

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

**O DESACOPLAMENTO DO NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO ALTERA O
FENÓTIPO DA PORÇÃO VENTROLATERAL NA FASE ESCURA NA
DESSINCRONIZAÇÃO FORÇADA**

Dissertação de mestrado

Tamires Amorim Marinho

Belo Horizonte

2023

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

**O DESACOPLAMENTO DO NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO ALTERA O
FENÓTIPO DA PORÇÃO VENTROLATERAL NA FASE ESCURA NA
DESSINCRONIZAÇÃO FORÇADA**

Dissertação de mestrado

Tamires Amorim Marinho

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

Orientadora: Profa. Dra. Maristela Poletini

Belo Horizonte

2023

043

Marinho, Tamires Amorim.

O desacoplamento do núcleo supraquiasmático altera o fenótipo da porção ventrolateral na fase escura na dessincronização forçada [manuscrito] / Tamires Amorim Marinho. – 2023.

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

Orientadora: Profa. Dra. Maristela Poletini.

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

1. Farmacologia. 2. Ritmos circadianos. 3. Núcleo Supraquiasmático. 4. Peptídeo Intestinal Vasoativo. I. Poletini, Maristela. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612:615



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO N° 568 DE TAMIRES AMORIM MARINHO

Às 09:00 horas do dia 26 do mês de abril de 2023, no Transmiteda pela plataforma Google Meet, realizou-se a sessão pública para a defesa da Dissertação de Tamires Amorim Marinho. A presidência da sessão coube à Profa. Dra. Maristela de Oliveira Poletini, orientadora. Inicialmente, a presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: Profa. Dra. Maristela de Oliveira Poletini, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, Prof. Dr. Theo Rolla Paula Mota, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais e Profa. Dra. Maria Nathália de Carvalho M. M. Figueira Borges, DCB/UNIFESP. Em seguida, a candidata fez a apresentação do trabalho que constitui sua Dissertação de Mestrado, intitulada: "O Desacoplamento do Núcleo Supraquiasmático Altera O Fenótipo da Porção Ventrolateral na Fase Escura na Dessincronização Forçada". Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença da candidata e do público e decidiu considerar APROVADA a Dissertação de Mestrado. O resultado final foi comunicado publicamente a candidata pela presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, se aprovada, será assinada pela Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 26 de abril de 2023.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Maria Nathália de Carvalho Magalhães Moraes Figueira Borges, Usuária Externa**, em 09/05/2023, às 21:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maristela de Oliveira Poletini, Professora do Magistério Superior**, em 23/05/2023, às 15:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Theo Rolla Paula Mota, Professor do Magistério Superior**, em 30/05/2023, às 08:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 2274274 e o código CRC C17F7E7F.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO Nº 568 TAMIRES AMORIM MARINHO

"O Desacoplamento do Núcleo Supraquiasmático Altera O Fenótipo da Porção Ventrolateral na Fase Escura na Dessincronização Forçada"

TAMIRES AMORIM MARINHO

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia 26 de abril de 2023, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

Prof. Dr. Theo Rolla Paula Mota, ICB/UFMG

Profa. Dra. Maristela de Oliveira Poletini, ICB/UFMG - Orientadora

Profa. Dra. Maria Nathália de Carvalho M. M. Figueira Borges, DCB/UNIFESP

Belo Horizonte, 26 de abril de 2023.



Documento assinado eletronicamente por **Maria Nathália de Carvalho Magalhães Moraes Figueira Borges, Usuária Externa**, em 09/05/2023, às 21:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maristela de Oliveira Poletini, Professora do Magistério Superior**, em 23/05/2023, às 15:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Theo Rolla Paula Mota, Professor do Magistério Superior**, em 30/05/2023, às 08:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 2274307 e o código CRC 386A3280.

AGRADECIMENTOS

A duração de um mestrado é imensurável, são dois anos que parecem uma longa viagem, com muitos desafios, incertezas, alegrias e muitas surpresas no caminho. No início parece ser uma viagem solitária, mas esse sentimento não dura muito tempo, logo várias pessoas passam a contribuir com essa jornada de investigação e então se tornam indispensáveis para esse processo.

Para trilhar esse caminho foi necessária ajuda, apoio e energia de várias pessoas. Por isso, primeiramente, gostaria de agradecer aos meus pais, que me incentivaram a seguir a carreira acadêmica, mesmo sem saber o que viria pela frente, me incentivaram apenas por saber que era o meu desejo e por acreditarem que me faria feliz.

Agradeço também a Prof^a Maristela Poletini por ter proporcionado a oportunidade de trabalhar sob sua orientação, pois foi graças a sua paixão pelo que faz que consegui realizar este trabalho. Sempre se fez presente e quando necessário foi acolhedora, paciente, nunca deixando de ser firme e competente.

Aos meus colegas de laboratório pela convivência, pelos conselhos, cafés e bolos compartilhados, obrigada por tornar um ambiente de trabalho agradável e saudável.

Especialmente a minha companheira de laboratório Hellen, que é sempre cuidadosa e disposta a ajudar.

A todos os professores do Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo pela convivência, ensinamentos e por estarem sempre de portas abertas para ajudar no que fosse necessário.

Aos amigos e familiares de Belo Horizonte e Teófilo Otoni, que foram abrigo quando preciso.

Não poderia deixar de agradecer ao Matheus, que mudou a sua rotina para dessincronizar junto comigo em experimentos noturnos sem medir esforços. Obrigada pelo incentivo, pelos conselhos e pelo acolhimento quando foi necessário.

Gostaria de agradecer aos professores do departamento de Fisiologia e Biofísica, aos funcionários pela contribuição para manutenção da nossa pesquisa.

À agência de fomento FAPEMIG pela bolsa de mestrado e CNPq e CAPES pelo financi

RESUMO

Em mamíferos, o núcleo supraquiasmático do hipotálamo (suprachiasmatic nucleus, SCN) é o oscilador (ou relógio) circadiano central. Atribui-se ao SCN duas funções principais: 1) sincronização dos ritmos circadianos ao ciclo claro e escuro (LD) e 2) geração de ritmos em condições de escuro constante. Exposição a ciclos simétricos de LD com período (T) de 22 horas (11:11h) promove a dissociação do SCN em dois osciladores. Um oscilador presente na porção ventrolateral (vl) do núcleo permanece sincronizado ao ciclo de LD, enquanto o outro, presente na porção dorsomedial (dm) permanece sincronizado ao ritmo endógeno (tau, t) do animal, no geral, com $t > 24h$. Apesar deste protocolo ser bem caracterizado quanto ao seu impacto nos ritmos regulados pelo SCN, não se conhece propriamente seu efeito sobre a fisiologia do SCN. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi caracterizar o efeito da dessincronização forçada sobre a expressão dos principais neuropeptídeos expressos em cada porção do SCN, a saber, do polipeptídeo vasoativo intestinal (VIP) e da vasopressina (AVP) ricamente expressos nas porções vl e dm, respectivamente; e sobre a atividade neuronal do núcleo, avaliada por meio da imunohistoquímica da família de genes de resposta imediata (Fos-related antigens, aqui abreviada como c-Fos). Para isso, ratos Wistar foram mantidos em regimes de luz simétricos 12h:12h [grupo: Control (T24)] ou 11:11h [grupo: Desynchronized (T22)]. O registro de telemetria foi feito em ambos os grupos para análise dos ritmos de atividade locomotora espontânea (spontaneous locomotor activity, SLA) e temperatura corporal central (Tc). Após 10-15 dias, os animais foram perfundidos transcárdialmente nos *zeitgeber time* (ZT) 2, 8, 14 e 20, e a análise da expressão de VIP, AVP e c-Fos foi verificada por imunohistoquímica. A quantificação foi realizada por contagem de células imunorreativas (ir) em cada porção do núcleo. Em decorrência da dessincronização forçada, os ritmos de SLA e Tc passaram a apresentar dois períodos significativos, um em torno de 22h e outro $> 24h$, porém com menor robustez, mesor e amplitude, quando comparados ao grupo Control (T24). A dessincronização não alterou o número de células AVP-ir nos diferentes ZTs, mas extinguiu a variação temporal da expressão de VIP. Além disso, diferente dos animais T24, o número de neurônios c-Fos-ir no vl-SCN aumentou no ZT20 (fase escura) comparado com os demais ZTs nos animais T22. O ritmo de SLA do grupo Desynchronized (T22) correlacionou-se de forma negativa com o número de neurônios AVP-ir e com o número de c-Fos-ir na dmSCN. Já, a correlação positiva que existia no grupo Control (T24) entre VIP-ir e AVP-ir foi perdida nos animais Desynchronized (T22). O número de neurônios VIP-ir e de c-Fos-ir na vlSCN de animais Desynchronized (T22) em repouso na fase escura (desalinhados) foi menor do que de animais T22 em atividade na fase escura (alinhados). Dessa forma, o protocolo de

dessincronização forçada altera o perfil da atividade neuronal da porção vl e da expressão de VIP no SCN, mantendo o perfil da atividade neuronal da porção dm e da expressão temporal de AVP.

Palavras-chave: Núcleo Supraquiasmático; Dessincronização forçada; Cronobiologia

ABSTRACT

In mammals, the suprachiasmatic nucleus (SCN) of the hypothalamus is the central circadian oscillator or "clock." Mainly, SCN synchronizes the circadian rhythms to the light-dark (LD) cycle, and it generates rhythms under constant dark conditions. Exposure to symmetrical LD cycles with a period (T) of 22 h (11:11h) leads to the dissociation of the SCN into two oscillators. One oscillator located in the ventrolateral (vl) portion of the nucleus remains synchronized to the LD cycle, while the other, present in the dorsomedial (dm) portion, remains synchronized to the animal's endogenous rhythm (tau, t), typically with $t > 24$ hours. Although the impact of this protocol on SCN-regulated rhythms is well-characterized, its specific effect on SCN physiology is not fully understood. Therefore, the objective of this study was to characterize the effect of forced desynchronization on the expression of key neuropeptides in each SCN portion, namely, vasoactive intestinal polypeptide (VIP) and vasopressin (AVP), which are highly expressed in the vl- and dm-SCN, respectively, as well as on SCN neuronal activity assessed through immunohistochemistry of the Fos-related antigens (abbreviated as c-Fos) immediate early gene family. For this purpose, Wistar rats were subjected to symmetric light regimes of 12h light:12h dark [Control group (T24)] or 11:11h light:dark [Desynchronized (T22) group]. Telemetric recordings were conducted in both groups to analyze spontaneous locomotor activity (SLA) and core body temperature (Tc) rhythms. After 10-15 days, the animals were transcardially perfused at zeitgeber times (ZTs) 2, 8, 14, and 20, and the expression of VIP, AVP, and c-Fos was evaluated through immunohistochemistry. Quantification was performed by counting immunoreactive (ir) cells in each SCN portion. As a result of forced desynchronization, SLA and Tc rhythms exhibited two significant periods, one around 22 h and another >24 h, but with lower robustness, mesor, and amplitude compared to the Control group (T24). Desynchronization did not alter the number of AVP-ir cells at different ZTs, but it abolished the temporal variation in VIP expression. Furthermore, unlike the T24 animals, the number of c-Fos-ir neurons in the vlSCN increased at ZT20 (dark phase) compared to other ZTs in the T22 animals. The SLA rhythm in the Desynchronized group (T22) showed a negative correlation with the number of AVP-ir neurons and c-Fos-ir neurons in the dmSCN. In contrast, the positive correlation observed in the Control group (T24) between VIP-ir and AVP-ir was lost in the Desynchronized (T22) animals. The number of VIP-ir neurons and c-Fos-ir neurons in the vlSCN of Desynchronized (T22) animals at rest during the dark phase (misaligned) was lower than that of T22 animals in activity during the dark phase (aligned). Thus, the forced desynchronization protocol alters the neuronal activity profile of the

vlSCN and the expression of VIP in the SCN while maintaining the neuronal activity profile of the dmSCN and the temporal expression of AVP.

Keywords: Nucleus suprachiasmatic; Forced Desynchronization; Chronobiology

LISTA DE ABREVIATURAS

SCN – *suprachiasmatic nucleus*

vlSCN – porção ventrolateral do SCN

dmSCN – porção dorsomedial do SCN

ZT – *Zeitgeber*

SLA – *spontaneous locomotor activity*

Tc – temperatura corporal

LD – *light/dark*

t – tau

AVP – arginina-vasopressina

VIP – polipeptídeo vasointestinal

GRP – peptídeo liberador de gastrina

NMS – neuromedina S

TRH – trato retino hipotalâmico

Glu – glutamato

QO – quiasma óptico

3V – 3º ventrículo

VPAC – receptor para VIP

TTFs – *loops de feedback* transcricional-traducional autossustentáveis

CLOCK – *Circadian Locomotor Output Cycles Kaput*

BMAL1 – *brain and muscle Arnt-like protein 1*

PER – *Period*

CRY – *Cryptochrome*

REV-ERB α – *Reverse-erythroblastosis virus alpha Nuclear Receptor subfamily 1, group D, member 1/2*ROR –

RAR – *retinoid-related orphan receptor*

PACAP – peptídeo ativador de adenilato ciclase hipofisário

IEG – *immediate early gene*

REM – movimento rápido dos olhos

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. As principais características dos ritmos.	13
Figura 2. Representação esquemática das divisões morfofuncionais do SCN.....	14
Figura 3. Simulação de dois osciladores acoplados.	17
Figura 4. O efeito da dessincronização forçada sobre o ganho de peso e ingesta alimentar.	21
Figura 5. A dessincronização forçada dissocia a atividade rítmica em dois períodos. .	21
Figura 6. O efeito da dessincronização forçada sobre os padrões rítmicos.....	22
Figura 7. A dessincronização forçada não altera a imunorreatividade de AVP.....	23
Figura 8. Na dessincronização forçada a imunorreatividade de VIP perde o padrão rítmico.	23
Figura 9. A dessincronização forçada altera a atividade dos neurônios no SCN.....	24
Figura 10. O desalinhamento durante a dessincronização forçada altera VIP-ir na fase escura.	25

SUMÁRIO

1. JUSTIFICATIVA	12
2. REVISÃO DA LITERATURA	12
2.1. RITMOS CIRCADIANOS E RELÓGIO BIOLÓGICO.....	12
2.2. RELÓGIO CENTRAL	14
2.3 A MAQUINÁRIA GÊNICA DA RITMICIDADE.....	15
2.4. A SINCRONIZAÇÃO DOS RITMOS CIRCADIANOS	16
2.5. A DESSINCRONIZAÇÃO FORÇADA	16
3. OBJETIVOS	17
3.1. OBJETIVO GERAL.....	17
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
4. MATERIAIS E METÓDOS.....	18
4.1. ANIMAIS	18
4.2. REGIME DE LUZ.....	18
4.3. REGISTRO DE SLA E Tc	18
4.4. PERFUSÃO TRANSCARDÍACA E PREPARAÇÃO DOS CÉREBROS PARA IMUNOHISTOQUÍMICA	19
4.5. IMUNOHISTOQUÍMICA	19
4.6. OBTENÇÃO DE IMAGENS E CONTAGEM DE CÉLULAS	20
4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	20
5. RESULTADOS	20
5.1. EFEITO DA DESSINCRONIZAÇÃO FORÇADA SOBRE O GANHO DE PESO E INGESTA ALIMENTAR	20
5.2. EFEITO DA DESSINCRONIZAÇÃO FORÇADA SOBRE VIP e AVP	22
5.3. EFEITO DA DESSINCRONIZAÇÃO FORÇADA SOBRE A ATIVIDADE NEURONAL DO SCN.....	24
5.4. OS EFEITOS DO DESACOPLAMENTO DO SCN DURANTE A DESSINCRONIZAÇÃO FORÇADA	25

6. DISCUSSÃO	26
7. CONCLUSÃO.....	29
8. REFERÊNCIAS	30

1. JUSTIFICATIVA

Em mamíferos, o ritmo circadiano é governado pelo SCN, conhecido também como relógio central. O SCN funciona como marcapasso capaz de coordenar os ritmos circadianos fisiológicos e comportamentais (Ralph et al., 1990). Os neurônios do relógio central apresentam ritmos de quase 24 horas na expressão gênica, na taxa de disparo e na liberação de peptídeos que são ajustados ao fotoperíodo. A propriedade de rede do SCN permite que os neurônios desse núcleo se sincronizem e funcionem como um marcapasso (Aton & Herzog, 2005).

São reconhecidas duas porções distintas no SCN, a porção ventrolateral (vl) e a dorsomedial (dm). Essas porções apresentam diferenças anatômicas e fisiológicas, de tal forma a serem identificadas uma porção mais lateral, marcada por uma densa concentração de neurônios imunorreativos a arginina-vasopressina (AVP), e uma porção mais medial, marcada densamente por polipeptídeo vasoativo intestinal (VIP) (Abrahamson & Moore, 2001).

O mapeamento funcional do SCN é um desafio pela sua pequena extensão e o seu padrão de projeções. As formas mais utilizadas de estudo das duas porções do SCN são modelos *in vitro* e modelos de lesões do SCN. O primeiro traz como desvantagem a possível perda da rede de neurônios e o segundo pode causar danos de das fibras de passagens e de áreas subjacentes. Ratos expostos a ciclos de LD curtos (11:11h) apresentam um padrão duplo de expressão da atividade locomotora espontânea (locomotor spontaneous activity, SLA) e da temperatura corporal central (Tc), em um protocolo chamado de dessincronização forçada. Neste protocolo, a avaliação da expressão dos genes do relógio no SCN mostra uma dissociação das duas porções do SCN (de la Iglesia et al., 2004; Schwartz et al., 2009). Esta dissociação do SCN torna possível estudar aspectos que envolvem a sincronização das suas porções. A fim de aprofundar o impacto da dessincronização forçada sobre as propriedades do SCN, nós caracterizamos o perfil da expressão de VIP e AVP nos neurônios do SCN. Também foi avaliado a ativação neuronal das subdivisões do SCN sob o efeito da dessincronização forçada. Este estudo amplia o conhecimento sobre a fisiologia do relógio central.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. RITMOS CIRCADIANOS E RELÓGIO BIOLÓGICO

Os dias são caracterizados por períodos claros e escuros, que são uma consequência dos movimentos de rotação da Terra em torno do seu próprio eixo, com um período (T) de aproximadamente 24 horas. Este padrão de alterações permitiu a seleção natural de um sistema temporal circadiano (*circa diem*, cerca de um dia), o qual opera de forma autônoma em quase todas as formas de vida existentes. A sincronização do indivíduo com o ambiente externo oportuniza de forma mais eficaz a sobrevivência e bem-estar dos organismos (Vitaterna et al., 2001). Dessa forma, a sincronização tem como função coordenar e antecipar o comportamento e metabolismo de acordo com a periodicidade ambiental, tais como mudanças de temperatura, disponibilidade ou não de alimentos, e a interação social (Kalsbeek et al., 2011; Kalsbeek & Fliers, 2013).

Um marco nas investigações sobre ritmos biológicos foi o trabalho do cientista francês Jean Jacques d'Ortous De Mairan. Observando padrões de movimentos da planta *Mimosa pudica*, os quais mostraram o ritmo endógeno da planta, ou seja, mesmo em escuro constante, ela mantinha seu padrão de movimentos de abrir e fechar folhas. A persistência desse ritmo na

ausência de um ciclo de luz ou outras pistas ambientais foi denominado como período *free-running*, ou período de livre curso, que caracteriza o período intrínseco de uma oscilação na ausência de pistas temporais, como a luz (Lima & Vargas, 2014; Roenneberg & Mellow, 2005). Este período endógeno é simbolizado pela letra grega *tau* (t).

Atualmente, é bem estabelecida na literatura que o sistema temporal circadiano é constituído por conjunto de relógios (ou osciladores) codificado geneticamente, que funciona de maneira hierárquica em mamíferos: um relógio circadiano central localizado no hipotálamo, o SCN e, múltiplos relógios localizados em outras áreas cerebrais e em tecidos periféricos. A principal função do relógio central é orquestrar os demais relógios, de tal forma a gerar ritmos circadianos metabólicos, genético e comportamentais (Vitaterna et al., 2001).

Os ritmos circadianos são sincronizados por pistas ambientais, alterando o período da oscilação. Como consequência da sincronização (ou arrastamento) de um ritmo endógeno ao ritmo externo também se observa alterações na fase da oscilação (ϕ), que caracteriza a posição dentro do ciclo como, por exemplo, a fase de luz (dia) ou a fase de escuridão (noite), assim como representado na figura 1 (Mistlberger & Antle, 2011). As pistas capazes de sincronizar os ritmos circadianos são conhecidas como *zeitgebers*, ou “doadores de tempo”. Existem pistas endógenas tais como as variações de hormônios e da Tc e exógenas, tais como a alimentação, a atividade física, a interação social. Dentre as pistas exógenas o ciclo de luz e escuridão é considerado o *zeitgeber* mais importante (Oster et al., 2017; Schnell et al., 2014). Então, a pista temporal ajusta o período e a fase do relógio biológico, provocando um arrastamento da atividade do animal, podendo provocar um avanço ou atraso de fase (Golombek & Rosenstein, 2010; Vitaterna et al., 2001). O arrastamento ocorre pelo reajuste contínuo do relógio para permanecer alinhado aos *zeitgebers*. Nos mamíferos, o arrastamento começa ajustando a fase do relógio mestre (no SCN). O SCN, por sua vez, arrasta os relógios periféricos de todo o corpo, levando ao alinhamento global do sistema circadiano (Ashton et al., 2021).

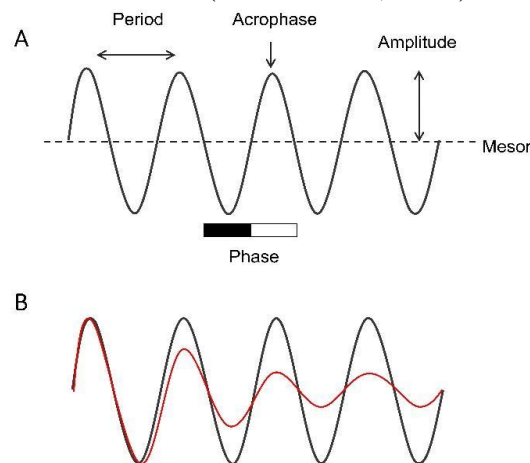


Figura 1. As principais características dos ritmos. (A) Período: tempo no qual um ritmo completa o seu ciclo; Acrofase: horário do dia onde ocorre o pico de uma variável; Amplitude: distância entre o mesor e o ponto máximo do ritmo; Mesor: estatística da estimativa da linha média de uma oscilação quando ajustado a uma curva cosenoidal; Fase: equivale à posição dentro do ciclo, ou seja, a fase de repouso ou de atividade; (B) Robustez: maior razão da variância observada em um período específico comparada com a variância total, a qual reflete a estabilidade de uma variável oscilatória, ou seja, a capacidade de se manter oscilando com o passar do tempo. A linha vermelha na figura representa uma oscilação com baixa robustez (Adaptado de Korf & Von Gall, 2016).

2.2. RELÓGIO CENTRAL

O relógio central começou a ser decifrado no início da década de 1970, quando pesquisadores observaram que era possível abolir os ritmos circadianos endócrinos e comportamentais por meio da lesão do SCN (Harrington, 1992). Posteriormente, identificou-se a capacidade do SCN de gerar ritmos circadianos, por meio dos experimentos com transplantes, os quais mostraram que SCN de animais intactos transplantados em animais com o SCN lesionado foi capaz de reestabelecer o padrão rítmico de SLA dos animais transplantados (Ralph et al., 1990).

O SCN é composto por aproximadamente 20.000 neurônios localizados bilateralmente ao terceiro ventrículo e sobre o quiasma óptico (Fig. 2). A porção medial do SCN no eixo anteroposterior é dividida em duas porções distintas, a saber: a porção ventrolateral (vlSCN) e dorsomedial (dmSCN). Esta divisão é baseada em diferenças na citoarquitetura, no fenótipo neuroquímico, na organização da inervação, na distribuição das projeções eferentes, no padrão de expressão gênica e na atividade elétrica do núcleo (Dardente et al., 2002; El Allali et al., 2017; Leak & Moore, 2001; Moga & Moore, 1997; Moore et al., 2002; Morin, 2013; Schaap et al., 2003). A porção dmSCN é caracterizada pela expressão de AVP enquanto vlSCN expressa VIP, peptídeo liberador de gastrina (GRP) e neuromedina S (NMS) (Abrahamson & Moore, 2001; Card & Moore, 1982; Miyazato et al., 2008; Mori et al., 2005).

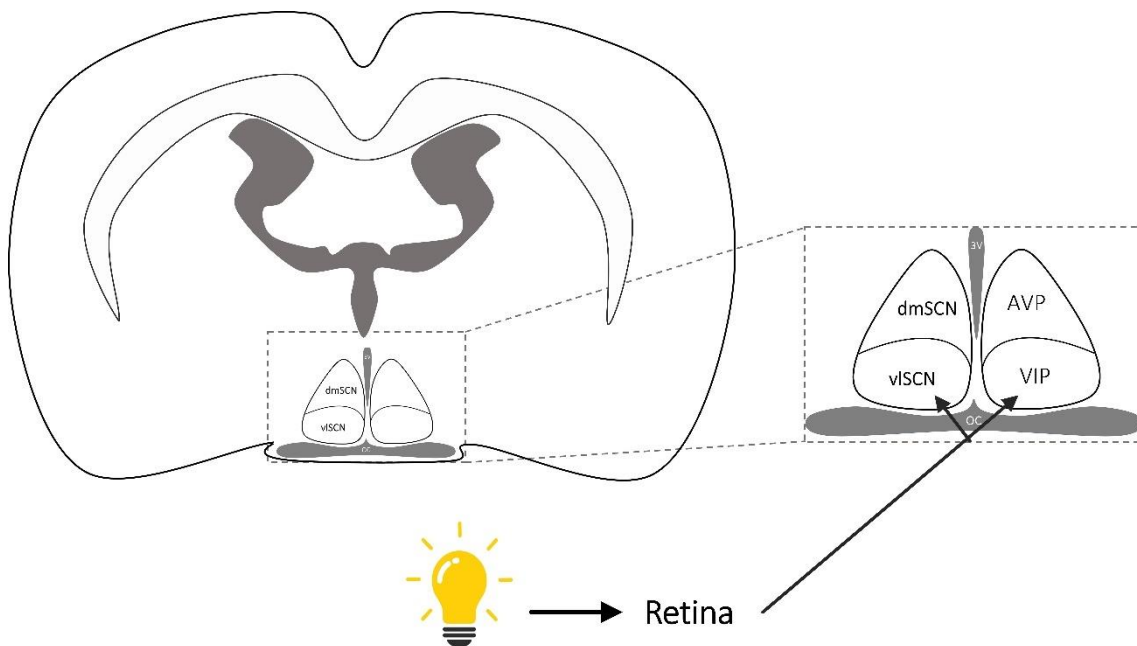


Figura 2. Representação esquemática das divisões morfofuncionais do SCN. A imagem representa as delimitações das regiões vlSCN e dmSCN, em destaque no quadrado pontilhado estão apresentados os principais neuropeptídeos expressos pelos neurônios das duas regiões, AVP e VIP. A região vlSCN recebe projeções vindas da retina, e, deste modo recebe informação sobre a fotoperiodicidade ambiental através do trato retino hipotalâmico (RHT), sendo glutamato (Glu) e o peptídeo hipofisário ativador de adenilato ciclase (PACAP) as principais moléculas envolvidas nessa transmissão (não representado na figura). OC: *optic chiasm* (= quiasma óptico); 3V: 3º ventrículo (Adaptado de Hafner et al., 2012).

In vivo, os neurônios do SCN devem sincronizar-se com os ciclos ambientais e entre si. Embora muito se saiba sobre os mecanismos de arrastamento para ciclos de luz, relativamente pouco se

sabe sobre o arrastamento de neurônios SCN para sincronizar sinais dentro do SCN (Aton & Herzog, 2005).

A rota neural responsável pelo alinhamento ou foto-arrastamento dos ritmos circadianos inicia-se nas células ganglionares intrinsecamente fotossensíveis da retina (ipRGCs) que são responsáveis pela percepção da irradiação luminosa (Berson et al., 2002; Provencio et al., 2002). A partir destas células, origina-se o trato retino-hipotalâmico (RHT), que envia um sinal neuronal de estimulação para o SCN (Albrecht, 2012; Partch et al., 2014). Uma pequena porção dos neurônios do SCN recebem a informação fótica que chega através do RHT, transmitindo a informação para as células vizinhas por meio de sinais neuroquímicos e junções comunicantes, possibilitando manter a sincronização entre essas células e produzindo uma oscilação consistente dentro do SCN (Bollinger & Schibler, 2014; Mohawk et al., 2012). São premissas para dividir o SCN em duas porções as diferenças na cinética de mudança de fase entre o dm e o vlSCN e as diferenças no pico de expressão dos genes do relógio. Estas diferenças mostram que em resposta a luz, a vlSCN sofre alterações neuroquímicas, as quais são transmitidas para a porção dm, definindo, dessa forma, a direção da comunicação entre as porções. A porção vlSCN envia projeções para a porção dmSCN onde se localiza o receptor para VIP (VPAC) (Fig. 2) (Abrahamson & Moore, 2001; Harmar et al., 2002; Mazuski et al., 2018). A porção dmSCN também envia sinais de sincronização para a porção vlSCN, mas de forma menos significativa (Abrahamson & Moore, 2001; Nakamura et al., 2005).

A interação entre as porções do SCN ainda não foi totalmente desvendada. Estudos de hibridização *in situ* e de monitoramento da atividade transcricional por meio do repórter luciferase expresso sob controle de promotores dos genes de relógio demonstraram que, em resposta a uma grande mudança no ciclo claro:escuro (LD), os ritmos circadianos moleculares mudam rapidamente no vlSCN, enquanto os ritmos na dmSCN demoram mais para responder à mudança no ambiente fótico (Nagano et al., 2003; Nakamura et al., 2005).

2.3 A MAQUINÁRIA GÊNICA DA RITMICIDADE

O mecanismo molecular que controla os ritmos circadianos foi desvendado por Jeffrey C. Hall, Michael Rosbash e Michael W. Young, que foram reconhecidos pelo Comitê Nobel de Fisiologia ou Medicina, em 2017, quando receberam o prêmio Nobel. Esse mecanismo complexo é regulado por *loops de feedback* transcricionais e traducionais autossustentáveis (TTFLs), que ocorrem dentro de cada célula e que regulam tanto o oscilador central quanto os osciladores periféricos (Huang, 2018).

As proteínas de relógio seguem um ritmo circadiano que é determinado por alças de retroalimentação positiva e negativa, completando um ciclo de aproximadamente 24 horas (Ko & Takahashi, 2006). A alça positiva é composta pelas proteínas CLOCK (*Circadian Locomotor Output Cycles Kaput*) e BMAL1 (brain and muscle Arnt-like protein 1) que formam heterodímeros, os quais estimulam a transcrição dos genes *Period (Per)* 1, 2 e 3, e *Cryptochrome (Cry)* 1 e 2 (Albrecht, 2012). Esses genes codificam as proteínas PER e CRY, as quais formam um complexo repressor capaz de interagir com o heterodímero CLOCK/BMAL1, inibindo a sua transcrição (Chu et al., 2011; Dardente & Cermakian, 2009; Duguay & Cermakian, 2009; Michael et al., 2017). Além dessa alça de retroalimentação positiva e negativa, existem outras camadas de regulação, como as proteínas Rev-Erba/ β (NR1D1, *Reverse-erythroblastosis virus alpha Nuclear Receptor subfamily 1, group D, member 1/2*), os quais aumentam em resposta a ação de CLOCK/BMAL1 e, posteriormente, REV-ERB α reprime a transcrição de *Bmal1*, ligando-se ao seu promotor. Uma outra proteína acessória de

regulação é a *Rora*/ β (RAR-related Orphan Receptor alpha/beta), a qual também é estimulada por CLOCK/BMAL1 mas exerce efeito estimulatório sobre a transcrição de *Bmal1*. Quando a proteína REV-ERB α está ausente, o gene *Bmal1* (e possivelmente também o gene *Clock*) é liberado, podendo formar novamente o fator de transcrição CLOCK/BMAL1, reiniciando um novo ciclo circadiano de expressão das proteínas de relógio (Albrecht, 2012; Takahashi, 2017).

2.4. A SINCRONIZAÇÃO DOS RITMOS CIRCADIANOS

Os ritmos circadianos gerados da população de neurônios do SCN são muito mais robustos do que aqueles produzidos por neurônios individuais. A amplitude do relógio intracelular do SCN é altamente responsiva. A sincronização aumenta o acoplamento entre os neurônios e, conseqüentemente, a robustez do ritmo do SCN e dos ritmos de saída (Welsh et al., 2010). Portanto, a dissociação das células do SCN permite que elas oscilem independentemente mantendo as fases individuais, mas a força de acoplamento que mantinha a sincronização é perdida (Welsh et al., 1995).

A sincronização do SCN é um processo gradual, iniciando pelas células retinorreceptoras concentradas na porção vlSCN. As células de dmSCN dependem da comunicação com a porção vlSCN para sincronização em um ciclo LD (Schwartz et al., 2010). A sincronização é considerada falha quando o período de um determinado conjunto de ritmos é diferente de 24h e quando o T de uma determinada variável difere de outras (Smolensky et al., 2016).

2.5. A DESSINCRONIZAÇÃO FORÇADA

Alguns protocolos de dessincronização forçada são utilizados para estudar os processos que envolvem o SCN, onde os ciclos de sono-vigília estão em um período que o sistema circadiano não pode entrar em sintonia, sendo esse período inferior ou superior a 24 horas. Campuzano (1998) desenvolveu um protocolo de dessincronização forçada em ratos que leva à dissociação estável entre vl- e dmSCN (Campuzano et al., 1998). Quando alojados em ciclos simétricos de 22 h, 11:11 LD (T22), os ratos exibiam dois ritmos de SLA estáveis, simultaneamente: um arrastado ao ciclo LD com período endógeno de 22 h (t_{22}), enquanto o outro dissociado do ciclo LD, com um período endógeno superior a 24 h ($t > 24$), assim como mostrado na figura 3 (de la Iglesia et al., 2004).

Sob ciclos LD com período de 22 h, vl arrasta para o ciclo LD, mas o acoplamento fraco entre vl e dm, combinado com o período intrínseco mais longo de dm, impede o arrastamento completo de dm (Schwartz et al., 2009). Os dois ritmos do animal dessincronizado entram e saem de fase um com o outro (Fig. 3), oscilando entre dias de alinhamento e desalinhamento. Os dias de alinhamento consistem em ritmos arrastados pela luz (t_{22}) e os dias de desalinhamento seguem o *free-running* ($t > 24$) (de la Iglesia et al., 2004; Schwartz et al., 2009). Quando em dessincronização forçada na condição de desalinhamento, as duas regiões dentro do SCN oscilam fora de fase, os mRNAs característicos de dia (*Per1*) e noite (*Bmal1*) são expressos simultaneamente nas subdivisões vlSCN e dmNSQ, confirmando que o desalinhamento durante a dessincronização forçada leva à dissociação em dois osciladores, um em cada subdivisão do SCN (de la Iglesia et al., 2004; Wotus et al., 2013).

Em ratos que passaram pela dessincronização forçada, a melatonina oriunda da pineal, a Tc, e os ritmos de sono de movimento rápido dos olhos (REM) dissociado do ritmo de sono de ondas lentas oscilam em um único ritmo, um pouco acima de 24h, sugerindo que a porção dmSCN poderia determinar a fase para um conjunto significativo de substratos neurais que coordenam

estes ritmos (Cambras et al., 2007; Lee et al., 2009; Schwartz et al., 2009). Esses achados não somente nos revelam que as porções do SCN podem funcionar independentemente, mas também que essas porções podem influenciar independentemente ritmos em todo o organismo (Cambras et al., 2007; Lee et al., 2009; Schwartz et al., 2009).

Apesar destes estudos trazerem um panorama interessante do efeito do protocolo de dessincronização sobre os ritmos regulados pelo SCN, não se investigou o efeito desse protocolo sobre os ritmos da expressão dos principais neuropeptídios do SCN.

A dissociação estável entre os osciladores vlSCN e dmSCN oferece a oportunidade para avaliar o papel da organização SCN na decodificação de informações fóticas. O protocolo de dessincronização forçada pode ser utilizado estrategicamente para compreender as subdivisões do SCN, já que o estudo por técnicas convencionais, como lesões neuro-anatômicas podem prejudicar o resultado.

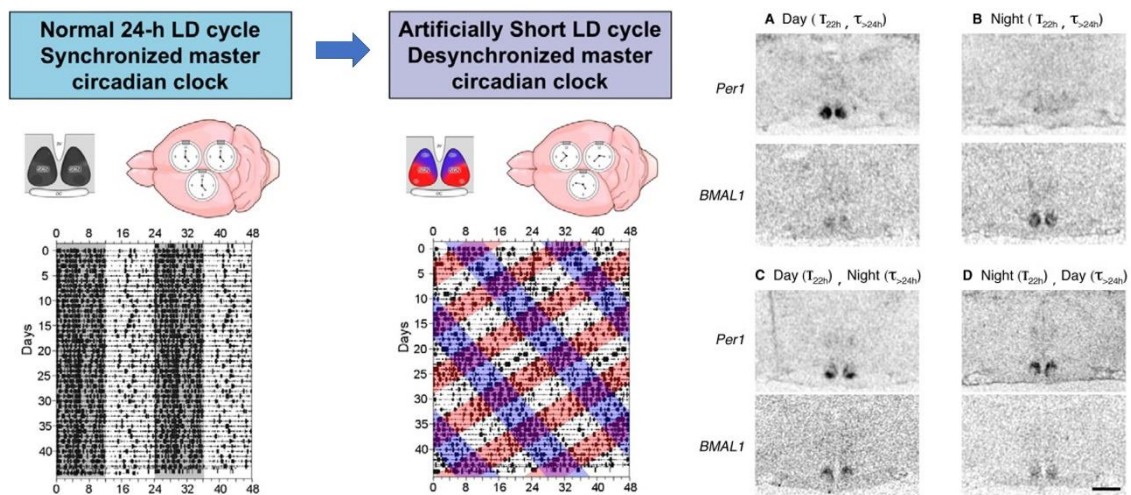


Figura 3. A dessincronização das duas porções do SCN. No rato, a exposição a um ciclo claro-escuro de 22 horas (LD22) leva ao desacoplamento de duas populações distintas de osciladores neuronais dentro do SCN, onde o oscilador vlSCN é arrastado para *Zeitgeber* T = 22, enquanto o oscilador dmSCN está em coordenação relativa. Esse desacoplamento do SCN se reflete na atividade locomotora, que apresenta dois períodos significativos, como mostrado no actograma do animal dessincronizado. O desacoplamento das duas porções do SCN já foi demonstrado pela expressão diferencial dos genes do relógio *BMAL1* e *Per1* durante os momentos de alinhamento e desalinhamento, que, quando em desalinhamento esses genes oscilam em fases diferentes nas porções do SCN (Adaptado de Bem-Hamo et al., 2016 e de la Iglesia et al., 2004).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade neuronal e imunorreatividade de VIP e AVP do SCN de ratos submetidos ao protocolo de dessincronização forçada.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os ritmos de SLA e Tc durante a dessincronização forçada;

- Avaliar o efeito da dessincronização forçada sobre atividade neuronal do SCN durante a dessincronização forçada.
- Avaliar a imunorreatividade de VIP e AVP nas porções do SCN durante a dessincronização forçada.

4. MATERIAIS E METÓDOS

4.1. ANIMAIS

Foram utilizados ratos machos Wistar, com aproximadamente 2 meses 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 isolados em caixas padrão de polipropileno nas medidas 300x200x130 mm no biotério de experimentação com temperatura ambiente de aproximadamente 24°C e com ração e água *ad libitum*. Os procedimentos experimentais realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA/UFMG), protocolo de número 213/2022. Ao final de cada delineamento experimental, os animais foram perfundidos transcardialmente, onde 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).

4.2. REGIME DE LUZ

Durante a aclimação (7 dias), os animais foram mantidos em ciclo de luz e escuridão de 12:12 horas. Após este período, um grupo de animais do grupo dessincronizado (LD 22h) ficaram sob um ciclo de 11:11 horas de luz e escuridão, por aproximadamente 40 dias e outro grupo de animais por aproximadamente 15 dias. Na fase clara, a iluminação foi gerada por lâmpadas tubulares fluorescentes (LED branca, comprimento de onda entre 420 e 750 nm) localizadas numa distância da caixa, de tal forma que 250-300 lux atingisse o microambiente do animal. Durante a fase de escuridão os animais foram manipulados sob luz vermelha (LED vermelha) em disposição a garantir menos de 1 lux no microambiente do animal.

4.3. REGISTRO DE SLA E T_c

O registro de SLA e T_c foi realizado através de telemetria. Para isso, animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de Cetamina e Xilazina (80 mg / kg e 10 mg / kg, respectivamente) e submetidos à cirurgia de implantação do sensor de telemetria na cavidade peritoneal. Uma incisão ventral na linha alba foi feita para introdução do sensor, o qual foi suturado à musculatura interna antes de a incisão ser fechada, o que diminui o risco de deslocamento interno do sensor na cavidade. Ao final da cirurgia, dose única de penicilina procaína intramuscular 24.000 U kg⁻¹ (Pentabiótico Veterinário) e analgésico antiinflamatório não esteroide subcutâneo 1,1 mg kg⁻¹ (Banamine) foram administrados.

As caixas dos animais foram posicionadas sobre um receptor de sinal de telemetria (ER-4000 Energizer/Receiver, Mini-Mitter Company, Sun River, OR, EUA), que foi previamente configurado para registrar a frequência específica do sinal emitido pela sonda do sensor previamente implantada em cada animal. Os dados foram transmitidos e armazenados em um computador instalado com o software VitalView (VitalView® Data Acquisition System Software v. 4.0, Mini-Mitter Company, Sun River, OR, EUA). T_c (°C) (precisão de ±0,1°C) e

SLA (unidades arbitrárias min⁻¹) foram registrados continuamente a cada minuto até o momento da eutanásia.

4.4. PERFUSÃO TRANSCARDÍACA E PREPARAÇÃO DOS CÉREBROS PARA IMUNOHISTOQUÍMICA

Ao final do período de registro de SLA e Tc, os animais foram anestesiados com uma sobredosagem de solução anestésica e perfundidos com 50 ml de tampão fosfato salina (PBS-0,01M), e em seguida, com 300 ml de paraformaldeído (PFA-4%) através de uma bomba de perfusão. As perfusões foram realizadas em torno do ZT 2, 8, 14 e 20.

Após a perfusão, os cérebros foram removidos e pós-fixados em PFA- 4% por 2 horas a 4°C. Em seguida, os cérebros foram armazenados em sacarose 30% fria por 72 h (até que os cérebros afundassem) e congelados em isopentano 99% (C₅H₁₂) a -50°C. Os cérebros foram então armazenados a -80°C até o seccionamento. Seções coronais de 30 µm correspondentes ao bregma -0.46 a -0.96 mm referentes ao comprimento do SCN foram cortados em um criostato e armazenados em solução crioprotetora (PBS, sacarose 30%, etilenoglicol 30%, PVP 1%) a -20°C até o ensaio imunohistoquímico.

4.5. IMUNOHISTOQUÍMICA

Para a marcação de c-Fos, VIP e AVP 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 com 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 em diferentes poços foram incubadas com os anticorpos produzidos em coelho, contra cFos, AVP e VIP (anti-c-Fos 1:2500, Santa Cruz Biotechnology, sc-253 anticorpo policlonal; anti-AVP 1:20000, ImmunoStar 20069; anti-VIP 1:1000, ImmunoStar, 20077) 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 BSA 1%.

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).

4.6. OBTENÇÃO DE IMAGENS E CONTAGEM DE CÉLULAS

Para quantificar o número de neurônios imunorreativos para VIP, AVP e c-Fos foram utilizadas aproximadamente de 3 a 5 secções coronais por animal, referente ao SCN. Foi utilizada a objetiva de 10x e 20x para obtenção das fotomicrografias bilaterais do SCN no microscópio óptico. Os neurônios imunorreativos para VIP, AVP e c-Fos foram contados manualmente com o uso do software ImageJ, sem conhecimento prévio do grupo experimental analisado. Foram consideradas células imunorreativas para c-Fos aquelas apresentando o núcleo corado em preto e a distinção entre porção dm e vl foi feito conforme a descrição de Morin (2013). O número de células positivas para AVP, VIP e c-Fos foi normalizado pelo número de secções por animal.

4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os actogramas foram inspecionados pelo software ClockLab (Actimetrics, IL, USA) e valores de *onset*, *offset*, acrofase e amplitude calculados pelo mesmo programa, a partir dos registros de telemetria de SLA e Tc de cada animal. Os registros foram blocados em 2 minutos, de tal maneira a obter 30 pontos por hora. O programa utiliza o teste estatístico Periodograma Qui-quadrado descrito por Sokolove e Bushell (1978) para calcular o período do ritmo e a robustez. Os valores de amplitude de SLA e Tc foram calculados como a diferença entre os valores máximos e mínimos (nadir) dividido por 2. A amplitude, o mesor e a robustez de cada animal foram comparadas pelo teste *t student*. A partir do programa Vital View também foram extraídas planilhas contendo os valores de SLA e Tc registradas a cada minuto para confecção dos gráficos de variação circadiana de SLA e Tc e média total de SLA e Tc na fase de luz a fase de escuridão.

O número de neurônios AVP-ir, VIP-ir e c-Fos-ir foram analisados pela ANOVA de duas vias seguido de pós-teste *Sidak*. A análise das correlações foi realizada utilizando Coeficiente de Pearson, onde o *P value*, R^2 e *r* foram considerados para a análise. Para confecção dos gráficos e análises estatísticas, foi utilizado o programa GraphPrism 8 (San Diego, CA, EUA).

5. RESULTADOS

5.1. EFEITO DA DESSINCRONIZAÇÃO FORÇADA SOBRE O GANHO DE PESO E INGESTA ALIMENTAR

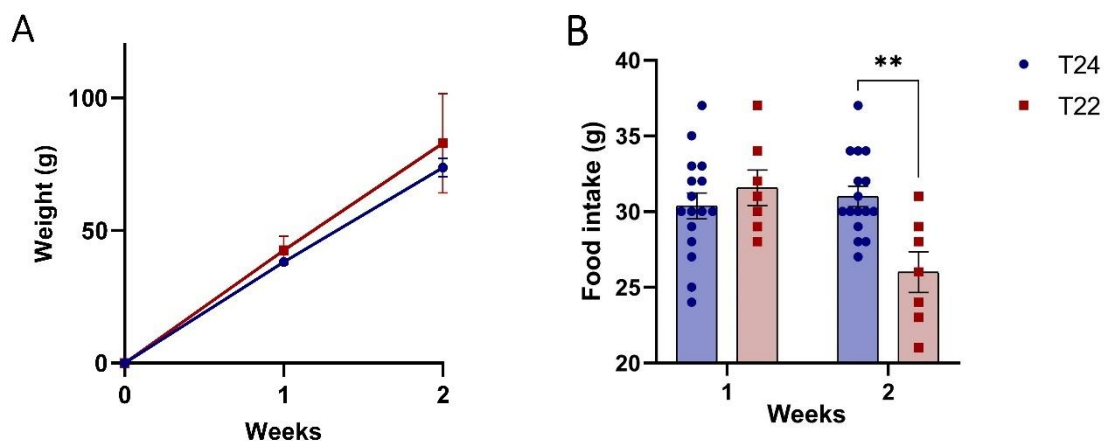


Figura 4. O efeito da dessincronização forçada sobre o ganho de peso e ingesta alimentar. (A) A dessincronização forçada não alterou o ganho de peso. (B) A ingesta alimentar foi registrada por 24 h por duas semanas. Os dados são apresentados como média \pm SEM. **, $p < 0,01$.

A dessincronização forçada não alterou o ganho de peso ao longo das 2 semanas de acompanhamento (Fig. 4A). No entanto, a dessincronização forçada reduziu a ingesta alimentar na segunda semana, como observado na figura 4B.

5.1. EFEITO DA DESSINCRONIZAÇÃO FORÇADA SOBRE O RITMO CIRCADIANO

O registro de telemetria dos animais Desynchronized T22 enquanto estavam em período de ambientação, ainda sob L:D 12:12h, mostrou que os animais apresentavam ciclos de SLA típicos, ou seja, com atividade concentrada na fase escuro do ciclo circadiano (Fig. 5A). Neste período de aclimatação, o τ apresentado pelos animais foi de 24 h (Fig.5B). O protocolo de dessincronização iniciou-se a partir do dia 21 (Fig. 5A), o que ocasionou alteração do perfil rítmico da SLA. A inspeção do actograma mostra dois padrões de atividade, que podem ser confirmados pela análise do periodograma.

Neste periodograma representativo do animal dessincronizado podemos observar dois períodos característicos da SLA dos animais em um regime LD com T igual a 22 h (Fig. 5C). O animal Desynchronized (T22) apresenta um período em torno de 22h e outro >24 h, sendo relativo ao regime de luz e ao *free-running*, respectivamente.

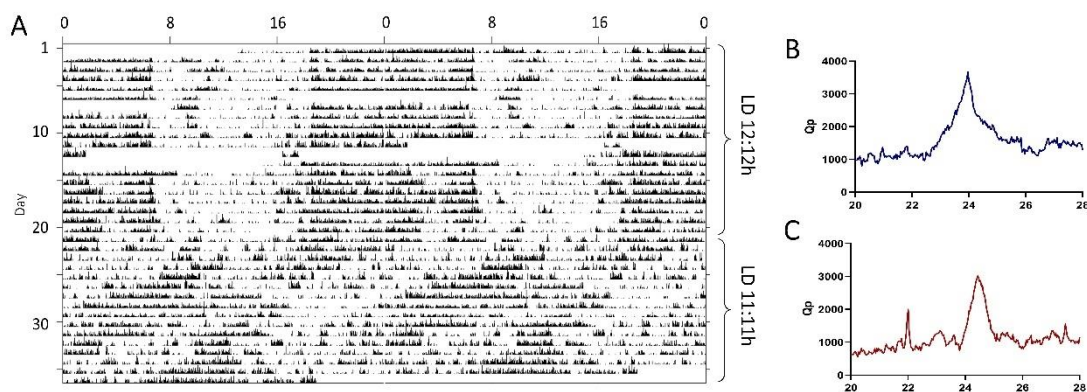


Figura 5. A dessincronização forçada dissocia a atividade rítmica em dois períodos. Actograma representativo de animal do grupo Desynchronized (T22) antes e durante o protocolo de dessincronização forçada. (B) O periodograma mostrando um período robusto em 24 horas enquanto o regime de luz era mantido em LD 12:12h e em (C) o periodograma de um animal após o regime de luz ser alterado para LD 11:11h com dois períodos significativos.

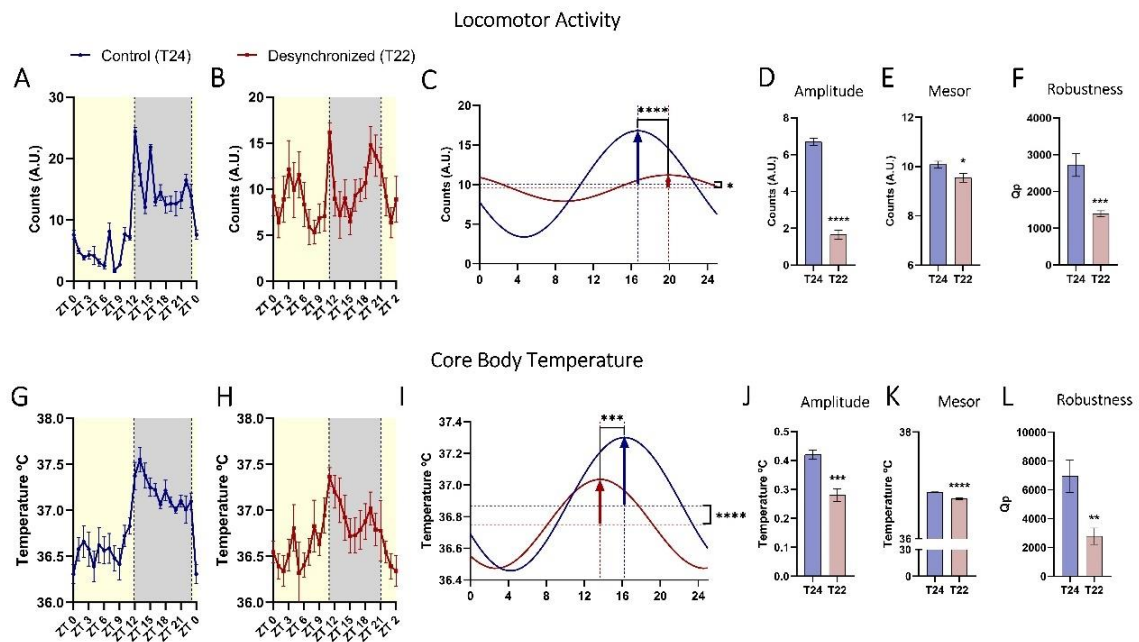


Figura 6. O efeito da dessincronização forçada sobre os padrões rítmicos. Dados do registro de telemetria da (A) atividade locomotora do grupo Control (T24) e (B) Desynchronized (T22) média \pm SEM, $n=7$. (C) Análise do cosinor com base nos dados da SLA e tendo como destaque a (D) amplitude, (E) mesor e (F) robustez. A média da Tc dos animais (G) Control (T24) e (H) Desynchronized (T22), média \pm SEM, $n=7$. (I) Análise do cosinor com base nos dados de Tc. A análise da (J) amplitude, (K) mesor e (L) robustez da Temperatura corporal, média \pm SEM, $n=7$. *, $p<0,05$; **, $p<0,01$; ***, $p<0,0005$; ****, $p<0,0001$ Control (T24) versus Desynchronized (T22). As linhas pontilhadas paralelas ao eixo x assinalam o valor médio do mesor e as linhas pontilhadas paralelas ao eixo y assinalam a amplitude da oscilação dos ritmos de atividade locomotora e temperatura em C e I, respectivamente.

A média por hora de SLA e Tc ao longo de 7 dias (Fig. 6 A e B) mostrou que os animais sob o protocolo de dessincronização forçada apresentaram um perfil bifásico do ritmo circadiano de SLA e Tc. A análise da curva ajustada (Análise do Cosinor) gerou os dados de amplitude e mesor da SLA (Fig.6 C, D) e da Tc (Fig.6 E, F) e a robustez foi adquirida pela média dos valores máximos do Periodograma (valores de Qp). O grupo Desynchronized (T22) apresentou uma menor amplitude, mesor e robustez desses ritmos quando comparados ao grupo Control (T24) (Fig. 6 B-D, F-H).

5.2. EFEITO DA DESSINCRONIZAÇÃO FORÇADA SOBRE VIP e AVP

A imunomarcagem da proteína AVP tem um padrão que prevalece na porção dmSCN (Abrahamson & Moore, 2001). A marcação de AVP é caracterizada por uma marcação celular marrom escura (Fig. 7 B e C). O número de neurônios AVP-ir no SCN não foi diferente entre os grupos (Fig. 7 A). A diferença observada se deu de forma temporal intragrupo. No grupo Control (T24), o número de neurônios AVP-ir foi menor no ZT14 quando comparado ao ZT20, enquanto que no grupo Desynchronized (T22), o número de neurônios AVP-ir no ZT14 foi menor quando comparado aos ZTs 2 e 8.

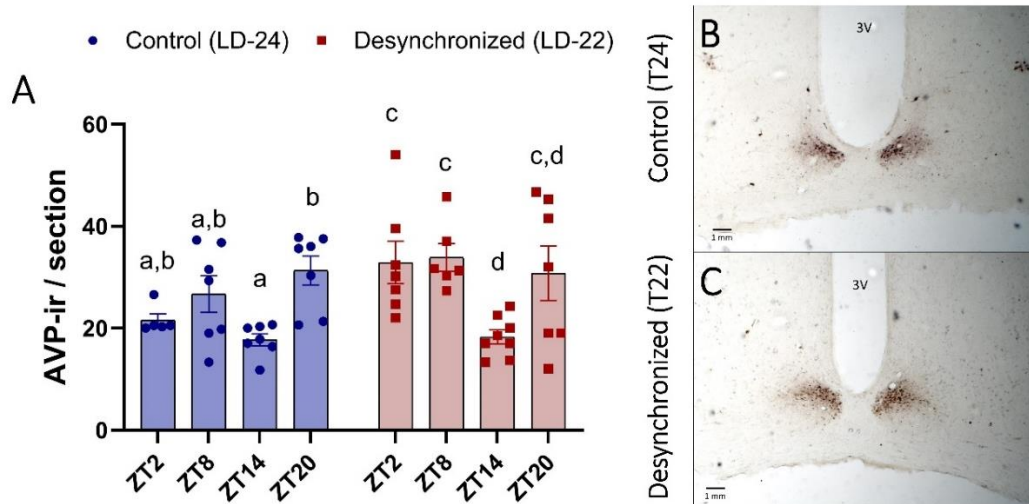


Figura 7. A dessincronização forçada não altera a imunorreatividade de AVP. (A) O número de neurônios imunorreativos para AVP (AVP-ir) são apresentados como média \pm SEM para ratos perfundidos nos ZTs 2, 8, 14 e 20 em diferentes regimes de luz. A imunorreatividade representada por fotomicrografias de secções marcadas pela AVP no SCN no ZT2 do grupo (B) Control (T24) no (B) ZT2 do grupo (C) Desynchronized (T22). Letras diferentes representam diferenças estatísticas entre ZTs no grupo.

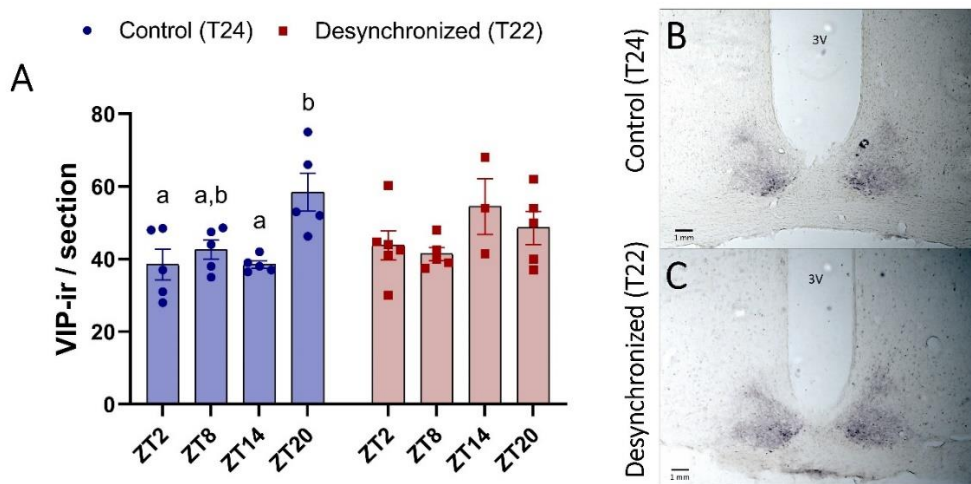


Figura 8. Na dessincronização forçada a imunorreatividade de VIP perde o padrão rítmico. (A) O número de neurônios imunorreativos para VIP (VIP-ir) são apresentados como média \pm SEM para ratos perfundidos nos ZTs 2, 8, 14 e 20 em diferentes regimes de luz. A imunorreatividade representado por fotomicrografias de secções marcadas por VIP no SCN no ZT2 do grupo (B) Control (T24) no (B) ZT2 do grupo (C) Desynchronized (T22). Letras diferentes representam diferenças estatísticas entre ZTs no grupo.

A imunomarcção de VIP é caracterizada por ser mais dispersa, mas o corpo celular dos neurônios vipérgicos, ainda sim, concentrou-se na porção vlSCN (Fig. 8 B e C). A análise do número de neurônios VIP-ir no SCN mostrou diferenças temporais no grupo Control (T24), de maneira que no ZT20 foram observadas o maior número de VIP-ir, estão diferenças, no entanto, foram perdidas no grupo Desynchronized (Fig.8 A).

5.3. EFEITO DA DESSINCRONIZAÇÃO FORÇADA SOBRE A ATIVIDADE NEURONAL DO SCN

A imunomarcação do c-Fos é caracterizada por uma marcação preta nuclear, assim como mostra as fotomicrografias (Fig.9 B e C). A imunomarcação do c-Fos no SCN como um todo, sem distinguir as porções, mostrou diferenças temporais no grupo Control (T24) e no grupo Desynchronized (T22) (Fig.9 A-E) Animais do grupo Control (T24) apresentaram um maior número de células c-Fos-ir no ZT8 quando comparado com os ZTs 2, 14 e 20 (Fig.9A), enquanto que os animais do grupo Desynchronized (T22) apresentaram um maior número de células c-Fos-ir no ZT20 quando comprado aos ZTs 2 e 14 (Fig.9A). Além disso, os animais do grupo Desynchronized (T22) apresentaram um maior número de células c-Fos-ir no ZT20 quando comparados aos animais do grupo Control (T24).

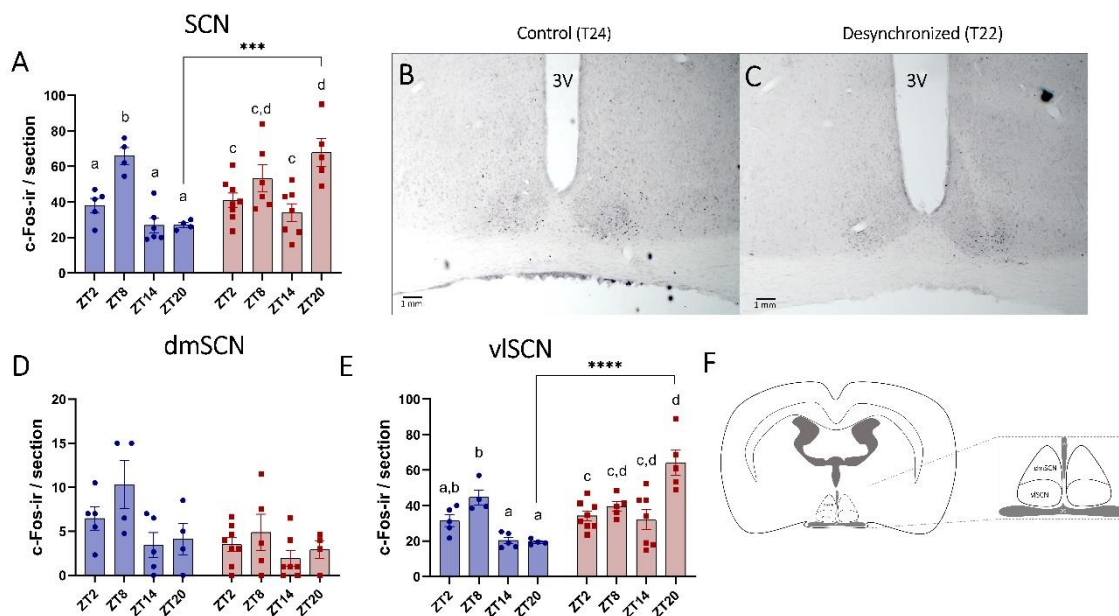


Figura 9. A dessincronização forçada altera a atividade dos neurônios no SCN. (A) O número de neurônios imunorreativos para c-Fos (c-Fos-ir) por secção do SCN são apresentados como média \pm SEM para ratos perfundidos nos ZTs 2, 8, 14 e 20 em diferentes regimes de luz. As letras representam a diferença temporal intragrupo ($p < 0,05$) enquanto asteriscos representam a diferença entre grupos ($p < 0,0005$). A imunorreatividade representada por fotomicrografias de secções marcadas por c-Fos no SCN, ZT2, do grupo (B) Control (T24) e do grupo (C) Desynchronized. A quantia de c-Fos-ir foi separada de acordo com as porções do SCN, sendo então (D) a porção dmSCN, (E) vlSCN, média \pm SEM, as letras apresentam a diferença temporal ($p < 0,05$) intragrupo. ***, $p < 0,0001$; ****, $p < 0,0001$. (F) A divisão entre ventrolateral e dorsomedial foi realizada de acordo com a anatomia do SCN segundo (Paxinos & Watson, 2004). 3V, terceiro ventrículo; CO, quiasma óptico (Adaptado de Cheng & Cheng, 2021).

No entanto, a marcação de c-Fos pode ocorrer nas duas porções do SCN, por isso a contagem foi compartimentalizada nessas porções, seguindo o atlas de Paxinos & Watson (2004) (Fig.9F). A análise da média de neurônios c-Fos-ir da porção dm não mostrou diferenças temporais e a dessincronização não alterou o padrão de expressão de c-Fos (Fig.9D). No entanto, a porção vl apresentou diferenças temporais na expressão de c-Fos nos dois grupos. Nos animais do grupo Control (T24), o número de células c-Fos-ir foi maior no ZT8 quando comparado aos ZT14 e ZT20 (Fig.9E). Já nos animais do grupo Desynchronized (T22) o maior número de células c-Fos-ir foi observado no ZT20 quando comparado ao ZT2 (Fig.9E). Além disso, no ZT20 o

número de células c-Fos-ir foi maior no grupo Desynchronized (T22) quando comparado ao grupo Control (T24) (Fig.9E).

5.4. OS EFEITOS DO DESACOPLAMENTO DO SCN DURANTE A DESSINCRONIZAÇÃO FORÇADA

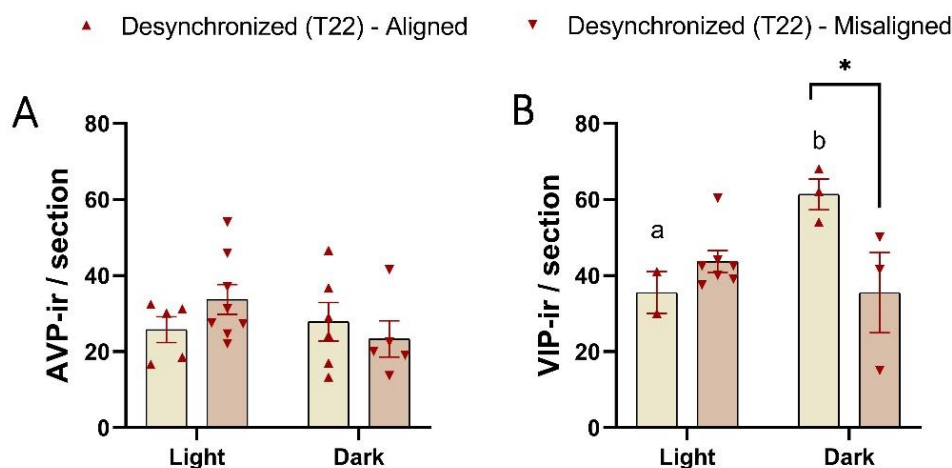


Figura 10. O desalinhamento durante a dessincronização forçada altera VIP-ir na fase escura. (A) Os neurônios AVP-ir e (B) VIP-ir do SCN em ratos perfundidos em diferentes fases e momentos da dessincronização, diferenciados como alinhados e desalinhados. Média \pm SEM, as letras apresentam a diferença temporal ($p < 0,05$) intragrupo. *, $p < 0,05$.

Os animais do grupo Desynchronized (T22) foram classificados em alinhados e desalinhados de acordo com a fase e o perfil de atividade antes da eutanásia, análise realizada pela inspeção do actograma. Aqueles animais que apresentaram padrão de atividade compatível com o estado de repouso durante a fase de escuro do ciclo T22, portanto, não arrastados pela luz, momentos antes da eutanásia, foram considerados desalinhados, já aqueles animais que, momentos antes da eutanásia, apresentavam padrão de atividade compatível com o período de repouso na fase de luz, portanto, arrastados pela luz, foram considerados alinhados.

A contagem de neurônios AVP-ir não foi diferente entre os animais alinhados e desalinhados (Fig. 10 A). A análise da contagem de neurônios VIP-ir mostrou que os animais desalinhados apresentaram menos neurônios VIP-ir na fase escura, sendo equivalente ao VIP-ir na fase clara (Fig. 10 B).

5.5. A CORRELAÇÃO DAS VARIÁVEIS RÍTMICAS DURANTE A DESSINCRONIZAÇÃO FORÇADA

A análise de correlação entre as variáveis é realizada para avaliar se existe alguma correlação significativa entre as variáveis e se ela é positiva ou negativa de acordo com o coeficiente de Pearson. Foi visto que o número de neurônios AVP-ir correlacionou-se negativamente com a SLA nos animais dessincronizados (Tabela 1, Pearson $r = -0,4851$; $p = 0,0221$), assim como c-Fos-ir da porção dmSCN (Tabela 1, Pearson $r = -0,4783$; $p = 0,0221$). No entanto essas correlações de c-Fos-ir em dmSCN e AVP-ir não foram significativas para os animais do grupo Control (T24).

Entre as correlações realizadas com a Tc, somente c-Fos-ir na porção vlSCN do grupo Control (T24) apresentou correlação negativa e significativa com a Tc (Tabela 1, Pearson $r = -0,4577$; $p = 0,0488$). Interessantemente, o protocolo de dessincronização aboliu esta correlação (Tabela 1, Pearson $r = 0.2961$ $p = 0.2328$). Não houve correlação entre as demais variáveis em ambos os grupos.

Tabela 1. Correlação de Pearson de variáveis rítmicas sob dessincronização forçada

Correlation	Pearson R ²	Pearson r	P value	P value summary
AVP-ir (T24) e SLA (T24)	0.02494	-0.1579	0.441	ns
AVP-ir (T22) e SLA (T22)	0.2353	-0.4851	0.0221	*
AVP-ir (T24) e Tc (T24)	0.001479	-0.03846	0.852	ns
AVP-ir (T22) e Tc (T22)	0.01321	-0.1149	0.6199	ns
c-Fos-ir DM (T24) e SLA (T24)	0.02664	-0.1632	0.5176	ns
c-Fos-ir DM (T22) e SLA (T22)	0.2288	-0.4783	0.0221	*
c-Fos-ir DM (T24) e Tc (T24)	0.0078	-0.08832	0.7192	ns
c-Fos-ir DM (T22) e Tc (T22)	0.02161	-0.147	0.587	ns
c-Fos-ir VL (T24) e SLA (T24)	0.01136	0.1066	0.664	ns
c-Fos-ir VL (T22) e SLA (T22)	0.1367	-0.3697	0.1192	ns
c-Fos-ir VL (T24) e Tc (T24)	0.2095	-0.4577	0.0488	*
c-Fos-ir VL (T22) e Tc (T22)	0.08768	0.2961	0.2328	ns
VIP-ir (T24) e SLA (T24)	0.0261	0.1616	0.48	ns
VIP-ir (T22) e SLA (T22)	0.06963	0.2639	0.3837	ns
VIP-ir (T24) e Tc (T24)	0.01149	0.1072	0.6438	ns
VIP-ir (T22) e Tc (T22)	0.1246	0.353	0.23	ns
AVP-ir (T24) e VIP (T24)	0.2018	0.4493	0.041	*
AVP-ir (T22) e VIP (T22)	0.1229	0.3506	0.2001	ns

ns, não significativo. *, $p < 0,05$

De forma interessante, a correlação positiva que era significativa no animal Control (T24) entre AVP-ir e VIP-ir no grupo Control (T24) (Tabela 1, Pearson $r = 0,4493$; $p = 0,041$), foi extinta no animal Desynchronized (T22) (Tabela 1, Pearson $r = 0,3506$; $p = 0,2001$).

6. DISCUSSÃO

O principal achado do nosso estudo foi que a dessincronização forçada não altera o perfil temporal da porção dm, mantendo a atividade neuronal e a expressão de AVP similares às apresentadas pelo grupo Control (T24). Por outro lado, a atividade neuronal da porção vlSCN e a expressão de VIP mostrou-se reduzida nos animais analisados na fase escura, mas na condição de repouso (desalinhados, grupo Misaligned T22). Dessa forma, o oscilador dm parece ser suficiente para manter a expressão de AVP e c-Fos, além de ser resistente a dessincronização do SCN, enquanto o oscilador vl parece não ser suficiente para manter VIP e c-Fos, e ser sensível a dessincronização do SCN.

A dessincronização forçada é caracterizada pela presença de dois componentes circadianos, assim como descrito em Granada (2010), sendo cada componente corresponde a atividade de uma porção do SCN. A presença de dois períodos no registro de SLA e Tc foram identificados

pela inspeção visual do actograma e também pelo periodograma, onde um ritmo mostrou-se arrastado pelo ciclo LD (T22h) e outro determinado pelo ritmo endógeno ($t > 24h$). A construção do periodograma é baseado no procedimento proposto por James Enright, que pode ser pensado como uma ANOVA unidirecional adaptada ao teste de ritmicidade, onde são calculados um índice de variabilidade entre o fluxo de dados (Enright, 1965). A nossa análise foi realizada com base na distribuição do χ^2 (Sokolove e Buchell, 1978). Historicamente, uma comparação de seis métodos de determinação do período circadiano (sem incluir o cosinor de componentes múltiplos) descobriu que o periodograma Enright (qui-quadrado) apresentou a melhor combinação de precisão, tolerância à irregularidade da forma de onda e tolerância ao ruído (Refinetti, 1993). A estatística utilizada no procedimento de χ^2 do periodograma é calculada com base na fórmula a seguir:

$$Q_P = \frac{KN \sum_{h=1}^P (M_h - M)^2}{\sum_{i=1}^N (x_i - M)^2}$$

onde o periodograma construído com base nos valores de Q_p para vários períodos dentro de um intervalo entre 20 e 28h.

O período de um ritmo pode ser afetado por diversos fatores ambientais. Dessa forma, quando em condições de arrastamento, os valores de Q_p serão mais altos e quando em dessincronização podem ser mais baixos, assim como também ocorre na amplitude dos ritmos (Brown et al., 2019). A análise da média de SLA e Tc por ZT no grupo Desynchronized (T22) mostrou um aumento dessas duas variáveis na fase clara, em função dos animais apresentarem um padrão rítmico bimodal. No entanto esses dados apresentaram uma maior dispersão, mostrado pelos dados de SEM. Não se sabe, contudo, que tipo de comportamento pode estar relacionado com este aumento de SLA e Tc na fase escura. Uma possibilidade seria um aumento do forrageamento desses animais, possivelmente em busca do alimento. No entanto, a análise da ingesta alimentar ao longo de 4 semanas em dessincronização mostrou uma redução na ingesta alimentar (dados não apresentados), o que pode ser explicada por uma redução da exposição a fase escura. Outra possibilidade seria alterações no ciclo sono/vigília. Corroborando esta possibilidade, sabe-se que no protocolo de dessincronização, similar à atividade locomotora, o ciclo de sono-vigília e sono de ondas lentas (SWS) exibem dois ritmos: um sincronizado com o ciclo claro-escuro de 22 horas e outro com um período > 24 horas ($t > 24$ h). Então é bem provável que o aumento da SLA e Tc esteja relacionado com um segundo despertar do animal durante a fase clara. Interessantemente, o sono paradoxal (PS) no protocolo de dessincronização forçada segue o ritmo de livre curso, permanecendo dessincronizado, portanto, do SWS (Cambras et al., 2007). Dessa forma, em momento de alinhamento, o animal pode apresentar durante o sono um ECG similar à vigília (sono paradoxal). O procedimento cosinor é uma ferramenta confiável e conveniente para o cálculo do mesor, amplitude e ângulo de fase (acrofase) dos ritmos circadianos (Refinetti et al., 1993). Então, por meio dessa análise foi visto que a dessincronização forçada reduziu a robustez e a amplitude dos ritmos de SLA e Tc, o que pode ser consequência desse segundo despertar do animal, alterando o nível de SLA e Tc e o perfil da oscilação.

Já foi visto por de la Iglesia (2004), que a dessincronização forçada leva a dessincronização da velocidade de TTFL nas porções do SCN. Mas já se sabe que além do mecanismo molecular autônomo da célula, a luz pode afetar diretamente as propriedades do circuito do SCN. Grande parte da robustez dos ritmos do SCN é atribuída ao forte acoplamento entre as células do SCN através dos neurotransmissores VIP, AVP e GABA (Ashton et al., 2021). Não está claro como é mantida a sincronia das porções do SCN, embora a participação de GABA e a comunicação por junções comunicantes sejam opções discutidas na literatura. Uma outra opção para a

sincronia entre vl e dmSCN seria a comunicação mediada por neuropeptídios, já que em cada porção existem neuropeptídeos característicos (VIP e AVP) e eles possuem receptores correspondentes na porção adjacente. Na dessincronização, no entanto, o oscilador dm parece ter perdido o acoplamento com o oscilador vl, uma vez que o protocolo afetou somente o vlSCN para ambos os sinais de saídas analisados (VIP e c-Fos).

Os neurônios VIP-ir são considerados importantes para o foto-arrastamento do SCN, enquanto atribui-se ao AVP a geração de ritmo endógeno do SCN (*pacemaker*) (Mieda, 2019). Considerando o AVP responsável por coordenar a ritmicidade dos *outputs* do SCN, este peptídeo mostrou-se mais conservador e resistente à dessincronia, assim como vimos nos animais desalinhados, que não mudaram o seu perfil de AVP-ir em nenhuma das fases. Dessa forma, sugerimos que a porção dm é altamente governada pelo oscilador próprio, que, no animal dessincronizado, encontra-se desacoplado da porção vl.

A manutenção do perfil temporal de expressão de AVP aponta que a porção dmSCN pode ser responsável pelos padrões rítmicos de SLA. Já foi previamente reportado que esse período se relaciona de forma mais robusta com a porção dmSCN durante a dessincronização forçada (Schwartz et al., 2009). A correlação que existe entre a variação de SLA e AVP-ir e também entre SLA e c-Fos-ir na porção dmSCN reforçam que em condições de dessincronização das porções do SCN, a porção dmSCN foi determinante para o ritmo bimodal de SLA. Dados da literatura corroboram esse achado, já que ratos deficientes em AVP tem os ritmos circadianos atenuados, mas mantém a fase circadiana, e camundongos *knockout* V1a mostram oscilação reduzida da SLA (Hamada et al., 2004; Kalsbeek et al., 2010; Li et al., 2009). As evidências mostram AVP como um sinal de saída do SCN, mediando comunicações inter-neuronais entre o SCN e suas áreas alvo para o arrastamento (Kalsbeek et al., 2010).

O papel de VIP na função circadiana e o seu mecanismo de liberação ainda não são totalmente esclarecidos. Por outro lado, sabe-se que a deleção do gene *Vip* e *Vipr2* reduz quase pela metade o número de neurônios rítmicos no dmSCN, de forma que, a sincronia e a manutenção da ritmicidade ficam prejudicadas (Aton et al., 2005). Embora VIP atenda a maioria dos critérios como um fator de foto-arrastamento no SCN, ele pode não ser o único. Sabe-se que GRP e PK2 e seus receptores são expressos em um padrão semelhante a luz e ao VIP, sendo potenciais sincronizadores, os quais podem operar em situação de dissociação do SCN (McArthur et al., 2000; Piggins et al., 1995).

À semelhança dos achados de Shinohara et al, foi observado diferenças temporais na expressão de VIP no grupo Control (T24), com um pico de VIP-ir na ausência de luz (Shinohara et al., 1993). Esta variação temporal foi perdida nos animais do grupo Desynchronized (T22). A ausência de oscilação temporal no número de neurônios VIP-ir do grupo Desynchronized (T22) quando analisado sem distinguir os animais alinhados e desalinhados pode ser explicada pela diluição da diferença entre os períodos t_{22} e $t > 24$. Ainda assim, esses animais apresentaram uma tendência de oscilação com um atraso de fase, que poderia ter sido significativa em uma amostra maior.

A contagem dos neurônios VIP-ir considerando os animais alinhados e desalinhados, mostrou que em condições de desalinhamento houve redução no número de neurônios VIP-ir. Na fase escura os animais desalinhados apresentaram um perfil semelhante aos animais da fase clara, com menor número de neurônios VIP-ir quando comparado ao animal alinhado da fase escura. É provável que isso tenha ocorrido como uma resposta de retroalimentação do estado de inatividade do animal, impedindo que os neurônios liberassem VIP na fase escura, ou vice-versa, a baixa liberação de VIP pode ter sido responsável pela inatividade do animal na fase

escura. O VIP atua nos neurônios de forma a aumentar os níveis de cálcio e cAMP nos neurônios, o que ocasiona a fosforilação de CREB (Serchov et al., 2017). Esta via de sinalização induz a transcrição de *Per1* e *Per2*, levando ao foto-arrastamento do relógio celular do SCN (Serchov et al., 2017). Já foi mostrado por de la Iglesia (2004) que a expressão de *Per1* também foi alterada em condições de desalinhamento. Interessantemente, o produto proteico dos genes de resposta imediata também participa desta sinalização do foto-arrastamento, facilitando a expressão de *Pers* (Serchov et al., 2017). A avaliação do número de células c-Fos-ir acompanhou o resultado de VIP-ir, indicando que a porção vl esteja respondendo prontamente à luz.

Já foi visto que a regulação fótica dos genes da família fos são alvos do marcapasso circadiano, já que sua proteína se torna imunorreativa após um pulso de luz na noite subjetiva e não no dia subjetivo, mas a interferência do marcapasso na transcrição do c-Fos ainda não está totalmente elucidada. O número de neurônios c-Fos-ir em animais dessincronizados mostrou dois picos, incluindo um na fase escura, no entanto, o c-Fos é um peptídeo que tem sua expressão modulada positivamente pela luz. O aumento do c-Fos na fase escura na porção vlSCN pode ter ocorrido em resposta ao oscilador vl, de forma espontânea, já que não houve indução fótica naquele momento. Este aumento pode ter contribuído com o ritmo circadiano da síntese dos neuropeptídeos do SCN.

7. CONCLUSÃO

A exposição de animais a ciclos de claro e escuro curtos leva a dissociação do SCN e a divisão dos ritmos circadianos em dois períodos. Uma vez que dmSCN e expressão de AVP não se alteram no protocolo de dessincronização, esta porção e peptídeo do SCN não contribuem para o padrão rítmico bimodal apresentado pelos animais dessincronizados. A expressão de AVP se torna independente do vlSCN durante a dessincronização forçada, já que a expressão deste peptídeo foi mantida a despeito da dessincronização forçada. O vlSCN e a expressão de VIP é sensível a dessincronização, uma vez a variação temporal da atividade neuronal é extinta nesta porção, assim como a expressão de VIP. Durante a dessincronização, na condição de alinhamento, a atividade a expressão de VIP assemelha-se ao controle e, na condição de desalinhamento, há uma redução da expressão de VIP, sugerindo que este peptídeo dita o padrão bimodal dos ritmos de SLA e Tc durante a dessincronização.

8. REFERÊNCIAS

- Abrahamson, E. E., & Moore, R. Y. (2001). Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. *Brain Research*, 916(1–2), 172–191. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(01\)02890-6](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)02890-6)
- Albrecht, U. (2012). Timing to Perfection: The Biology of Central and Peripheral Circadian Clocks. *Neuron*, 74(2), 246–260. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2012.04.006>
- Ashton A., Foster R.G., Jagannath A. (2022) Photic Entrainment of the Circadian System. *International Journal of Molecular Sciences.*; 23(2):729. <https://doi.org/10.3390/ijms23020729>
- Aton, S. J., Colwell, C. S., Harmar, A. J., Waschek, J., & Herzog, E. D. (2005). Vasoactive intestinal polypeptide mediates circadian rhythmicity and synchrony in mammalian clock neurons. *Nature Neuroscience* 2005 8:4, 8(4), 476–483. <https://doi.org/10.1038/nn1419>
- Aton, S. J., & Herzog, E. D. (2005). Come Together, Right... Now: Synchronization of Rhythms in a Mammalian Circadian Clock. *Neuron*, 48(4), 531. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2005.11.001>
- Bartness, T. J., Song, C. K., & Demas, G. E. (2001). SCN Efferents to Peripheral Tissues: Implications for Biological Rhythms. *JOURNAL OF BIOLOGICAL RHYTHMS*.
- Berson, D. M., Dunn, F. A., & Takao, M. (2002). Phototransduction by Retinal Ganglion Cells That Set the Circadian Clock. *Science*, 295(5557), 1070–1073. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1067262>
- Bollinger, T., & Schibler, U. (2014). Circadian rhythms – from genes to physiology and disease. *Swiss Medical Weekly*, 144(2930), w13984–w13984. <https://doi.org/10.4414/SMW.2014.13984>
- Brown, L. A., Fisk, A. S., Potheary, C. A., & Peirson, S. N. (2019). Telling the Time with a Broken Clock: Quantifying Circadian Disruption in Animal Models. *Biology* 2019, Vol. 8, Page 18, 8(1), 18. <https://doi.org/10.3390/BIOLOGY8010018>
- Cambras, T., Weller, J. R., Anglès-Pujoràs, M., Lee, M. L., Christopher, A., Díez-Noguera, A., Krueger, J. M., & de la Iglesia, H. O. (2007). Circadian desynchronization of core body temperature and sleep stages in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(18), 7634–7639. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702424104>
- Campuzano, A., Vilaplana, J., Cambras, T., & Díez-Noguera, A. (1998). Dissociation of the Rat Motor Activity Rhythm Under T Cycles Shorter Than 24 Hours. *Physiology & Behavior*, 63(2), 171–176. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(97\)00416-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(97)00416-2)
- Card, J. P., & Moore, R. Y. (1982). Ventral lateral geniculate nucleus efferents to the rat suprachiasmatic nucleus exhibit avian pancreatic polypeptide-like immunoreactivity. *Journal of Comparative Neurology*, 206(4), 390–396. <https://doi.org/10.1002/CNE.902060407>
- Cheng, A. H., & Cheng, H. Y. M. (2021). Genesis of the Master Circadian Pacemaker in Mice. *Frontiers in Neuroscience*, 15, 316. <https://doi.org/10.3389/FNINS.2021.659974/BIBTEX>

- Chu, G., Yoshida, K., Narahara, S., Uchikawa, M., Kawamura, M., Yamauchi, N., Xi, Y., Shigeyoshi, Y., Hashimoto, S., & Hattori, M. A. (2011). Alterations of Circadian Clockworks During Differentiation and Apoptosis of Rat Ovarian Cells. *Chronobiology International*, 28(6), 477–487. <https://doi.org/10.3109/07420528.2011.589933>
- Dardente, H., & Cermakian, N. (2009). Molecular Circadian Rhythms in Central and Peripheral Clocks in Mammals. *Chronobiology International*, 24(2), 195–213. <https://doi.org/10.1080/07420520701283693>
- Dardente, H., Poirel, V. J., Klosen, P., Pévet, P., & Masson-Pévet, M. (2002). Per and neuropeptide expression in the rat suprachiasmatic nuclei: compartmentalization and differential cellular induction by light. *Brain Research*, 958(2), 261–271. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(02\)03563-1](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(02)03563-1)
- Davidson, A. J., Castanon-Cervantes, O., Leise, T. L., Molyneux, P. C., & Harrington, M. E. (2009). Visualizing jet lag in the mouse suprachiasmatic nucleus and peripheral circadian timing system. *European Journal of Neuroscience*, 29(1), 171–180. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06534.x>
- de la Iglesia, H. O., Cambras, T., Schwartz, W. J., & Díez-Noguera, A. (2004). Forced Desynchronization of Dual Circadian Oscillators within the Rat Suprachiasmatic Nucleus. *Current Biology*, 14(9), 796–800. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.04.034>
- Duguay, D., & Cermakian, N. (2009). THE CROSSTALK BETWEEN PHYSIOLOGY AND CIRCADIAN CLOCK PROTEINS. <http://dx.doi.org/10.3109/07420520903497575>, 26(8), 1479–1513. <https://doi.org/10.3109/07420520903497575>
- El Allali, K., Achaâban, M. R., Piro, M., Ouassat, M., Challet, E., Errami, M., Lakhdar-Ghazal, N., Calas, A., & Pévet, P. (2017). The suprachiasmatic nucleus of the dromedary camel (*Camelus dromedarius*): Cytoarchitecture and neurochemical anatomy. *Frontiers in Neuroanatomy*, 11, 103. <https://doi.org/10.3389/FNANA.2017.00103/BIBTEX>
- Enright JT. The search for rhythmicity in biological time-series. *J Theor Biol.* 1965 May;8(3):426-68. doi: 10.1016/0022-5193(65)90021-4. PMID: 5875312.
- Golombek, D. A., & Rosenstein, R. E. (2010). Physiology of circadian entrainment. *Physiological Reviews*, 90(3), 1063–1102. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00009.2009/ASSET/IMAGES/LARGE/Z9J0031025470015.JPEG>
- Hafner, M., Koepl, H., & Gonze, D. (2012). Effect of Network Architecture on Synchronization and Entrainment Properties of the Circadian Oscillations in the Suprachiasmatic Nucleus. *PLoS Computational Biology*, 8(3), e1002419. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002419>
- Hamada, T., Antle, M. C., & Silver, R. (2004). Temporal and spatial expression patterns of canonical clock genes and clock-controlled genes in the suprachiasmatic nucleus. *European Journal of Neuroscience*, 19(7), 1741–1748. <https://doi.org/10.1111/J.1460-9568.2004.03275.X>
- Harmar, A. J., Marston, H. M., Shen, S., Spratt, C., West, K. M., Sheward, W. J., Morrison, C. F., Dorin, J. R., Piggins, H. D., Reubi, J. C., Kelly, J. S., Maywood, E. S., & Hastings, M. H. (2002). The VPAC2 Receptor Is Essential for Circadian Function in the Mouse

Suprachiasmatic Nuclei. *Cell*, 109(4), 497–508. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00736-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00736-5)

- Harrington, M. (1992). Neural Oscillations: Suprachiasmatic Nucleus. *The Mind's Clock*. David C. Klein, Robert Y. Moore, and Steven M. Reppert, Eds. Oxford University Press, New York, 1991. xvi, 467 pp., illus. \$85. *Science*, 257(5073), 1146–1146. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.257.5073.1146.B>
- Huang, R. C. (2018). The discoveries of molecular mechanisms for the circadian rhythm: The 2017 Nobel Prize in Physiology or Medicine. *Biomedical Journal*, 41(1), 5–8. <https://doi.org/10.1016/J.BJ.2018.02.003>
- Hughes, A. T. L., Guilding, C., Lennox, L., Samuels, R. E., McMahon, D. G., & Piggins, H. D. (2008). Live imaging of altered *period1* expression in the suprachiasmatic nuclei of *Vipr2*^{-/-} mice¹. *Journal of Neurochemistry*, 106(4), 1646–1657. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05520.x>
- Jones, J. R., Simon, T., Lones, L., & Herzog, E. D. (2018). SCN VIP Neurons Are Essential for Normal Light-Mediated Resetting of the Circadian System. *Journal of Neuroscience*, 38(37), 7986–7995. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1322-18.2018>
- Kalsbeek, A., & Fliers, E. (2013). *Daily Regulation of Hormone Profiles* (p. 185–226). https://doi.org/10.1007/978-3-642-25950-0_8
- Kalsbeek, A., Fliers, E., Hofman, M. A., Swaab, D. F., & Buijs, R. M. (2010). Vasopressin and the Output of the Hypothalamic Biological Clock. *Journal of Neuroendocrinology*, 22(5), 362–372. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2826.2010.01956.X>
- Kalsbeek, A., Scheer, F. A., Perreau-Lenz, S., La Fleur, S. E., Yi, C. X., Fliers, E., & Buijs, R. M. (2011). CIRCADIAN DISRUPTION AND SCN CONTROL OF ENERGY METABOLISM. *FEBS letters*, 585(10), 1412. <https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2011.03.021>
- Ko, C. H., & Takahashi, J. S. (2006). Molecular components of the mammalian circadian clock. *Human Molecular Genetics*, 15(suppl_2), R271–R277. <https://doi.org/10.1093/HMG/DDL207>
- Korf, H. W., & Von Gall, C. (2016). Neuroscience in the 21st Century: From Basic to Clinical. *Em Circadian Physiology*. (p. 2203–2239). Springer.
- Leak, R. K., & Moore, R. Y. (2001). Topographic organization of suprachiasmatic nucleus projection neurons. *Journal of Comparative Neurology*, 433(3), 312–334. <https://doi.org/10.1002/CNE.1142>
- Lee, M. L., Swanson, B. E., & de la Iglesia, H. O. (2009). Circadian Timing of REM Sleep Is Coupled to an Oscillator within the Dorsomedial Suprachiasmatic Nucleus. *Current Biology*, 19(10), 848–852. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.03.051>
- Li, J. Da, Burton, K. J., Zhang, C., Hu, S. B., & Zhou, Q. Y. (2009). Vasopressin receptor V1a regulates circadian rhythms of locomotor activity and expression of clock-controlled genes in the suprachiasmatic nuclei. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 296(3), 824–830. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.90463.2008>

- Lima, L., & Vargas, N. (2014). O Relógio Biológico e os ritmos circadianos de mamíferos: uma contextualização histórica. *Revista da Biologia*, 12(2), 1–7. <https://doi.org/10.7594/revbio.12.02.01>
- Mazuski, C., Abel, J. H., Chen, S. P., Hermanstynne, T. O., Jones, J. R., Simon, T., Doyle, F. J., & Herzog, E. D. (2018). Entrainment of Circadian Rhythms Depends on Firing Rates and Neuropeptide Release of VIP SCN Neurons. *Neuron*, 99(3), 555–563.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.06.029>
- McArthur, A. J., Coogan, A. N., Ajpru, S., Sugden, D., Biello, S. M., & Piggins, H. D. (2000). Gastrin-Releasing Peptide Phase-Shifts Suprachiasmatic Nuclei Neuronal Rhythms In Vitro. *The Journal of Neuroscience*, 20(14), 5496. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-14-05496.2000>
- Michael, A. K., Fribourgh, J. L., Chelliah, Y., Sandate, C. R., Hura, G. L., Schneidman-Duhovny, D., Tripathi, S. M., Takahashi, J. S., & Partch, C. L. (2017). Formation of a repressive complex in the mammalian circadian clock is mediated by the secondary pocket of CRY1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(7), 1560–1565. <https://doi.org/10.1073/pnas.1615310114>
- Mieda, M. (2019). The network mechanism of the central circadian pacemaker of the SCN: Do AVP neurons play a more critical role than expected? *Frontiers in Neuroscience*, 13(FEB), 139. <https://doi.org/10.3389/FNINS.2019.00139/BIBTEX>
- Mistlberger, R. E., & Antle, M. C. (2011). Entrainment of circadian clocks in mammals by arousal and food. *Essays in Biochemistry*, 49, 119–136. <https://doi.org/10.1042/BSE0490119/78192>
- Miyazato, M., Mori, K., Ida, T., Kojima, M., Murakami, N., & Kangawa, K. (2008). Identification and functional analysis of a novel ligand for G protein-coupled receptor, Neuromedin S. *Regulatory peptides*, 145(1–3), 37–41. <https://doi.org/10.1016/J.REGPEP.2007.08.013>
- Moga, M. M., & Moore, R. Y. (1997). Organization of Neural Inputs to the Suprachiasmatic Nucleus in the Rat. *J. Comp. Neurol*, 389, 508–534. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19971222\)389:3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19971222)389:3)
- Mohawk, J. A., Green, C. B., & Takahashi, J. S. (2012). Central and Peripheral Circadian Clocks in Mammals. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-060909-153128>, 35, 445–462. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-NEURO-060909-153128>
- Moore, R. Y., Speh, J. C., & Leak, R. K. (2002). Suprachiasmatic nucleus organization. *Cell and Tissue Research*, 309(1), 89–98. <https://doi.org/10.1007/S00441-002-0575-2/METRICS>
- Mori, K., Miyazato, M., Ida, T., Murakami, N., Serino, R., Ueta, Y., Kojima, M., & Kangawa, K. (2005). Identification of neuromedin S and its possible role in the mammalian circadian oscillator system. *The EMBO journal*, 24(2), 325–335. <https://doi.org/10.1038/SJ.EMBOJ.7600526>
- Morin, L. P. (2013). Neuroanatomy of the extended circadian rhythm system. *Experimental Neurology*, 243, 4–20. <https://doi.org/10.1016/J.EXPNEUROL.2012.06.026>
- Nagano, M., Adachi, A., Nakahama, K. I., Nakamura, T., Tamada, M., Meyer-Bernstein, E., Sehgal, A., & Shigeyoshi, Y. (2003). An abrupt shift in the day/night cycle causes

- desynchrony in the mammalian circadian center. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 23(14), 6141–6151.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-14-06141.2003>
- Nakamura, W., Yamazaki, S., Takasu, N. N., Mishima, K., & Block, G. D. (2005). Differential Response of Period 1 Expression within the Suprachiasmatic Nucleus. *The Journal of Neuroscience*, 25(23), 5481. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0889-05.2005>
- Oster, H., Challet, E., Ott, V., Arvat, E., de Kloet, E. R., Dijk, D. J., Lightman, S., Vgontzas, A., & Van Cauter, E. (2017). The Functional and Clinical Significance of the 24-Hour Rhythm of Circulating Glucocorticoids. *Endocrine Reviews*, 38(1), 3–45.
<https://doi.org/10.1210/ER.2015-1080>
- Partch, C. L., Green, C. B., & Takahashi, J. S. (2014). Molecular architecture of the mammalian circadian clock. *Trends in Cell Biology*, 24(2), 90–99.
<https://doi.org/10.1016/J.TCB.2013.07.002>
- Paxinos, G., & Watson, C. (2004). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates—The New Coronal* (5th ed). Elsevier Academic Press.
- Piggins, H. D., Antle, M. C., & Rusak, B. (1995). Neuropeptides phase shift the mammalian circadian pacemaker. *The Journal of Neuroscience*, 15(8), 5612.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-08-05612.1995>
- Provencio, I., Rollag, M. D., & Castrucci, A. M. (2002). Photoreceptive net in the mammalian retina. *Nature* 2002 415:6871, 415(6871), 493–493. <https://doi.org/10.1038/415493a>
- Ralph, M. R., Foster, R. G., Davis, F. C., & Menaker, M. (1990). Transplanted Suprachiasmatic Nucleus Determines Circadian Period. *Science*, 247(4945), 975–978.
<https://doi.org/10.1126/SCIENCE.2305266>
- Refinetti, R., Germaine, C.L., Halberg, F. (1993) Procedures for numerical analysis of circadian rhythms. *Biol Rhythm Res*, 2007; 38(4): 275–325.
<https://doi.org/10.1080%2F09291010600903692>
- Refinetti, R. Comparison of six methods for the determination of the period of circadian rhythms. *Physiol Behav*. 1993;54:869–875.
- Reinberg, A. E., Ashkenazi, I., & Smolensky, M. H. (2009). Euchronism, Allochronism, and Dyschronism: Is Internal Desynchronization of Human Circadian Rhythms a Sign of Illness? <http://dx.doi.org/10.1080/07420520701534624>, 24(4), 553–588.
<https://doi.org/10.1080/07420520701534624>
- Roenneberg, T., & Merrow, M. (2005). Circadian clocks — the fall and rise of physiology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2005 6:12, 6(12), 965–971. <https://doi.org/10.1038/nrm1766>
- Schaap, J., Albus, H., VanderLeest, H. T., Eilers, P. H. C., Détári, L., & Meijer, J. H. (2003). Heterogeneity of rhythmic suprachiasmatic nucleus neurons: Implications for circadian waveform and photoperiodic encoding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(26), 15994–15999.
https://doi.org/10.1073/PNAS.2436298100/SUPPL_FILE/6298FIG9.PDF

- Schnell, A., Chappuis, S., Schmutz, I., Brai, E., Ripperger, J. A., Schaad, O., Welzl, H., Descombes, P., Alberi, L., & Albrecht, U. (2014). The Nuclear Receptor REV-ERB α Regulates Fabp7 and Modulates Adult Hippocampal Neurogenesis. *PLOS ONE*, *9*(6), e99883. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0099883>
- Schwartz, M. D., Congdon, S., & De La Iglesia, H. O. (2010). Phase Misalignment between Suprachiasmatic Neuronal Oscillators Impairs Photic Behavioral Phase Shifts But Not Photic Induction of Gene Expression. *Journal of Neuroscience*, *30*(39), 13150–13156. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1853-10.2010>
- Schwartz, M. D., Wotus, C., Liu, T., Friesen, W. O., Borjigin, J., Oda, G. A., & de la Iglesia, H. O. (2009). Dissociation of circadian and light inhibition of melatonin release through forced desynchronization in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(41), 17540–17545. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906382106>
- Serchov, T., Heumann, R., (2017) Ras Activity Tunes the Period and Modulates the Entrainment of the Suprachiasmatic Clock. *Frontiers in Neurology*, *8*, 1664-2295. <https://doi.org/10.1093%2Fcvr%2Fcvy251>
- Shinohara, K., Tominaga, K., Isobe, Y., & Lnouye, S.-L. T. (1993). Photic Regulation of Peptides Located in the Ventrolateral Subdivision of the Suprachiasmatic Nucleus of the Rat: Daily Variations of Vasoactive Intestinal Polypeptide, Gastrin-releasing Peptide, and Neuropeptide Y. *The Journal of Neuroscience*, *13*(2), 793–800.
- Smolensky, M. H., Hermida, R. C., Reinberg, A., Sackett-Lundeen, L., & Portaluppi, F. (2016). Circadian disruption: New clinical perspective of disease pathology and basis for chronotherapeutic intervention. *Chronobiology International*, *33*:8, 1101-1119 <https://doi.org/10.1080/07420528.2016.1184678>
- Sokolove PG, Bushell WN. The chi square periodogram: its utility for analysis of circadian rhythms. *J Theor Biol.* 1978;*72*:131–160.
- Takahashi, J. S. (2017). Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock. *Nature Reviews. Genetics*, *18*(3), 164. <https://doi.org/10.1038/NRG.2016.150>
- Vitaterna, M. H., Takahashi, J. S., & Turek, F. W. (2001). Overview of Circadian Rhythms. *Alcohol Research & Health*, *25*(2), 85. [/pmc/articles/PMC6707128/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12867072/)
- Welsh, D. K., Logothetis, D. E., Meister, M., & Reppert, S. M. (1995a). Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron*, *14*(4), 697–706. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90214-7](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90214-7)
- Welsh, D. K., Logothetis, D. E., Meister, M., & Reppert, S. M. (1995b). Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron*, *14*(4), 697–706. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90214-7](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90214-7)
- Welsh, D. K., Takahashi, J. S., & Kay, S. A. (2010). Suprachiasmatic Nucleus: Cell Autonomy and Network Properties. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021909-135919>, *72*, 551–577. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-PHYSIOL-021909-135919>
- Wotus, C., Lilley, T. R., Neal, A. S., Suleiman, N. L., Schmuck, S. C., Smarr, B. L., Fischer, B. J., & de la Iglesia, H. O. (2013). Forced Desynchrony Reveals Independent Contributions of

Suprachiasmatic Oscillators to the Daily Plasma Corticosterone Rhythm in Male Rats. *PLoS ONE*, 8(7), e68793. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068793>

Yamaguchi, S., Isejima, H., Matsuo, T., Okura, R., Yagita, K., Kobayashi, M., & Okamura, H. (2003). Synchronization of Cellular Clocks in the Suprachiasmatic Nucleus. *Science*, 302(5649), 1408–1412. <https://doi.org/10.1126>