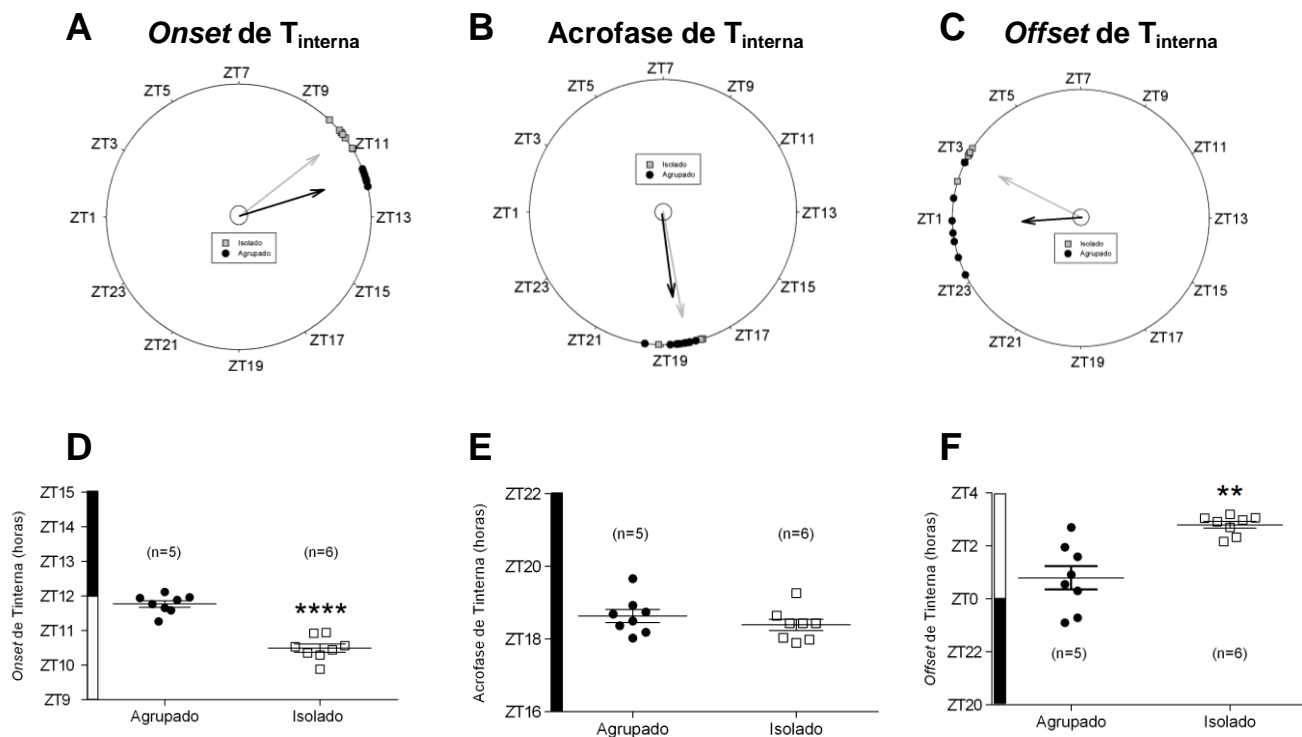


Figura 15: Análise de distribuição de *onset* (A), *acrofase* (B) e *offset* de $T_{interna}$ (C) correspondentes de a 8 dias de registro de telemetria de animais agrupados e isolados. A direção das setas representa a média angular desta distribuição e seu tamanho representa o valor de z calculado (teste z de Rayleigh). O círculo localizado no centro indica o valor de z tabelado. Média de *onset* (D), *acrofase* (E) e *offset* (F) de $T_{interna}$ representado em ZT de animais agrupados e isolados. Dados são mostrados como média \pm EPM. ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$ versus animais agrupados pelo teste *t-student*.

Por meio da análise do mapa de fase, podemos observar que o horário do *onset* e *offset* do ritmo de ALE e T_{interna} não se diferem nos animais agrupados (Figura 16 A e C), enquanto que, são estatisticamente diferentes nos animais isolados (Figura 16 B e D). Estes resultados indicam que o isolamento social causa um desacoplamento entre o início (*onset*) e o fim (*offset*) de ALE e T_{interna} , ou seja, estes ritmos não estão em sincronia de fase no grupo isolado.

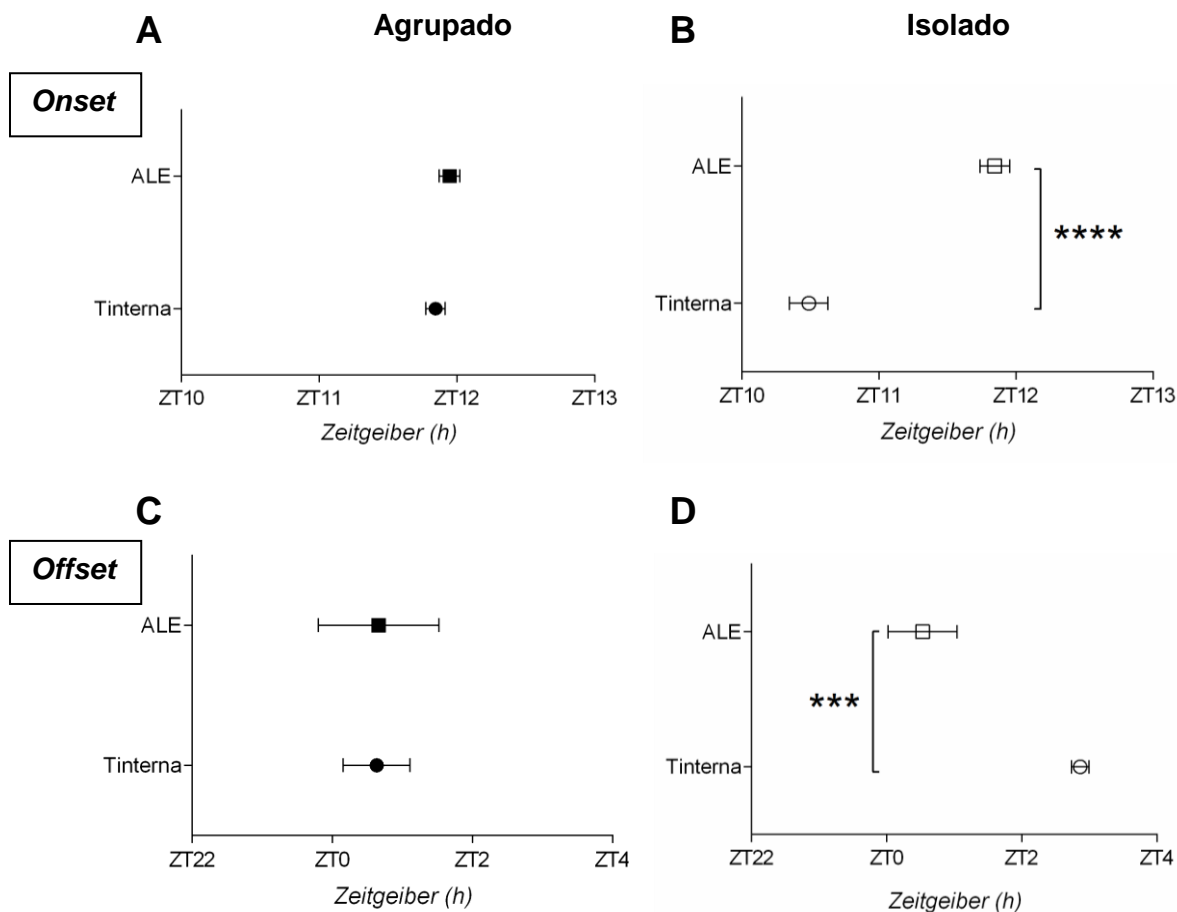


Figura 16: Efeito do isolamento social sobre o acoplamento do *onset* e *offset* de ALE e T_{interna} em animais agrupados e isolados. Painéis A e C mostram um mapa de fase de animais agrupados, comparando o horário (representado em ZT) do *onset* e *offset* de T_{interna} e ALE, respectivamente; e C e D mostram mapas de fase do grupo isolado. Dados são mostrados como média \pm EPM. *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ versus animais agrupados pelo teste *t-student*.

5.3. Efeito do Isolamento social sobre o número de neurônios c-Fos+ no NSQ

A figura 17 mostra 4 fotomicrografias de secções coronais, na região onde se encontra o NSQ, imunomarcadas para a proteína c-Fos. Esta marcação está indicada por pontos pretos concentrados na região nuclear dos neurônios. Claramente, há uma maior expressão de c-Fos no ZT2 e menor no ZT14 no NSQ dos animais agrupados. A contagem do número de neurônios marcados em cada ZT e em cada grupo estudado revelou que, de fato, há uma variação temporal na atividade neuronal da região do NSQ (Figura 17 E) dos animais agrupados. Esta variação é abolida pelo isolamento social; os animais isolados mostraram uma redução no número de neurônios c-Fos positivos por seção no ZT2 (Figura 17 E).

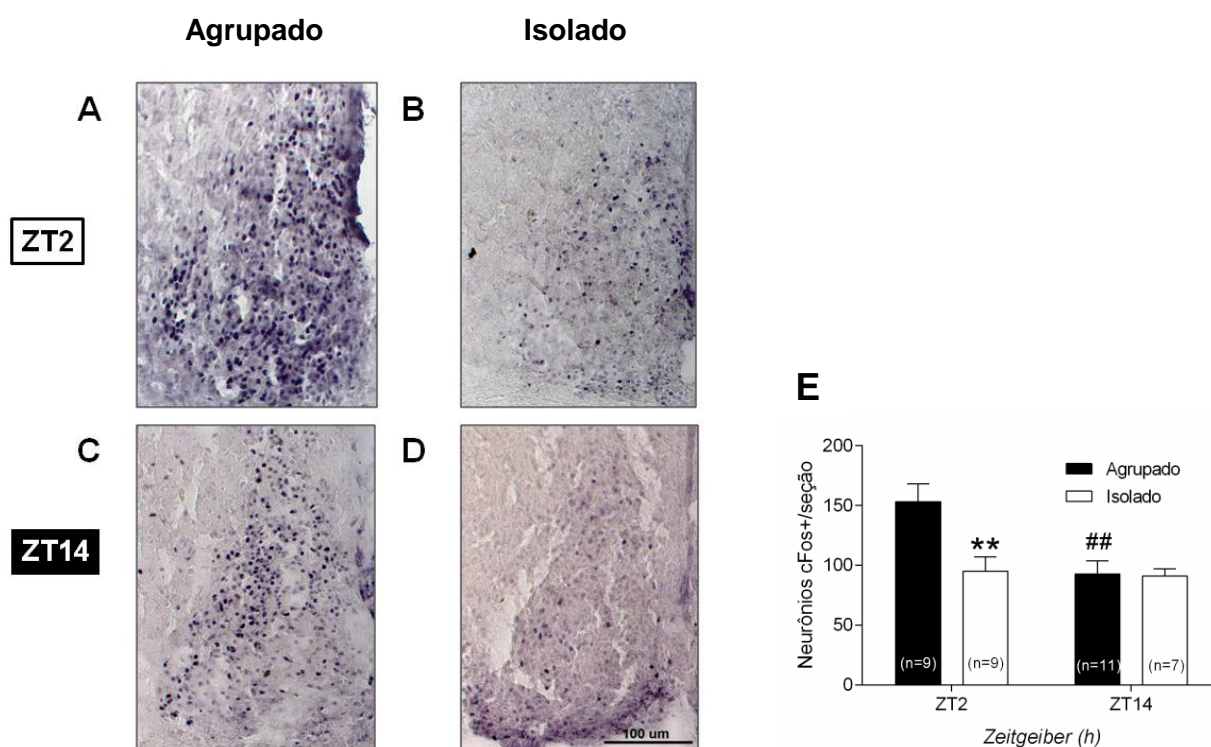


Figura 17: Efeito do isolamento social sobre o número de neurônios c-Fos+ no NSQ no ZT2 e ZT14 em animais isolados e agrupados. Fotomicrografias de secções coronais marcadas pelo c-Fos com ampliação de 20x, de animais agrupados e isolados no ZT2 (A e B, respectivamente) e no ZT14 (C e D, respectivamente). Localização da região onde se localiza o NSQ na sua porção medial (bregma -0,46) de acordo com Paxinos e Franklin (2001). Número total de células no NSQ imunorreativas para c-Fos (cFos+) (E). Dados são mostrados como média ± EPM. **p<0,05, versus

agrupado no ZT2, $##p < 0,01$, versus agrupado ZT2 pelo ANOVA de duas vias seguido pelo teste *Bonferroni*.

A figura 18 A mostra um esquema ilustrativo do corte coronal onde se localiza o NSQ de acordo com o atlas de Paxinos e Franklin (2001), esta região foi mostrada de forma ampliada na figura 18 B para ilustrarmos a divisão morfofuncional do núcleo: região DM e VL. A figura 18 C e D mostra uma fotomicrografia de uma seção coronal da região onde se localiza o NSQ que está aproximadamente na porção antero-posterior indicada no esquema. A contagem do número de neurônios das regiões DM e VL apontaram que o padrão de expressão de c-Fos foi o mesmo, ou seja, ambas as regiões mostram um aumento da atividade neuronal no ZT2 quando comparada ao ZT14 nos animais agrupados (Figura 18 E e F). Este padrão temporal foi abolido pelo isolamento social (Figura 18 E e F). Assim, o efeito do isolamento social sobre a atividade neuronal da região que compreende o NSQ é o mesmo nas diferentes divisões morfofuncionais do NSQ.

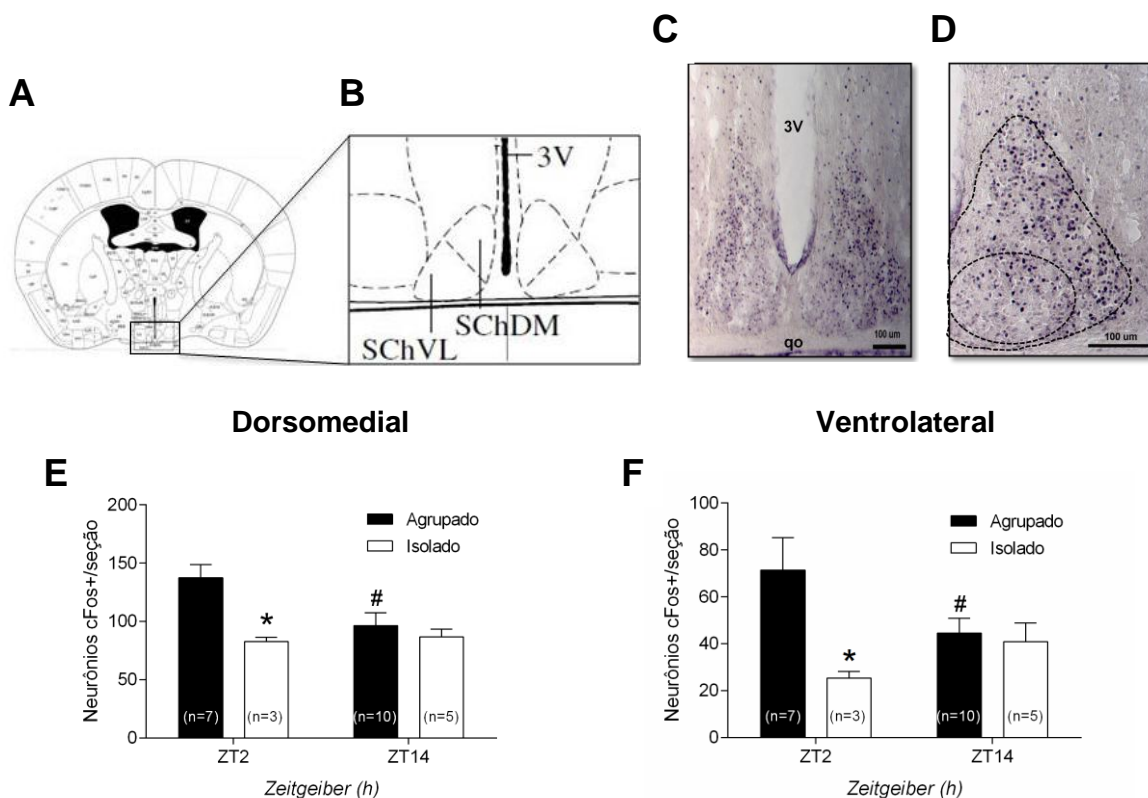


Figura 18: Efeito do isolamento social sobre o número de neurônios c-Fos+ das regiões DM e VL do NSQ no ZT2 e ZT14. Localização da região onde se localiza o NSQ na sua porção medial (bregma -0,46) de acordo com Paxinos e Franklin (2001) (A) e ampliação desta região (B). Fotomicrografias de seções coronais marcadas pelo

c-Fos, ampliação 10x (C) e 20x (D). Secção coronal da região onde se localiza o NSQ é mostrada com delimitações para as porções DM e VL de acordo com Abrahamson e Moore (2001) (D). Número total de células na porção DM cFos+ (E) e VL (F) no ZT2 e ZT14. Dados são mostrados como média \pm EPM. * $p < 0,05$, versus agrupado no ZT2, # $p < 0,05$ agrupado ZT2 pelo teste de ANOVA de duas vias seguido pelo teste *Bonferroni*.

5.4. Efeito do Isolamento social sobre a resposta de foto-arrastamento

O efeito do isolamento sobre a plasticidade do sistema circadiano foi avaliada pela análise da resposta de foto-arrastamento. A figura 19 mostra actogramas representativos de ALE e T_{interna} de um animal agrupado e um isolado em ciclos de 12 h de luz e 12 h de escuridão correspondentes a 26 dias de registro. A partir do 29º dia do experimento (agrupamento ou isolamento) as luzes foram acessas às 11:00 h e apagadas às 23:00 h por 7 dias (período de avanço de fase). Claramente observamos um arraste de fase no ritmo de ALE e de T_{interna} (Figura 19 A, B, C e D).

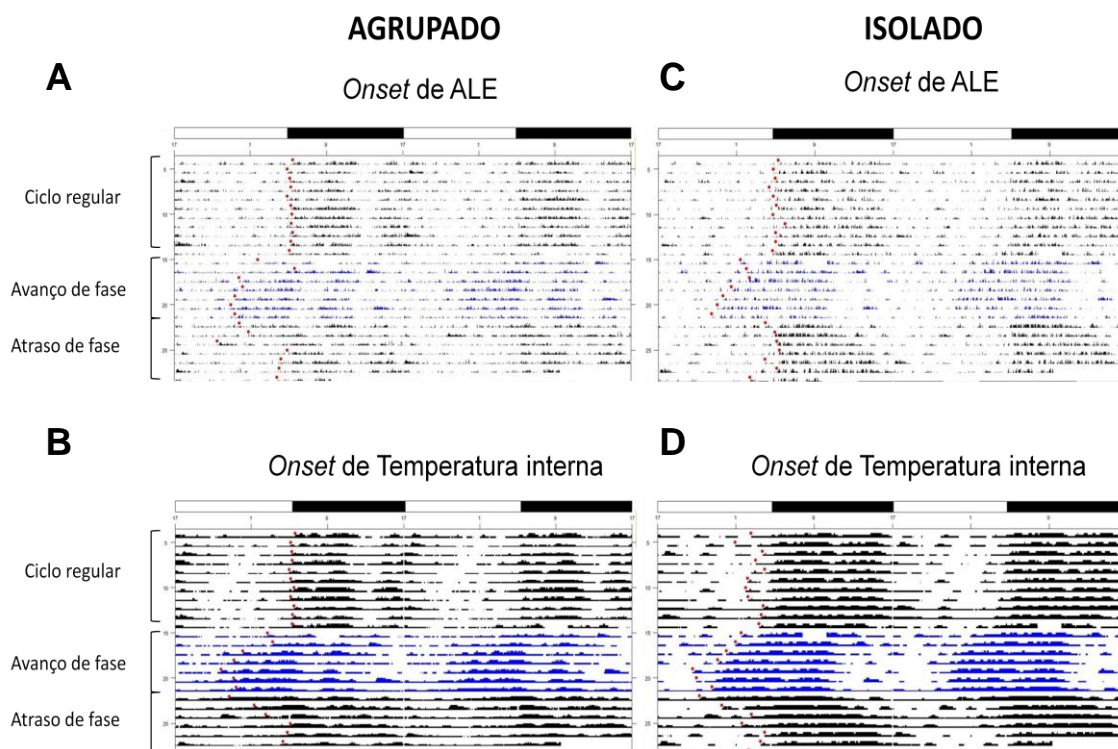


Figura 19: Actogramas representativos do ritmo circadiano de ALE e T_{interna} de um animal do grupo agrupado (A e B) e um animal do grupo isolado (C e D) antes e durante o protocolo de *Jet lag*. Os pontos vermelhos representam o horário de *onset*

de ambos os ritmos analisados. As barras brancas representam a fase de luz, e as barras pretas representam a fase de escuridão. Os números abaixo das barras representam as horas do dia. As linhas horizontais representam os dias.

A análise do tempo de arrastamento mostra que os animais isolados ajustam o início da ALE mais rapidamente do que os animais agrupados (Figura 20 E). Não houve diferença para este parâmetro para o ritmo de $T_{interna}$ entre os animais agrupados e isolados (Figura 20 F).

Tempo de arrastamento

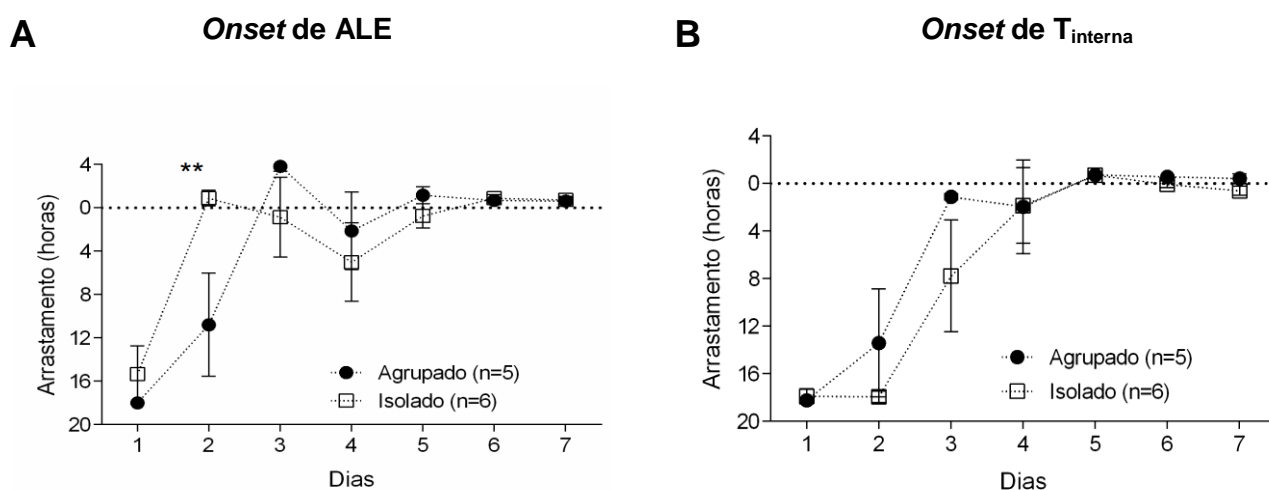


Figura 20: Efeito do isolamento social sobre a resposta de foto-arrastamento em animais agrupados e isolados. Análise do tempo de arrastamento do ritmo circadiano de ALE (A) e $T_{interna}$ (B) após protocolo de avanço de fase. Dados são mostrados como média \pm EPM. ** $p < 0,01$, versus agrupados pelo teste ANOVA de duas vias seguido pelo teste *Bonferroni*.

6. DISCUSSÃO

O sistema circadiano de mamíferos tem a luz ambiental como seu principal agente sincronizador. No entanto, sabemos que agentes não-fóticos, tais como a interação social, desempenham papel importante para a manutenção da sincronia de fase dos múltiplos ritmos circadianos do organismo (GOLOMBECK; ROSENSTEIN, 2010; OSTER et al., 2017). O presente trabalho utilizou do isolamento social como uma estratégia para estudar a importância da interação social sobre o sistema circadiano em camundongos. O alojamento individual de roedores representa um estímulo estressor que leva a alterações comportamentais, endócrinas e imunes (GAVRILOVIC; SPASOJEVIC; DRONJAK, 2010; GRECO et al., 1992). Dentre as alterações comportamentais destacamos as relacionadas ao humor tais como comportamento tipo depressivo, ansioso, e o aumento da agressividade (GRECO et al., 1989; GRIPPO et al., 2014; IERACI; MALLEI; POPOLI, 2016). Frente a esse conhecimento, na primeira etapa do estudo, avaliamos o efeito do protocolo de isolamento sobre comportamentos relacionados ao humor.

O isolamento social pode levar a um aumento no tempo de imobilidade no TNF, comportamento que reflete uma falha na persistência da tentativa de fuga diante de uma situação inescapável, conhecido como comportamento de desamparo aprendido (CRYAN; MARKOU; LUCKI, 2002). Demonstramos que a permanência de camundongos por 4 semanas isolados de seus coespecíficos aumentou o tempo de imobilidade no TNF, bem como diminuiu a latência para o primeiro episódio de imobilidade. Corroborando com estes resultados, Berry *et al.* (2012) demonstram que 3 semanas de isolamento social já é o suficiente para induzir aumento na imobilidade de camundongos C57Bl/6J adultos no TNF. Do mesmo modo, Ieraci, Mallei e Popoli (2016) mostraram que camundongos desta mesma linhagem e submetidos ao mesmo período de isolamento do nosso estudo, apresentam um maior tempo de imobilidade no teste de suspensão de cauda quando comparado aos animais mantidos agrupados. Ambos os testes (nado forçado e suspensão de cauda) avaliam o comportamento de desamparo aprendido, o qual é inferido a partir do tempo de imobilidade do animal durante o período de teste (POLLAK; REY; MONJE, 2010). Deste modo, tais resultados corroboram com os achados do

presente trabalho de que a perda da interação social em camundongos adultos leva a alterações comportamentais que podem ser explicadas por possíveis alterações neuroquímicas, uma vez que já foi descrito que o isolamento social leva a uma diminuição nos níveis do fator neurotrófico derivado do cérebro, ou BDNF, em áreas límbicas como córtex pré-frontal, hipocampo, hipotálamo e mesencéfalo (BERRY et al., 2012; IERACI; MALLEI; POPOLI, 2016).

A anedonia compreende a perda ou diminuição do interesse por atividades prazerosas, sendo um dos principais sintomas observados em indivíduos depressivos. Desta maneira, perturbações no sistema de recompensa do cérebro estão relacionadas a este comportamento (POLLAK; REY; MONJE, 2010; MINAMI et al., 2017). Sabe-se que o estresse social pode provocar insensibilidade à recompensa em roedores, ou comportamento tipo-anedônico, aspecto que pode ser demonstrado pela perda do comportamento antecipatório para a recompensa à sacarose, revertido pelo tratamento com antidepressivos ou pelo enriquecimento do ambiente (KAMAL et al., 2009).

Frente a esses conhecimentos, testamos o efeito do protocolo utilizado de isolamento social sobre o comportamento tipo anedônico, avaliado pelo TPS. Contrário ao descrito pela literatura utilizando outras espécies de roedores bem como diferentes períodos de isolamento (WALLACE et al., 2009; TAKATSU-COLEMAN et al., 2013; SARGIN; OLIVER; LAMBE, 2016), nossos resultados mostraram que o protocolo utilizado não induziu comportamento tipo-anedônico, ao contrário, os animais isolados apresentaram uma maior preferência à sacarose em relação aos animais agrupados. Este resultado vai de acordo com outros trabalhos nos quais foram utilizados camundongos adultos de diferentes linhagens e com diferentes períodos de isolamento (3 e 4 semanas), onde os animais isolados apresentaram um maior consumo de sacarose em relação aos agrupados (COUDEREAU et al., 1999; BERRY et al., 2012). Do mesmo modo, roedores isolados na adolescência apresentam um consumo maior de sacarose quando testados neste período ou na fase adulta (BRENES; FORNAGUERA, 2008; HONG et al., 2012), além de aumento no consumo de álcool (LOPEZ; DOREMUS-FITZWATER; BECKER, 2011; LOPEZ; LABER, 2015). Estes resultados sugerem que a perda da interação

social possivelmente altere vias neurais envolvidas no sistema de recompensa em camundongos adultos, aumentando a escolha por experiências prazerosas.

Além disso, para que o consumo de água e sacarose de cada animal fosse mensurado, foi necessário alojar os animais do grupo controle (agrupado) individualmente por 3 dias. Deste modo, possivelmente, o isolamento agudo destes animais pode explicar o menor consumo de sacarose neste grupo, visto que o isolamento por 12 horas já foi mostrado suficiente em diminuir a preferência à sacarose (TAKATSU-COLEMAN et al., 2013).

Diante desses resultados encontrados na literatura somados aos apresentados aqui, sugere-se que perda do contato social pode aumentar a busca à recompensa, como forma de compensar a falta de fontes prazerosas como a própria interação social. Segundo Karkhanis et al. (2015), a ativação da comunicação glutamatérgica entre a amígdala basolateral e o núcleo accumbens potencializa o comportamento de busca à recompensa, e o isolamento social parece potencializar essa sinalização. Além disso, a diminuição nos níveis de serotonina e aumento do seu *turnover* no córtex pré-frontal e hipocampo provocado pelo isolamento social, tem sido associado com aumento da procura por estímulos recompensantes como sacarose e etanol, sugerindo que estas alterações estejam envolvidas no comportamento hedônico causado pelo isolamento social (BRENES; FORNAGUERA, 2009).

Em roedores ainda, o isolamento social pode resultar em comportamento tipo ansioso (KWAK; LEE; KAANG, 2009; TAKATSU-COLEMAN et al., 2013; IERACI; MALLEI; POPOLI, 2016). Assim, avaliamos este comportamento pelo teste do labirinto de cruz elevado. O protocolo de isolamento social utilizado em nosso estudo não acarretou em comportamento tipo ansioso, uma vez que o tempo despendido nos braços abertos e fechados, bem como o número de entradas nos braços abertos do labirinto em cruz não foi diferente entre os grupos de animais estudados. Diferente destes resultados, 3 e 4 semanas de isolamento social induz comportamento tipo-ansioso, analisado pelos testes do LCE e campo aberto (BERRY et al., 2012; IERACI; MALLEI; POPOLI, 2016; LANDER; LINDER-SHACHAM; GAISLER-SALOMON, 2017). No entanto, no presente trabalho não foram analisados

outros parâmetros durante o teste utilizado, como os comportamentos encaixados na categoria de “Avaliação de risco” como, por exemplo, mergulho da cabeça abaixo do nível do labirinto, postura alongada, exploração do final do braço aberto, e exploração com a cabeça e ombros do braço aberto ou centro (SAITO; BRANDÃO, 2015). A análise destes parâmetros pode revelar uma diferente conclusão sobre o efeito do protocolo utilizado sobre o comportamento tipo-ansioso ou corroborar com os resultados já obtidos.

Sabe-se que os efeitos neuroquímicos e comportamentais do isolamento social são determinados por alguns fatores importantes, tais como a fase de desenvolvimento do animal, gênero, tempo de isolamento, espécie e linhagem (HALL, 1998; SCHILLER et al., 2003; SILVA et al., 2011; HONG et al., 2012). A idade do animal parece ser um fator determinante sobre o efeito do isolamento social, visto que eventos estressantes no início da vida de roedores sabidamente induz alterações comportamentais (HALL, 1998), sendo que em roedores adultos o efeito do isolamento social tem sido menos investigado. Levando em consideração estas informações e que cada teste comportamental avalia um aspecto das alterações comportamentais relacionados ao humor, concluímos que nosso protocolo é capaz de induzir comportamento tipo-depressivo e hedônico, mas não tipo ansioso.

No presente trabalho, após 4 semanas de isolamento social, os animais isolados reduziram drasticamente o ganho de peso corporal, provavelmente, como resultado de alterações fisiológicas induzidas pelo isolamento, relacionadas às respostas ao estresse. Dados conflitantes na literatura mostram que o isolamento social em roedores pode induzir alterações no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (eixo HHA), podendo provocar aumento (GRECO et al., 1992; PERELLÓ et al., 2006), diminuição (MIACHON et al., 1993; IERACI; MALLEI; POPOLI, 2016) ou nenhuma alteração nos níveis de corticosterona (STRANAHAN, KHALIL; GOULD, 2006; LOPEZ; LABER, 2015). Sabe-se que níveis elevados deste hormônio provocam diminuição no ganho peso (JOHNSON; FOURNIER; KALYNCHUK, 2006; CHAN et al., 2017) e que comportamentos de busca por recompensa ou de hedônia estão relacionados com alterações nos níveis plasmáticos de corticosterona em situações de

estresse (DEROCHE et al., 1992), assim sugerimos que o protocolo utilizado neste trabalho possa ter induzido aumento nos níveis deste hormônio nos animais socialmente isolados, que podem explicar a diminuição no ganho de peso corporal, assim como o aumento da preferência à sacarose.

Por outro lado, o isolamento social induz aumento nos níveis de leptina em humanos (HÄFNER et al., 2011) e roedores, além de um avanço no horário de pico deste hormônio (PERELLÓ et al., 2006). Sabe-se que a leptina é um hormônio produzido e liberado pelos adipócitos, tendo como uma das suas principais funções o controle da homeostase energética e da ingestão de alimentos. Portanto, níveis elevados de leptina induzem saciedade, diminuição da ingestão e, conseqüentemente, do ganho de peso (KALSBECK; FLIERS, 2013). Adicionalmente, a leptina leva a um aumento do gasto energético e a uma diminuição do ganho de peso de maneira independente da ingestão de alimentos, via ativação de neurônios no hipotálamo dorsomedial, que por sua vez, aumentam a ativação simpática no tecido adiposo marrom aumentando a termogênese (REZAI-ZADEH et al., 2014; TIMPER; BRU, 2017). Portanto, o isolamento social possivelmente desencadeia um aumento nos níveis de leptina, o que explicaria a diminuição do ganho de peso no grupo isolado, via aumento na termogênese e no gasto energético. Portanto, a perda da pista social pode ter ocasionado alterações em hormônios relacionados com o gasto energético, saciedade e ganho de peso, influenciando na busca por alimento ou no metabolismo basal. Estas variáveis necessitam de futuras investigações.

Os ritmos circadianos de ALE e de $T_{interna}$ interna são mantidos graças à atividade dos neurônios do NSQ (STEPHAN; ZUCKER, 1972; FRIEDRICH, 1977), sendo considerados, portanto, eventos de saída do relógio central. Como esperado, no presente estudo mostramos que os animais estudados apresentaram ritmicidade nos parâmetros de ALE e $T_{interna}$, uma vez que eles foram mantidos em ciclo de luz e escuridão padrão (12:12h). Entretanto, após o isolamento social, foi observada uma diminuição na ALE total, tanto na fase de luz quanto na de escuridão, sem interferência na amplitude do ritmo de ALE.

O ritmo de ALE deve-se às ações da prokinectina 2 (PK2) em regular as variações circadianas de atividade neuronal do NSQ (CHENG et al., 2002;

ZHOU; CHENG, 2005; LI et al., 2006; REN et al., 2011). Os níveis de RNAm de PK2 oscilam de maneira circadiana no NSQ de roedores em ciclo de luz e escuridão ou em escuridão constante, sendo seus níveis elevados durante o dia e menores durante a noite em roedores noturnos (CHENG et al., 2002). A administração intracerebroventricular de PK2 durante a noite subjetiva em ratos suprime a ALE nesses animais na roda de atividade, além de aumentar a ALE durante a fase de luz no dia subsequente (CHENG et al., 2002). Li et al. (2006) demonstraram que camundongos nocautes para PK2 apresentam diminuição na ALE na roda de atividade, bem como no ciclo sono e vigília, temperatura corporal, níveis de glicose e glicocorticóides e na expressão de genes de relógio no fígado. Além disso, alterações em neurônios contendo AVP, localizados especialmente na região DM do NSQ, provocam diminuição na expressão do RNAm de PK2, bem como alterações no ritmo circadiano de ALE e no ciclo sono e vigília (LI et al., 2009; MIEDA et al., 2015), sugerindo uma participação da AVP e PK2 sobre os ritmos circadianos de ALE.

Frente a essas informações, é possível que a diminuição na ALE total observado em camundongos socialmente isolados no presente trabalho, tenha sido ocasionada devido a uma alteração nos neurônios expressando AVP e PK2 (em nível de proteína, RNAm ou receptores correspondentes) especialmente na região DM do NSQ, uma vez que também observamos uma diminuição na alteração na atividade neuronal nesta região no grupo isolado. Adicionalmente, a habenua lateral (LHb), região cerebral que recebe projeções das ipRGCs (HATTAR et al., 2006), e possivelmente do NSQ, expressa receptores de PK2 (SAKHI et al., 2016) e parece estar envolvida na regulação da ALE circadiana, uma vez que a atividade na roda durante a fase de luz aumenta a expressão de c-Fos nesta região, e que a transecção da principal via eferente da LHb leva a diminuição na atividade na roda e aumento na atividade locomotora geral em hamsters (PAUL; INDIC; SCHWARTZ, 2011). Deste modo, outra possível causa dos resultados observados na ALE total neste trabalho pode ter sido ocasionada por alterações de vias que se projetam para a LHb, possivelmente através da PK2.

O isolamento social desencadeou um aumento na amplitude do ritmo de $T_{interna}$, sem interferir na média de $T_{interna}$ na fase de luz e de escuridão. Outro

protocolo de estresse social (o protocolo de derrota social), amplamente utilizado para investigar mecanismos envolvidos em transtornos de humor, provoca redução da ALE e, ao contrário do que foi observado no presente estudo, uma redução na amplitude do ritmo de T_{interna} (MEERLO et al., 1996, 1997), resultado semelhante já foi observado em humanos depressivos (SOUETRE et al., 1988). Portanto, o estresse social parece desencadear perturbações nos parâmetros do ritmo circadiano de T_{interna} .

A análise dos parâmetros do ritmo circadiano de *onset*, *offset* e acrofase de ambas variáveis (ALE e T_{interna}), mostraram que o isolamento social foi capaz de avançar o início (*onset*) e de atrasar o final (*offset*) do ritmo de T_{interna} , sem alterações destes parâmetros no ritmo de ALE. Uma vez que tais parâmetros refletem o padrão de ritmicidade da oscilação circadiana de ALE e T_{interna} , e que estas variáveis são controladas pelo NSQ, é esperado que eles ocorram em sincronia, visto que o aumento na temperatura corporal ocorre pouco antes do início da fase de atividade e diminui no início da fase de repouso (HONMA et al., 1988; REFINETTI; MENAKER, 1992; RAMIREZ-CORONA et al., 2015;). Portanto, a comparação destes parâmetros para ambos os ritmos mostram um desacoplamento entre os ritmos de ALE e T_{interna} provocados pelo isolamento, resultados que fortemente sugerem um efeito do isolamento social sobre o relógio central.

De fato, a análise da atividade neuronal do NSQ, por meio da quantificação do número de neurônios c-Fos+, mostrou que o isolamento social é capaz de reduzir a atividade destes neurônios. Além de ser capaz de abolir as variações temporais de atividade neuronal observadas neste núcleo. Este efeito do isolamento social sobre a atividade dos neurônios do NSQ foi observado em ambas às divisões morfo-funcionais deste núcleo. Uma vez que ambos os grupos experimentais foram condicionados a um ciclo de luz e escuridão 12:12 h, era esperado o resultado observado no grupo controle, no qual ocorreu um aumento na expressão de c-Fos no ZT2 e diminuição no ZT14 (SCHWARTZ et al., 1994). Pelo fato de termos avaliado a expressão de c-Fos apenas em dois horários do dia, é possível que o isolamento social possa ter causado um arraste no pico de expressão de c-Fos. Somente a análise em outros horários do dia pode confirmar esta hipótese.

Embora ambos os ritmos circadianos, ALE e T_{interna} , sejam determinados pela atividade dos neurônios do NSQ, nosso estudo, mostrou que somente o ritmo de T_{interna} está alterado, corroborando com as alterações na atividade do NSQ observadas no grupo de animais isolados. A T_{interna} depende de mecanismos de regulação homeostáticos, além dos mecanismos circadianos. Por exemplo, a interação com o coespecífico é parte do repertório de comportamentos necessários para a termorregulação (NAGASHIMA et al., 2000). O isolamento social remove este componente. Dessa forma, para manter a mesma T_{interna} o animal pode ter desencadeado outros mecanismos termorregulatórios, como por exemplo, um aumento na termogênese pelo tecido adiposo marrom. Isto pode ser verdade, em parte, quando observamos uma diminuição acentuada no ganho de peso corporal nos animais isolados e um aumento na amplitude do ritmo de T_{interna} . A análise experimental da termogênese (através da determinação do consumo de O₂, peso do tecido adiposo marrom e dosagem da *uncouple chain protein*, UCP-1) confirmaria esta hipótese.

A diminuição de células imunorreativas no NSQ para c-Fos no ZT2 (início da fase de luz) no grupo isolado pode sugerir uma possível alteração na atividade dos neurônios expressando VIP e AVP nas regiões VL e DM, respectivamente. Adicionalmente, uma vez que a região VL recebe projeções do TRH e, conseqüentemente, informações sobre o fotoperiodicidade ambiental, uma perturbação na recepção fótica pelos neurônios da região VL pode ter ocasionado na queda de atividade neuronal desta região, e conseqüentemente, levando a diminuição da atividade neuronal na região DM. Sabe-se que o peptídeo ativador de adenilato ciclase na pituitária (PACAP) e o neurotransmissor glutamato estão envolvidos nesta comunicação, portanto alterações a nível destas duas moléculas podem afetar a transmissão de informação luminosa ao NSQ.

Estímulos não-fóticos, tal como a interação social, podem afetar a atividade neuronal do NSQ por meio de projeções aferentes originadas do IGL e rafe medial, ou indiretamente do núcleo da rafe dorsal. Deste modo, alguns neuropeptídeos têm sido associados com o arrastamento por estímulo não-fóticos: neuropeptídeo Y (NPY); a partir a IGL e a serotonina (5-HT); a partir do

núcleo dorsal/medial da rafe (YANNIELLI; HARRINGTON, 2004; GLASS et al., 2010; MISTLBERGER; ANTLE, 2011). Uma vez que as projeções aferentes vindas dessas duas regiões alcançam principalmente a região VL do NSQ (ABRAHAMSON; MOORE, 2001), é possível sugerir que a perda da interação social possa provocar alterações na atividade ou na transmissão sináptica entre essas regiões e o NSQ.

Além disso, a 5-HT é considerada um importante neurotransmissor envolvido no funcionamento do relógio central, visto que o NSQ é densamente innervado por projeções serotoninérgicas provenientes do núcleo mediano da rafe (MORIN; BLANCHARD; MUSCAT, 2006). Ratos adultos alojados individualmente por cinco semanas apresentam mudanças significativas no ritmo circadiano de 5HT no hipotálamo, no qual foi observado um atraso de fase no seu horário de pico, e no seu precursor triptofano e metabólito ácido 5-hidroxiindoleacético (5HIAA) ocorreu avanço de fase, sendo tais alterações revertidas pelo tratamento com o antidepressivo tricíclico imipramina (GRECO et al., 1989, 1990).

Já foi descrito que o isolamento social pode acarretar em diminuição na densidade de receptores serotoninérgicos em diversas regiões cerebrais, incluindo o hipotálamo (SCHILLER et al., 2003), os quais já foram identificados no NSQ, como os receptores 5-HT_{1A} (autoreceptor de neurônios serotoninérgicos ou pós-sináptico) e 5-HT_{2A} (pós-sináptico) (DUDLEY; DINARDO; GLASS, 1998; MISTLBERGER; ANTLE, 2011). Adicionalmente, o receptor 5-HT_{1A} (e 5-HT₇) parece ser importante para a magnitude da mudança de fase induzida pela luz e por estímulos não-fóticos (através da administração do agonista de 5-HT_{1A/7}) (DUDLEY; DINARDO; GLASS, 1998; MISTLBERGER; ANTLE, 2011; HORIKAWA et al., 2000; YANNIELLI; HARRINGTON, 2004; MISTLBERGER; ANTLE; MILLER, 2000). Diante dessas informações, é possível que as alterações na atividade neuronal do NSQ observados nesse trabalho tenham sido ocasionadas por alterações na transmissão serotoninérgica a nível hipotalâmico.

O isolamento social interferiu com a plasticidade do sistema circadiano em se ajustar às alterações no foto-período. Os animais isolados ajustaram o

seu *onset* de ALE mais rapidamente após um adiantamento (avanço) no horário em que as luzes foram acesas. Estes resultados mostram que a falta da pista social permite uma resposta mais rápida do sistema à pista de luz, indicando uma modulação entre os *zeitgeber* fóticos e não fóticos na geração dos ritmos de ALE.

A expressão de VIP no NSQ é prontamente aumentada em resposta à luz, gerando ajustes de fase entre os neurônios do NSQ e reposta de arraste ao novo ciclo de luz no animal como um todo, por meio das eferências do NSQ para várias regiões cerebrais (VOSKO et al., 2007). A administração de VIP diretamente no NSQ induz um ajuste mais rápido do *onset* de ALE após 8 horas avanço de fase (AN et al., 2013), resultado semelhante ao observado em nossos experimentos, onde o isolamento social levou ao um ajuste mais rápido no protocolo de *Jet lag*. Outro trabalho demonstra a influência de receptores vasopressinérgicos sobre o foto-arrastamento. Camundongos tratados com antagonista dos receptores V1a e V1b e camundongos nocautes para ambos os receptores também arrastam seu ritmo de ALE mais rapidamente do que os animais selvagens após avanço de fase (YAMAGUCHI et al., 2013). Estes dados da literatura indicam que uma perturbação na sincronia entre os neurônios do NSQ, via alteração de VIP ou AVP, pode induzir alterações no arrastamento fótico em roedores, levando a hipótese de que o isolamento social possa ter provocado tais perturbações (AN et al., 2013; YAMAGUCHI, 2013).

O impacto da dessincronização do relógio biológico sobre comportamentos relacionados ao humor já foi analisado na literatura. Ratos mantidos por oito semanas em condições de luz constante apresentam um comportamento tipo ansioso e tipo depressivo ainda mais acentuado em relação aos animais mantidos em escuro constante pelo mesmo período de tempo. Além disso, esses animais apresentam uma nítida dessincronização do relógio biológico, representada pela perda do ritmo de atividade locomotora; de secreção de corticosterona e melatonina; e diminuída expressão de c-Fos no NSQ, resultados que indicam uma possível perda da função do marcapasso central de sincronizar a ritmicidade como um relógio biológico (TAPIA-OSORIO et al., 2013). Outro exemplo de como a perturbação do relógio biológico pode

acarretar em alterações comportamentais, vem do trabalho de LeGates et al. (2012), no qual camundongos expostos a um ciclo de luz e escuridão anormal com duração de 7 horas (3.5:3.5h claro/escuro) apresentam um comportamento tipo depressivo além de déficits cognitivos. Apesar disso, mantiveram o ritmo circadiano de liberação de corticosterona e não apresentaram alteração na ritmicidade do relógio central ou periférico. No entanto, esse controle no humor e na cognição pela luz ocorre, possivelmente, por uma via envolvendo as ipRGCs, uma vez que camundongos nocautes para estas células não apresentaram tais alterações comportamentais durante o ciclo anormal, indicando que estas células influenciam áreas cerebrais do sistema límbico envolvidos no controle do humor e cognição.

Demonstramos que, o isolamento social por 4 semanas leva a comportamento de desamparo aprendido e hedônico, além de alterações importantes no funcionamento do sistema circadiano. Dentre estas alterações destacamos a perda da atividade temporal dos neurônios do NSQ, a perda de sincronia de fase entre os ritmos de ALE e T_{interna} , e o rápido ajuste a um adiantamento do fotoperíodo. Nossos resultados ampliam o entendimento do funcionamento do sistema circadiano do ponto de vista da interpretação dos organismos às pistas ambientais, além de ampliar o escopo dos mecanismos que estão alterados em alterações comportamentais relacionadas ao humor.

7. CONCLUSÃO

A figura 21 ilustra o papel dos diferentes *zeitgeber* não-fóticos (interação social, exercício, hormônios, atividade locomotora, temperatura corporal, alimentação) sobre o sistema circadiano. A luz é o principal *zeitgeber* externo, responsável por sincronizar, via NSQ, os demais *zeitgebers*, os quais, por sua vez atuam como agentes reforçadores dos ritmos circadianos dos diferentes órgãos (tecido adiposo, trato gastrointestinal, adrenal, músculo, áreas do sistema nervoso central). Mostramos de forma pioneira o impacto da falta de um agente sincronizador sobre outros agentes, tais como os ritmos de atividade/repouso e de temperatura corporal, bem como sobre a atividade do NSQ. A falta de um ou de vários destes sincronizadores observada pelos hábitos contemporâneos (sedentarismo, trabalhos noturnos, estresse, perturbação do sono, dietas ricas em gordura e açúcar, alimentação em horários inapropriados, uso exacerbado de mídias sociais) prejudica o funcionamento do sistema circadiano. Nosso estudo também acrescenta o isolamento social como um fator que pode prejudicar este funcionamento.

Frente aos resultados observados neste trabalho, concluímos que, em camundongos, a perda da interação social induz perturbações no relógio biológico e afeta o mecanismo de foto-arrastamento, possivelmente devido a perturbações na função do relógio central, podendo contribuir para a causa de alterações relacionadas ao humor.

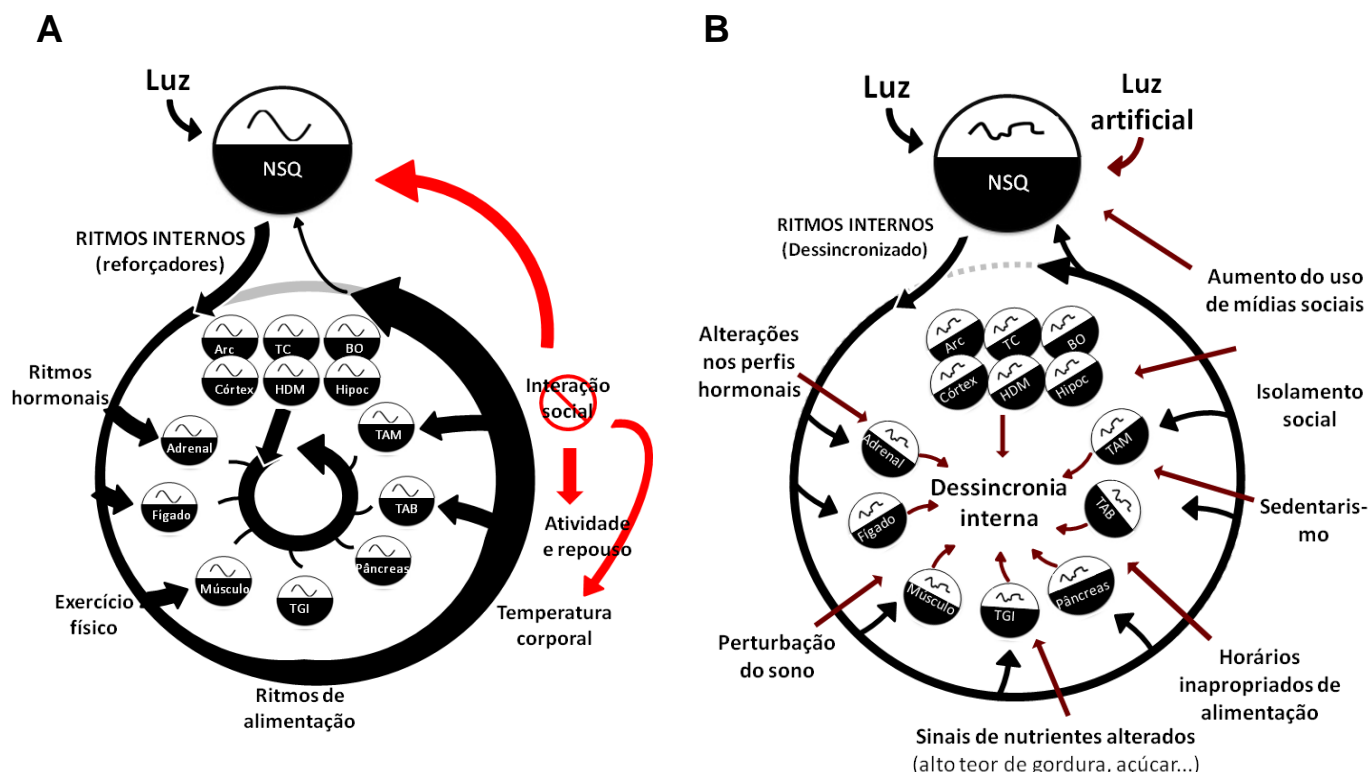


Figura 21: Participação dos *zeitgebers* não-fóticos, como agentes reforçadores que potencializam a sincronização do sistema circadiano. **Painel A:** O NSQ é sincronizado principalmente pelo ciclo de luz e escuridão ambiental, que compreende o principal sincronizador do sistema circadiano. O NSQ, por sua vez, encaminha informações temporais para outras regiões do cérebro, bem como para tecidos periféricos. Tais osciladores periféricos são arrastados pelo NSQ, e complementam a propagação e a fisiologia de determinados ritmos internos, tais como os ritmos hormonais, atividade e repouso (ou sono e vigília), temperatura corporal, alimentação e interação social. Estes ritmos, por sua vez, atuam como agentes (ou *zeitgebers*) reforçadores da sincronização do relógio biológico com o meio externo, sendo que a importância e o impacto destes diferentes *zeitgebers* serão específicos para tipos de células, tecidos, organismos e ambientes. No presente trabalho, investigamos o impacto da perda de um dos agentes reforçadores do relógio, a interação social, sobre a atividade do relógio central e sobre dois outros agentes, o ritmo de atividade e repouso e de temperatura corporal em camundongos (indicados pelas **setas vermelhas**). O aumento na espessura da seta preta circular significa que, à medida que os diferentes ritmos internos ocorrem de maneira adequada e alinhada com o meio externo, maior será a sincronia e mais adequado será o funcionamento do relógio biológico. **Painel B:** O estilo de vida contemporâneo tem contribuído para a instabilidade dos *zeitgebers* externos e internos. A exposição aos *zeitgebers* em horários inadequados, ou seja, fora da fase do relógio, faz com que os vários ritmos controlados pelo relógio sejam arrastados para a fase de exposição a estes *zeitgebers*, causando assim um desalinhamento do relógio biológico com o ambiente. Isto resulta em perturbação na função antecipatória do relógio biológico, prejudicando a resposta de arrastamento diante de mudanças no ambiente, bem como dessincronização interna do relógio biológico como um todo. (Adaptado de West e Bechtold, 2015). Arc, núcleo arqueado; TC, tronco cerebral, BO, bulbo olfatório; HDM, hipotálamo dorso-medial, Hipoc, Hipocampo; TGI, trato gastrointestinal; TAB, tecido adiposo branco; TAM, tecido adiposo marrom.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAMSON, E.; MOORE, R. Y. Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. **Brain Research**, v. 916, n. 1-2, p.172-191, 2001.

ALBRECHT, U. Timing to Perfection: The Biology of Central and Peripheral Circadian Clocks. **Neuron**, v. 74, n. 2, p.246-260, 2012.

ALBRECHT, U.; EICHELE, G.. The mammalian circadian clock. **Current Opinion In Genetics & Development**, v. 13, n. 3, p.271-277, 2003.

AN, S. et al. A neuropeptide speeds circadian entrainment by reducing intercellular synchrony. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 110, n. 46, p. 4355-4361, 2013.

ASCHOFF, J. et al. Human Circadian Rhythms in Continuous Darkness: Entrainment by Social Cues. **Science**, v. 171, n. 3967, p.213-215, 1971.

BALSALOBRE, A.; DAMIOLA, F.; SCHIBLER, U. A Serum Shock Induces Circadian Gene Expression in Mammalian Tissue Culture Cells. **Cell**, v. 93, n. 6, p.929-937, 1998.

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.

BERRY, A. et al. Social deprivation stress is a triggering factor for the emergence of anxiety- and depression-like behaviours and leads to reduced brain BDNF levels in C57BL/6J mice. **Psychoneuroendocrinology**, v. 37, n. 6, p. 762-772, 2012.

BLOCH, G. et al. Socially synchronized circadian oscillators. **Proceedings Of The Royal Society B: Biological Sciences**, v. 280, n. 1765, p.20130035-20130035, 2013.

BOLLINGER, T; SCHIBLER, U. Circadian rhythms – from genes to physiology and disease. **Swiss Medical Weekly**, p.1-11, 2014.

Bovet, J.; Oertli, E. F. Free-running Circadian Activity Rhythms in Free-living Beaver (*Castor canadensis*). **J. comp. Physiol.**, v. 92, p. 1-10, 1974.

BRENES, J. C.; FORNAGUERA, J. The effect of chronic fluoxetine on social isolation-induced changes on sucrose consumption, immobility behavior, and on serotonin and dopamine function in hippocampus and ventral striatum. **Behavioural Brain Research**, v. 198, n. 1, p.199-205, 2009.

BROWN, S. A et al. Rhythms of Mammalian Body Temperature Can Sustain Peripheral Circadian Clocks. **Current Biology**, v. 12, n. 18, p.1574-1583, 2002.

BUHR, E. D.; YOO, S. H.; TAKAHASHI, J. S. Temperature as a universal resetting cue for mammalian circadian oscillators. **Science**, v. 330, n. 6002, p. 79-385, 2010.

CHAN, J. N. M. et al. Interaction Effect of Social Isolation and High Dose Corticosteroid on Neurogenesis and Emotional Behavior. **Frontiers In Behavioral Neuroscience**, v. 11, p.1-10, 2017.

CHENG, M. Y. et al. Prokineticin 2 transmits the behavioural circadian rhythm of the suprachiasmatic nucleus. **Nature**, v. 417, n. 6887, p. 405-410, 2002.

COHEN, S. et al. Social Ties and Susceptibility to the Common Cold. **Jama: The Journal of the American Medical Association**, v. 277, n. 24, p.1940-1944, 1997.

COUDEREAU, J-P. et al. Effect of social isolation on the metabolism of morphine and its passage through the blood-brain barrier and on consumption of sucrose solutions. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 144, n. 3, p. 198-204, 1999.

CROWLEY, M.; BOVET, J. Social Synchronization of Circadian Rhythms in Deer Mice (*Peromyscus maniculatus*). **Behav. Ecol. Sociobiol**, v. 7, p. 99-105, 1980.

CRYAN, J. F.; MARKOU, A.; LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends Pharmacol Sci**, v. 23, n. 5, p. 238-45, 2002.

DAMIOLA, F. Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. **Genes & Development**, v. 14, n. 23, p.2950-2961, 2000.

DAMIOLA, F. Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. **Genes & Development**, v. 14, n. 23, p.2950-2961, 2000.

DAVIS, F. C.; GORSKI, R. A. Development of Hamster Circadian Rhythms. I. Within-Litter of Mother and Pup Activity Rhythms at Weaning. **Biology Of Reproduction**, v. 33, p. 353-362, 1985.

DAVIS, F. C.; STICE, S.; MENAKER, M. Activity and reproductive state in the hamster: independent control by social stimuli and a circadian pacemaker. **Physiol Behav**, v. 40, n. 5, p. 583-90, 1987.

DEROCHE, V. et al. Stress-induced sensitization to amphetamine and morphine psychomotor effects depend on stress-induced corticosterone secretion. **Brain Research**, v. 598, n. 1-2, p. 343-348, 1992.

DUDLEY, T. E.; DINARDO, L. A.; GLASS, J. D. Endogenous regulation of serotonin release in the hamster suprachiasmatic nucleus. **J Neurosci**, v. 18, n. 13, p. 5045-52, 1998.

DUFFY, J. F.; KRONAUER, R.; A CZEISLER, C. Phase-shifting human circadian rhythms: influence of sleep timing, social contact and light exposure.. **The Journal Of Physiology**, v. 495, n. 1, p.289-297, 1996.

EDGAR, N., MCCLUNG, C. A.. Major depressive disorder: A loss of circadian synchrony?. **Bioessays**, v. 35, n. 11, p.940-944, 2013.

EHLERS, C L; FRANK E., KUPFER D. J. Social Zeitgebers and Biological Rhythms. **Archives Of General Psychiatry**, v. 45, n. 10, p.948-952, 1 out. 1988.

FAVREAU, A. et al. Social influences on circadian behavioural rhythms in vertebrates. **Animal Behaviour**, v. 77, n. 5, p.983-989, 2009.

FRANK, E.; SWARTZ, H.; KUPFER, D. J. Interpersonal and social rhythm therapy: managing the chaos of bipolar disorder. **Biological Psychiatry**, v. 48, n. 6, p.593-604, 2000.

GAVRILOVIC, L.; SPASOJEVIC, N.; DRONJAK, S. Chronic Individual Housing-Induced Stress Decreased Expression of Catecholamine Biosynthetic Enzyme Genes and Proteins in Spleen of Adult Rats. **Neuroimmunomodulation**, v. 17, n. 4, p. 265-269, 2010

GLASS, J. D. et al. On the intrinsic regulation of neuropeptide Y release in the mammalian suprachiasmatic nucleus circadian clock. **European Journal Of Neuroscience**, v. 31, n. 6, p.1117-1126, 2010.

GOEL, N.; LEE, T. M.. Olfactory Bulbectomy Impedes Social but Not Photic Reentrainment of Circadian Rhythms in Female Octodon degus. **Journal Of Biological Rhythms**, v. 12, n. 4, p.362-370, 1997.

GOLOMBEK, D. A.; ROSENSTEIN, R. E.. Physiology of Circadian Entrainment. **Physiological Reviews**, v. 90, n. 3, p.1063-1102, 2010.

GOVERNALE, M. M.; LEE, T. M.. Olfactory Cues Accelerate Reentrainment following Phase Shifts and Entrain Free-Running Rhythms in Female Octodon degus (Rodentia). **Journal Of Biological Rhythms**, v. 16, n. 5, p.489-501, 2001.

GRANDIN, L. D.; ALLOY, L. B.; ABRAMSON, L. Y. The social zeitgeber theory, circadian rhythms, and mood disorders: Review and evaluation. **Clinical Psychology Review**, v. 26, n. 6, p.679-694, 2006.

GRECO, A. M. et al. Circadian rhythms of hypothalamic norepinephrine and of some circulating substances in individually housed adult rats. **Physiol Behav**, v. 52, n. 6, p. 1167-72, 1992.

GRECO, A.M., et al. Effects of individual housing on circadian rhythms of adult rats. **Physiol Behav**, v. 45, n. 2, p. 363-6, 1989.

GRECO, A.M., et al., Chronic administration of imipramine antagonizes deranged circadian rhythm phases in individually housed rats. **Physiol Behav**, v. 48, n. 1, p. 67-72, 1990.

GRIPPO, A. J. et al. Social isolation induces behavioral and neuroendocrine disturbances relevant to depression in female and male prairie voles. **Psychoneuroendocrinology**, v. 32, n. 8-10, p.966-980, 2007.

GRIPPO, A. J., et al., The effects of environmental enrichment on depressive and anxiety-relevant behaviors in socially isolated prairie voles. **Psychosom Med**, v. 76, n. 4,p. 277-84, 2014.

GUZMAN-RUIZ, M. A. et al. Role of the Suprachiasmatic and Arcuate Nuclei in Diurnal Temperature Regulation in the Rat. **Journal Of Neuroscience**, v. 35, n. 46, p.15419-15429, 2015.

HÄFNER, S. et al. Social isolation and depressed mood are associated with elevated serum leptin levels in men but not in women. **Psychoneuroendocrinology**, v. 36, n. 2, p. 200-209, 2011.

HALL, F. S. Social deprivation of neonatal, adolescent, and adult rats has distinct neurochemical and behavioral consequences. **Crit Rev Neurobiol**, v. 12, n. 1-2, p. 129-62, 1998.

HATTAR, S. et al. Central projections of melanopsin-expressing retinal ganglion cells in the mouse. **The Journal Of Comparative Neurology**, v. 497, n. 3, p. 326-349, 2006.

HATTAR, S. Melanopsin-Containing Retinal Ganglion Cells: Architecture, Projections, and Intrinsic Photosensitivity. **Science**, v. 295, n. 5557, p.1065-1070, 2002.

HOLLIS, F.; KABBAJ, M. Social Defeat as an Animal Model for Depression. **Ilar Journal**, v. 55, n. 2, p.221-232, 2014.

HOLT-LUNSTAD, J; SMITH, T. B.; LAYTON, J. B. Social Relationships and Mortality Risk: A Meta-analytic Review. **Plos Medicine**, v. 7, n. 7, p.1-20, 2010.

HONG, S. et al. Social isolation in adolescence alters behaviors in the forced swim and sucrose preference tests in female but not in male rats. **Physiology & Behavior**, v. 105, n. 2, p. 269-275, jan. 2012.

HONMA, S. et al. Rhythms in behaviors, body temperature and plasma corticosterone in SCN lesioned rats given methamphetamine. **Physiol Behav**, v. 44, n. 2, p. 247-55, 1988.

HORIKAWA, K. et al. Nonphotic entrainment by 5-HT_{1A/7} receptor agonists accompanied by reduced *Per1* and *Per2* mRNA levels in the suprachiasmatic nuclei. **J Neurosci**, v. 20, n. 15, p. 5867-73. 2000.

HUSSE, J.; EICHELE, G.; OSTER, H. Synchronization of the mammalian circadian timing system: Light can control peripheral clocks independently of the SCN clock. **Bioessays**, v. 37, n. 10, p.1119-1128, 2015.

IERACI, A. ; MALLEI, A. ; POPOLI, M. Social Isolation Stress Induces Anxious-Depressive-Like Behavior and Alterations of Neuroplasticity-Related Genes in Adult Male Mice. **Neural Plasticity**, v. 2016, p.1-13, 2016.

JÁC, M.; SUMOVÁ, A.; ILLNEROVÁ, H. c-Fos rhythm in subdivisions of the rat suprachiasmatic nucleus under artificial and natural photoperiods. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 279, n. 6, p. 2270-6, 2000.

JECHURA, T. J.; STIMPSON, C. D.; LEE, T. M. Odor-facilitated reentrainment in male and female juvenile *Octodon degus*. **Physiology & Behavior**, v. 89, n. 5, p.617-622, 2006.

KALSBECK, A. et al. Circadian rhythms in the hypothalamo–pituitary–adrenal (HPA) axis. **Molecular And Cellular Endocrinology**, v. 349, n. 1, p.20-29, 2012.

KALSBECK, A.; FLIERS, E. Daily Regulation of Hormone Profiles. **Circadian Clocks**, p.185-226, 2013.

Kamal, A., et al., Announced reward counteracts the effects of chronic social stress on anticipatory behavior and hippocampal synaptic plasticity in rats. **Exp Brain Res**, v. 201, n. 4, p. 641-51, 2010.

KARKHANIS, A. N. et al. Social Isolation Rearing Increases Nucleus Accumbens Dopamine and Norepinephrine Responses to Acute Ethanol in Adulthood. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 38, n. 11, p. 2770-2779, 2014.

KAVALIERS, M. Social Groupings and Circadian Activity of the Killifish, *Fundulus heteroclitus*. **Biological Bulletin**, v. 158, n. 1, pp. 69-76, 1980.

KECKLUND, G.; AXELSSON, J. Health consequences of shift work and insufficient sleep. **Bmj**, p.1-13, 2016.

KWAK, C.; LEE, S-H; KAANG, B-K. Social Isolation Selectively Increases Anxiety in Mice without Affecting Depression-like Behavior. **The Korean Journal Of Physiology And Pharmacology**, v. 13, n. 5, p. 357-360, 2009.

KYRIACOU, C. P.; HASTINGS, M. H.. Circadian clocks: genes, sleep, and cognition. **Trends In Cognitive Sciences**, v. 14, n. 6, p.259-267, 2010.

LANDER, S. S.; LINDER-SHACHAM, D.; GAISLER-SALOMON, I. Differential effects of social isolation in adolescent and adult mice on

behavior and cortical gene expression. **Behavioural Brain Research**, v. 316, p. 245-254, 2017.

LEGATES, T. A. et al. Aberrant light directly impairs mood and learning through melanopsin-expressing neurons. **Nature**, v. 491, n. 7425, p.594-598, 2012.

LESER, N.; WAGNER, S. The effects of acute social isolation on long-term social recognition memory. **Neurobiology Of Learning And Memory**, v. 124, p.97-103, 2015.

LEVENSON, J. C et al. Social rhythm disrupting events increase the risk of recurrence among individuals with bipolar disorder. **Bipolar Disorders**, v. 17, n. 8, p. 869-879, 2015.

LI, J-D et al. Vasopressin receptor V1a regulates circadian rhythms of locomotor activity and expression of clock-controlled genes in the suprachiasmatic nuclei. **Ajp: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 296, n. 3, p.824-830, 2008

LI, J-D. et al. Attenuated Circadian Rhythms in Mice Lacking the Prokineticin 2 Gene. **Journal Of Neuroscience**, v. 26, n. 45, p.11615-11623, 2006.

LI, X. et al. The Dorsal Rafe Nucleus Receives Afferents From Alpha-Like Retinal Ganglion Cells and Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cells in the Rat. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 56, n. 13, p.8373-8381, 2015.

LIEBERWIRTH, C. et al. Social isolation impairs adult neurogenesis in the limbic system and alters behaviors in female prairie voles. **Hormones And Behavior**, v. 62, n. 4, p.357-366, 2012.

LIEVERSE, R. et al. Social Support and Social Rhythm Regularity in Elderly Patients with Major Depressive Disorder. **The American Journal Of Geriatric Psychiatry**, v. 21, n. 11, p.1144-1153, 2013.

LIMA, L.; VARGAS, N. O Relógio Biológico e os ritmos circadianos de mamíferos: uma contextualização histórica. **Revista da Biologia**, v. 12, n. 2, p.1-7, 2014.

LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 92, n. 2, p. 180-5, 1987.

LOPEZ, M. F.; LABER, K. Impact of social isolation and enriched environment during adolescence on voluntary ethanol intake and anxiety in C57BL/6J mice. **Physiology & Behavior**, v. 148, p.151-156, 2015.

LOPEZ, M. F.; DOREMUS-FITZWATER, T. L.; BECKER, H. C.. Chronic social isolation and chronic variable stress during early development induce

later elevated ethanol intake in adult C57BL/6J mice. **Alcohol**, v. 45, n. 4, p. 355-64, 2011.

LYONS, D. M.; HA, C. M. G.; LEVINE, S. Social Effects and Circadian Rhythms in Squirrel Monkey Pituitary--Adrenal Activity. **Hormones And Behavior**, v. 29, n. 2, p.177-190, 1995.

MA, X-C. et al. Social Isolation-Induced Aggression Potentiates Anxiety and Depressive-Like Behavior in Male Mice Subjected to Unpredictable Chronic Mild Stress. **Plos One**, v. 6, n. 6, p.1-7, 17, 2011.

MARIMUTHU, G.; RAJAN, S.; CHANDRASHEKARAN, M.K. Social Entrainment of the Circadian Rhythm in the Flight Activity of the Microchiropteran Bat *Hipposideros speoris*. **Behav Ecol Sociobiol**, v. 8, p. 147-150, 1981.

MARKWELL, E. L; FEIGL, B.; ZELE, A. J. Intrinsically photosensitive melanopsin retinal ganglion cell contributions to the pupillary light reflex and circadian rhythm. **Clinical And Experimental Optometry**, v. 93, n. 3, p.137-149, 2010.

MARQUES, M D; GOLOMBEK, D; MORENO, C Adaptação Temporal. In: MARQUES, N; MENNA-BARRETO, L (Orgs). **Cronobiologia: Princípios e Aplicações**. 2. ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1999. Cap. 3. p. 56-98.

MATTHEWS, T. et al. Social isolation, loneliness and depression in young adulthood: a behavioural genetic analysis. **Social Psychiatry And Psychiatric Epidemiology**, v. 51, n. 3, p.339-348, 2016.

MEERLO, et al. Changes in daily rhythms of body temperature and activity after a single social defeat in rats. **Physiology & Behavior**, v. 59, n. 4-5, p.735-739, 1996.

MEERLO, et al. Stress-induced changes in circadian rhythms of body temperature and activity in rats are not caused by pacemaker changes. **Journal of biological rhythms**, v. 12, n. 1, p. 80-92, 1997.

MEERLO, P.; DAAN, S. Aggressive and Sexual Social Stimuli Do not Phase Shift the Circadian Temperature Rhythm in Rats. **Chronobiology International**, v. 15, n. 3, p.231-240, 1998.

MEERLO, P.; SGOIFO, A.; TUREK, F. W. The Effects of Social Defeat and Other Stressors on the Expression of Circadian Rhythms. **Stress**, v. 5, n 1, p. 15–22, 2002.

MIACHON, S. et al. Long-term isolation of Wistar rats alters brain monoamine turnover, blood corticosterone, and ACTH. **Brain Res Bull**, v. 32, n. 6, p. 611-4, 1993.

MIEDA, M. et al. Cellular Clocks in AVP Neurons of the SCN Are Critical for Interneuronal Coupling Regulating Circadian Behavior Rhythm. **Neuron**, v. 85, n. 5, p. 1103-1116, 2015.

MILLER, J. P.; MCAULEY, J. D.; PANG, K. C. H. Spontaneous fos expression in the suprachiasmatic nucleus of young and old mice. **Neurobiology Of Aging**, v. 26, n. 7, p.1107-1115, 2005.

MINAMI, S. et al. Suppression of reward-induced dopamine release in the nucleus accumbens in animal models of depression: Differential responses to drug treatment. **Neuroscience Letters**, v. 650, p. 72-76, 2017.

MISTLBERGER, R. E.; ANTLE, M. C.; MILLER, G. J. D. et al. Behavioral and Serotonergic Regulation of Circadian Rhythms. **Biological Rhythm Research**, v. 31, n. 3, p. 240-283, 2000.

MISTLBERGER, R. E.; SKENE, D. J.. Social influences on mammalian circadian rhythms: animal and human studies. **Biological Reviews**, v. 79, n. 3, p.533-556, 2004.

MISTLBERGER, R.; ANTEL, M C. Entrainment of circadian clocks in mammals by arousal and food. **Essays In Biochemistry**, v. 49, p.119-136, 2011.

MOHAWK; G.; TAKAHASHI. Central and Peripheral Circadian Clocks in Mammals. **Annual Review Of Neuroscience**, v. 35, n. 1, p.445-462, 2012.

MONTEIRO, B. M. M. et al. Enriched environment increases neurogenesis and improves social memory persistence in socially isolated adult mice. **Hippocampus**, v. 24, n. 2, p.239-248, 2013.

MOORE, R. Y.; EICHLER, V. B.. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. **Brain Research**, v. 42, n. 1, p.201-206, 1972.

MOORE, R. Y.; LENN, N. J. A retinohypothalamic projection in the rat. **The Journal Of Comparative Neurology**, v. 146, n. 1, p.1-14, 1972.

MORAN-RAMOS, Sofía et al. When to eat? The influence of circadian rhythms on metabolic health: are animal studies providing the evidence?. **Nutrition Research Reviews**, v. 29, n. 02, p.180-193, 1 jul. 2016.

MORIN, L. P. et al. Complex organization of mouse and rat suprachiasmatic nucleus. **Neuroscience**, v. 137, n. 4, p. 1285-1297, 2006.

MROSOVSKY, N. Locomotor Activity And Non-Photic Influences On Circadian Clocks. **Biological Reviews**, v. 71, n. 3, p.343-372, 1996.

MROSOVSKY, N. Phase response curves for social entrainment. **J Comp Physiol A.**, v. 162, n. 1, p. 35-46, 1988.

MURPHY, Z. C. et al. Effects of Ovarian Hormones on Internal Circadian Organization in Rats. **Biology Of Reproduction**, v. 89, n. 2, p.1-9, 2013.

NAGASHIMA, K. et al. Neuronal circuitries involved in thermoregulation. **Autonomic Neuroscience**, v. 85, n. 1-3, p. 18-25, 2000.

OHNSON, S. A.; FOURNIER, N. M.; KALYNCHUK, L. E.. Effect of different doses of corticosterone on depression-like behavior and HPA axis responses to a novel stressor. **Behavioural Brain Research**, v. 168, n. 2, p. 280-288, 2006.

OKAMURA, H.; YAMAGUCHI, S.; YAGITA, K. Molecular machinery of the circadian clock in mammals. **Cell And Tissue Research**, v. 309, n. 1, p.47-56, 2002.

OSTER, H. et al. The functional and clinical significance of the 24-h rhythm of circulating glucocorticoids. **Endocrine Reviews**, p. 3-1080, 2016.

PANDA, S. Melanopsin Is Required for Non-Image-Forming Photoc Responses in Blind Mice. **Science**, v. 301, n. 5632, p.525-527, 2003.

PANDA, S. Melanopsin Is Required for Non-Image-Forming Photoc Responses in Blind Mice. **Science**, v. 301, n. 5632, p.525-527, 2003.

PAUL, M. J.; INDIC, P.; SCHWARTZ, W. J.. A role for the habenula in the regulation of locomotor activity cycles. **European Journal Of Neuroscience**, v. 34, n. 3, p.478-488, 2011.

PAXINOS, G.; FRANKLIN, K. B. J. The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. 2^a ed. Orlando, Florida. **Academic Press**, 1997.

PELLOW, S. et al. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal Of Neuroscience Methods**, v. 14, n. 3, p.149-167, 1985.

PERELLÓ, M. et al. Effect of social isolation on 24-h pattern of stress hormones and leptin in rats. **Life Sciences**, v. 78, n. 16, p.1857-1862, 2006.

PEZUK, P. et al. Circadian Organization Is Governed by Extra-SCN Pacemakers. **Journal Of Biological Rhythms**, v. 25, n. 6, p. 432-441, 2010.

PEZÜK, P. et al. Glucocorticoids as Entraining Signals for Peripheral Circadian Oscillators. **Endocrinology**, v. 153, n. 10, p. 4775-4783, 2012.

POLLAK, D. D.; REY, C. E.; MONJE, F. J.. Rodent models in depression research: Classical strategies and new directions. **Annals Of Medicine**, v. 42, n. 4, p. 252-264, 2010.

PORSOLT R. D., MARTIN P., LENÈGRE A., FROMAGE S., DRIEU K. Effects of an extract of Ginkgo Biloba (EGB 761) on "learned helplessness" and other models of stress in rodents. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 36, n. 4, p. 963-71, 1990.

PROVENCIO, I.; ROLLAG, M. D.; CASTRUCCI, A. M. Anatomy Photoreceptive net in the mammalian retina. **Nature**, v. 415, n. 6871, p.493-493, 2002.

RADETSKY, L. C. et al. Circadian Disruption: comparing humans with mice. **Chronobiology International**, v. 30, n. 8, p.1066-1071, 2013.

RALPH, M. et al. Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. **Science**, v. 247, n. 4945, p.975-978, 1990.

REEBS S. G.; MROSOVSKY N. Large phase-shifts of circadian rhythms caused by induced running in a re-entrainment paradigm: the role of pulse duration and light. **J Comp Physiol A**, v. 165, n. 6, p. 819-25, 1989.

REFINETTI, R.; MENAKER, M. Body temperature rhythm of the tree shrew, *Tupaia belangeri*. **Journal Of Experimental Zoology**, v. 263, n. 4, p. 453-457, 1992.

REGAL, P. J.; CONNOLLY, M. S. Social Influences on Biological Rhythms. **BRILL**, v. 72, n. 3-4, p. 171-199, 1980

REID, K. J.; ABBOTT, S. M.. Jet Lag and Shift Work Disorder. **Sleep Medicine Clinics**, v. 10, n. 4, p.523-535, 2015.

REN, P. et al. Prokineticin 2 Regulates the Electrical Activity of Rat Suprachiasmatic Nuclei Neurons. **Plos One**, v. 6, n. 6, p.1-7, 2011.

REPPERT, S. M.; SCHWARTZ, W. J. Maternal suprachiasmatic nuclei are necessary for maternal coordination of the developing circadian system. **Journal of Neuroscience**, v. 6, n. 9, p. 2724-2729, 1986.

REPPERT, S. M.; WEAVER, D. R.. Coordination of circadian timing in mammals. **Nature**, v. 418, n. 6901, p.935-941, 2002.

REZAI-ZADEH, K. et al. Leptin receptor neurons in the dorsomedial hypothalamus are key regulators of energy expenditure and body weight, but not food intake. **Molecular Metabolism**, v. 3, n. 7, p.681-693, 2014.

ROECKLEIN, K. A. et al. Melanopsin, photosensitive ganglion cells, and seasonal affective disorder. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 37, n. 3, p.229-239, 2013.

ROENNEBERG, T.; MERROW, M. Circadian clocks — the fall and rise of physiology. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 6, n. 12, p.965-971, 2005.

RYGULA, Rafal et al. Anhedonia and motivational deficits in rats: Impact of chronic social stress. **Behavioural Brain Research**, v. 162, n. 1, p.127-134, 2005.

SACK, R. L. et al. Circadian rhythm abnormalities in totally blind people: incidence and clinical significance.. **The Journal Of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 75, n. 1, p.127-134, 1992.

SAITO, V. M.; BRANDÃO, M. L.. The benzodiazepine midazolam acts on the expression of the defensive behavior, but not on the processing of aversive information, produced by exposure to the elevated plus maze and electrical stimulations applied to the inferior colliculus of rats. **Neuropharmacology**, v. 88, p.180-186, 2015.

SAKHI, K. et al. Intrinsic and extrinsic cues regulate the daily profile of mouse lateral habenula neuronal activity. **The Journal Of Physiology**, v. 592, n. 22, p.5025-5045, 2014.

SAKHI, K. et al. Intrinsic and extrinsic cues regulate the daily profile of mouse lateral habenula neuronal activity. **The Journal Of Physiology**, v. 592, n. 22, p. 5025-5045, 2014.

SARGIN, Derya; OLIVER, David K; LAMBE, Evelyn K. Chronic social isolation reduces 5-HT neuronal activity via upregulated SK3 calcium-activated potassium channels. **Elife**, [s.l.], v. 5, p.1-14, 22 nov. 2016.

SAYEGH, J. F. et al. Effects of social isolation and the time of day on testosterone levels in plasma of C57BL/6By and BALB/cBy mice. **Steroids**, v. 55, n. 2, p.79-82, 1990.

SCHILLER, L. et al. Autoradiographic analyses of 5-HT1A and 5-HT2A receptors after social isolation in mice. **Brain Research**, v. 980, n. 2, p. 169-178, 2003.

SCHNELL, A.; ALBRECHT, U.; SANDRELLI, F. Rhythm and mood: Relationships between the circadian clock and mood-related behavior.. **Behavioral Neuroscience**, v. 128, n. 3, p. 326-343, 2014.

SCHWARTZ, W. J. et al. Differential regulation of fos family genes in the ventrolateral and dorsomedial subdivisions of the rat suprachiasmatic nucleus. **Neuroscience**, v. 98, n. 3, p. 535-547, jun. 2000.

SCHWARTZ, W. J. et al. Temporal regulation of light-induced Fos and Fos-like protein expression in the ventrolateral subdivision of the rat suprachiasmatic nucleus. **Neuroscience**, v. 58, n. 3, p. 573-83, 1994.

SHAHAR-GOLD, H.; GUR, R.; WAGNER, S. Rapid and Reversible Impairments of Short- and Long-Term Social Recognition Memory Are Caused by Acute Isolation of Adult Rats via Distinct Mechanisms. **Plos One**, v. 8, n. 5, p.1-10, 31, 2013.

SHEN, G. H. et al. Social rhythm regularity and the onset of affective episodes in bipolar spectrum individuals. **Bipolar Disorders**, v. 10, n. 4, p.520-529, 2008.

SILVA, C. F. et al. Effects of social isolation and enriched environment on behavior of adult Swiss mice do not require hippocampal neurogenesis. **Behavioural Brain Research**, v. 225, n. 1, p. 85-90, 2011.

SOKOLOVE, P. G.; BUSHELL, W. N. The chi square periodogram: its utility for analysis of circadian rhythms. **J Theor Biol**, v. 72, n. 1, p. 131-160, 1978.

SOUETRE, E. et al. Twenty-four-hour profiles of body temperature and plasma TSH in bipolar patients during depression and during remission and in normal control subjects. **American Journal Of Psychiatry**, v. 145, n. 9, p. 1133-1137, 1988.

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

STEPHAN, F. K.; ZUCKER, I. Circadian Rhythms in Drinking Behavior and Locomotor Activity of Rats Are Eliminated by Hypothalamic Lesions. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 69, n. 6, p. 1583-6, 1972.

STEPTOE, A. et al. Social isolation, loneliness, and all-cause mortality in older men and women. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 110, n. 15, p.5797-5801, 2013.

STETLER, C; DICKERSON, S. S; E MILLER, G. E. Uncoupling of social zeitgebers and diurnal cortisol secretion in clinical depression. **Psychoneuroendocrinology**, v. 29, n. 10, p.1250-1259, 2004.

STRANAHAN, A. M; KHALIL, D.; GOULD, E. Social isolation delays the positive effects of running on adult neurogenesis. **Nature Neuroscience**, v. 9, n. 4, p.526-533, 2006.

SUJINO, M. et al. Suprachiasmatic Nucleus Grafts Restore Circadian Behavioral Rhythms of Genetically Arrhythmic Mice. **Current Biology**, v. 13, n. 8, p. 664-668, 2003.

SUMOVÁ, A. et al. Spontaneous rhythm in c-Fos immunoreactivity in the dorsomedial part of the rat suprachiasmatic nucleus. **Brain Research**, v. 801, n. 1-2, p.254-258, 1998.

SYLVIA, L. G. et al. Life Events and Social Rhythms in Bipolar Spectrum Disorders: A Prospective Study. **Behavior Therapy**, v. 40, n. 2, p.131-141, 2009.

TAHARA, Y.; AOYAMA, S.; SHIBATA, S. The mammalian circadian clock and its entrainment by stress and exercise. **The Journal Of Physiological Sciences**, v. 67, n. 1, p.1-10, 2016.

TAKATSU-COLEMAN, A. et al. Short-term social isolation induces depressive-like behaviour and reinstates the retrieval of an aversive task: Mood-congruent memory in male mice?. **Journal Of Psychiatry & Neuroscience**, v. 38, n. 4, p. 259-268, 2013.

TAPIA-OSORIO, A. et al. Disruption of circadian rhythms due to chronic constant light leads to depressive and anxiety-like behaviors in the rat. **Behavioural Brain Research**, v. 252, p.1-9, 2013.

THOMAS, K. A.; BURR, R. L.; SPIEKER, S. Light and maternal influence in the entrainment of activity circadian rhythm in infants 4–12 weeks of age. **Sleep And Biological Rhythms**, v. 14, n. 3, p.249-255, 2016.

TIMPER, K.; BRÜNING, J. C.. Hypothalamic circuits regulating appetite and energy homeostasis: pathways to obesity. **Disease Models & Mechanisms**, v. 10, n. 6, p. 679-689, 2017.

TSAI, S. Y. et al. Mother-Infant Activity Synchrony as a Correlate of the Emergence of Circadian Rhythm. **Biological Research For Nursing**, v. 13, n. 1, p.80-88, 2010.

VAN REETH, O.; TUREK, F. W. Stimulated activity mediates phase shifts in the hamster circadian clock induced by dark pulses or benzodiazepines. **Nature**, v. 339, n. 6219, p.49-51, 1989.

VISWANATHAN N.; CHANDRASHEKARAN, M. K. Cycles of presence and absence of mother mouse entrain the circadian clock of pups. **Nature**, v. 317, n. 6037, p. 530-1, 1985.

VISWANATHAN, N. Maternal entrainment in the circadian activity rhythm of laboratory mouse (C57BL/6J). **Physiol Behav.**, v. 68, n. 1-2, p. 157-62.

VITATERNA, M. H.; TAKAHASHI, J. S.; TUREK, F. W. Overview of circadian

VÕIKAR, V. et al. Long-term individual housing in C57BL/6J and DBA/2 mice: assessment of behavioral consequences. **Genes, Brain And Behavior**, v. 4, n. 4, p.240-252, 2004.

VOSKO, A. M. et al. Vasoactive intestinal peptide and the mammalian circadian system. **General And Comparative Endocrinology**, v. 152, n. 2-3, p. 165-175, 2007.

WALLACE, D. L. et al. CREB regulation of nucleus accumbens excitability mediates social isolation–induced behavioral deficits. **Nature Neuroscience**, v. 12, n. 2, p.200-209, 2009.

WEST, A. C.; BECHTOLD, D. A. The cost of circadian desynchrony: Evidence, insights and open questions. **Bioessays**, v. 37, n. 7, p. 777-788, 2015.

YAMAGUCHI, Y. et al. Mice Genetically Deficient in Vasopressin V1a and V1b Receptors Are Resistant to Jet Lag. **Science**, v. 342, n. 6154, p. 85-90, 2013.

YAMAZAKI, S. Resetting Central and Peripheral Circadian Oscillators in Transgenic Rats. **Science**, v. 288, n. 5466, p.682-685, 2000.

YANNIELLI, P.; HARRINGTON, M. E. Let there be “more” light: enhancement of light actions on the circadian system through non-photoc pathways. **Progress In Neurobiology**, v. 74, n. 1, p. 59-76, set. 2004.

ZALETEL, I.; FILIPOVIĆ, D.; PUŁKAŁ, N. Hippocampal BDNF in physiological conditions and social isolation. **Reviews In The Neurosciences**, v. 28, n. 6, p.1-18, 2017.

ZHANG, Y. et al. Social isolation produces anxiety-like behaviors and changes PSD-95 levels in the forebrain. **Neuroscience Letters**, v. 514, n. 1, p.27-30, 2012.

ZHOU, Q-Y; CHENG, M. Y. Prokineticin 2 and circadian clock output. **Febs Journal**, v. 272, n. 22, p. 5703-5709, 2005.