

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS, LETRAS E ARTES
DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA

JEANDERSON SOARES PARENTE

Efeito da cronitoruptura por T22 nas fases pós-natal da infância e adolescência sobre a expressão neuroquímica de NeuN e PV no hipocampo, córtex pré-frontal, amígdala e núcleo supraquiasmático de ratos *Wistar* adultos

JOAO PESSOA, PB
2021

JEANDERSON SOARES PARENTE

Efeito da crono-ruptura por T22 nas fases pós-natal da infância e adolescência sobre a expressão neuroquímica de NeuN e PV no hipocampo, córtex pré-frontal, amígdala e núcleo supraquiasmático de ratos *Wistar* adultos

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em neurociência cognitiva e comportamento no Programa de Pós-graduação em neurociência cognitiva e comportamento da UFPB.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Freitas Barbosa
Coorientadora: Ywilliane da Silva Rodrigues Meurer

JOAO PESSOA, PB
2021

Efeito da crono-ruptura por T22 nas fases pós-natal da infância e adolescência sobre a expressão neuroquímica de NeuN e PV no hipocampo, córtex pré-frontal, amígdala e núcleo supraquiasmático de ratos *Wistar* adultos

JEANDERSON SOARES PARENTE

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em neurociência cognitiva e comportamento pelo Programa de Pós-graduação em Neurociência Cognitiva e Comportamento da UFPB. Os membros da banca examinadora atestam que a presente dissertação foi apresentada e aprovada.

Data da aprovação: 30 agosto de 2021

BANCA EXAMINADORA



Prof. (a) Dr. (a) Flávio Freitas Barbosa
Orientador(a)
Universidade Federal da Paraíba



Prof. (a) Dr. (a) Leandro Rodrigo Ribeiro
Membro Interno
Universidade Federal da Paraíba



Prof. (a) Dr. (a) Rovená Clara Galvão Januário Engelberth
Membro Externo
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

P228e Parente, Jeanderson Soares.

Efeito da cronoruptura por T22 nas fases pós-natal da infância e adolescência sobre a expressão neuroquímica de NeuN e PV no hipocampo, córtex pré-frontal, amígdala e núcleo supraquiasmático de ratos Wistar adultos / Jeanderson Soares Parente. - João Pessoa, 2021.

70 f.:il.

Orientação: Flávio Freitas Barbosa.

Coorientação: Ywilliane da Silva Rodrigues Meurer.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCHLA.

1. Neurociência cognitiva. 2. Ritmo circadiano. 3. Dessincronização. 4. Ruptura circadiana. 5. Atividade locomotora. 6. Parvalbumina. I. Barbosa, Flávio Freitas. II. Meurer, Ywilliane da Silva Rodrigues. III. Título.

UFPB/BC

CDU 159.9:612.8(043)

AGRADECIMENTOS

À minha mãe **Espedita Soares** e ao meu pai **Jean Carlos**, por todo suporte e educação que me deram. Tive a sorte de absorver o melhor que cada um de vocês me ofereceram e muito do que sou hoje devo a vocês. Tenho muito orgulho de tê-los como meus pais. Agradeço especialmente a minha mãe por todo o apoio durante esse período. Somos uma família de professores e a paixão pela educação corre em minhas veias graças a você.

À minha irmã **Isabele Soares**, por ser a melhor companhia que eu poderia pedir nessa estrada da vida. Você é uma das pessoas mais incríveis e brilhantes que já conheci e tenho muito orgulho de ter uma minha irmã mais nova que me ensinou tanto.

À minha prima **Sara** e meus amigos **Alexsandro**, **Ramon** e **Nadjanine** por tornarem a minha vida mais leve, divertida e prazerosa. Uma das principais coisas que a neurociência me ensinou é que a qualidade das relações é um fator determinante para o bem-estar e a qualidade de vida. Uma das principais razões da minha estabilidade emocional se deve ao fato de que, independente do que aconteça comigo, eu sei que tenho vocês. À **Alexsandro**, obrigado mana.

À todos os amigos e companhias que tive aqui em João Pessoa, graças a essas experiências eu pude viver, curtir e amadurecer muitos anos em um só.

Agradeço à **CAPES** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa durante todo o período de realização deste mestrado.

À **Grayce Alencar** por todos esses anos de caminhada, ensinamentos e apoio. Você de fato me orientou em diversos sentidos. Foi por causa dos nossos trabalhos, que ainda hoje vem dando frutos, que consegui em primeiro lugar na seleção desse mestrado. Todos esses anos de trabalho juntos me garantiram a maturidade acadêmica necessária para que eu concluísse esse mestrado da forma mais leve possível.

À **Flavio Freitas** por ser o melhor orientador que eu poderia pedir. Tenho muita sorte por ter sido orientadores tão incríveis. O laboratório que você construiu, tal como a dedicação, compreensão e humanidade com que nos trata, garantiu um ambiente tão próspero que aconselhador que eu nunca poderia ter imaginado. Não me vejo fazendo doutorado em outro lugar se não no LEMCOG.

À equipe da crono e toda a família LEMCOGUIANA pelos ensinamentos, conversas, companhias e diversões. Sem vocês essa experiência não teria sido tão incrível.

Um agradecimento hiper especial a **Ywlliane da Silva**, a pessoa que mais me apoiou, ensinou, inspirou e motivou ao longo desse mestrado. O nível de gratidão, carinho e admiração que tenho por você não podem ser descritos aqui. Eu jamais teria chegado onde cheguei e aprendido o que aprendi se não fosse você. O que você me ensinou vai muito além do qualquer conhecimento técnico-científico. Você inspira pelo exemplo. Durante toda a minha vida acadêmica citei muitas referências em meus trabalhos, mas sem sombra de dúvidas, a minha maior referência tem sido você. No fim da qualificação, vieram de você as palavras de apoio que eu mais precisava ouvir. Obrigado por tudo.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	25
2.1 Objetivo geral	25
2.2 Objetivos específicos	25
3 MÉTODO	26
3.1 Animais e condições de manutenção	26
3.2 Desenho experimental	26
3.3 Perfusão e microtomia	27
3.4 Processamento imunohistoquímico	28
3.5 Análise de dados	29
3.5.1 Atividade motora	29
3.5.2 Processamento e análise da imunohistoquímica	30
3.5 Análise estatística dos dados	31
4 RESULTADOS	32
4.1 Ritmo de atividade locomotora	32
4.2 Efeito da dessincronização circadiana em T22 no número de neurônios reativos para proteína Neu-N	35
4.3 Efeito da dessincronização circadiana em T22 no número de neurônios Parvalbumina positivos	38
5 DISCUSSÃO	43
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	52
7 REFERÊNCIAS	53
MATERIAL SUPLEMENTAR	60
ANEXO A – Parecer aprovado pela Comissão Ética no Uso de Animais	70

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1 - DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS ENTRE DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS E CONTROLE NO NÚMERO DE NEURÔNIOS REATIVOS A NEUN NAS ÁREAS DO CPFM E HIPOCAMPO, JOÃO PESSOA, 2021.	35
TABELA 2 - DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS ENTRE DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS E CONTROLE NO NÚMERO DE NEURÔNIOS REATIVOS A PV NAS ÁREAS DO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL MEDIAL, HIPOCAMPO E AMÍGDALA, JOÃO PESSOA, 2021.	39

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - DIVISÃO ANATOMOFUNCIONAL DO NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO.	12
FIGURA 2 - VIAS AFERENTES DO NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO.	13
FIGURA 3 - ACTOGRAMA DE DESSINCRONIZAÇÃO FORÇADA PELO PROTOCOLO T22.	15
FIGURA 4 - ALTERAÇÕES CIRCADIANAS AO LONGO DA ONTOGÊNESE.	17
FIGURA 5 - TIMELINE DO DESENHO EXPERIMENTAL DO ESTUDO.	23
FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA IMUNORREATIVIDADE PELO COMPLEXO ABC	25
FIGURA 7 - ACTOGRAMA E PERIODOGRAMAS DE SOKOLOVE-BUSHELL DO EXPERIMENTO COMPLETO DO GRUPO DISSOCIADO NA INFÂNCIA.	28
FIGURA 8 - ACTOGRAMA E PERIODOGRAMAS DE SOKOLOVE-BUSHELL DO EXPERIMENTO COMPLETO DO GRUPO DISSOCIADO NA ADOLESCÊNCIA.	29
FIGURA 9 - ACTOGRAMAS E PERIODOGRAMAS DE SOKOLOVE-BUSHELL DO EXPERIMENTO COMPLETO DO GRUPO CONTROLE.	30
FIGURA 10 – NÚMERO DE NEURÔNIOS REATIVOS A NEUÑ NO CÓRTEX PRÉ-FONTAL MEDIAL.	31
FIGURA 11 – NÚMERO DE NEURÔNIOS REATIVOS A PROTEÍNA NEUÑ NO HIPOCAMPO.	33
FIGURA 12 – NÚMERO DE NEURÔNIOS REATIVOS A PROTEÍNA NEUÑ NO NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO DE RATOS SUBMETIDOS AO PROTOCOLO DE DESSINCRONIZAÇÃO CIRCADIANA T22 NA INFÂNCIA E ADOLESCÊNCIA COMPARADOS AO GRUPO CONTROLE.	35
FIGURA 13 – NÚMERO DE NEURÔNIOS REATIVOS A PARVALBUMINA NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL MEDIAL.	36
FIGURA 14 – NÚMERO DE NEURÔNIOS REATIVOS A PARVALBUMINA NO HIPOCAMPO.	38
FIGURA 15 – NÚMERO DE NEURÔNIOS REATIVOS A PARVALBUMINA NA AMÍGDALA.	40

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABC	Complexo Avidina-Biotina-Peroxidase
ANOVA	Análise de variância, do inglês “Analysis of Variance”.
BL	Núcleo Amidalóide Basolateral
BLV	Núcleo Amidalóide Basolateral Ventral
CCHLA	Centro de Ciências Humanas, Letras e Artes
CA	Córtex Cingulado Anterior
CA1	Região 1 do Corno de Amon
CA2	Região 2 do Corno de Amon
CA3	Região 3 do Corno de Amon
CE	Claro-Escuro
CEUAS	Comissões de Ética no Uso de Animais
CORT	Corticosterona
CPF	Córtex Pré-Frontal
CPFm	Córtex Pré-Frontal Medial
DA	Dissociados na adolescência
DAB	Diaminobenzidina
DI	Dissociados na infância
DNA	Ácido desoxirribonucleico
df	Grau de liberdade (do inglês <i>degree of freedom</i>)
F	Estatística
FIG	Folheto Intergeniculado
GABA	Ácido Gama-Aminobutírico
GD	Giro Denteado
GLU	Glutamato
IL	Córtex Infra-Límbico
LaDL	Núcleo Amidalóide Lateral
LAM	Labirinto aquático de Morris
LEMCOG	Laboratório de Estudos em Memória e Cognição
dmNSQ	Porção Dorsomedial do Núcleo Supraquiasmático
M	Molar
NDR	Núcleo Dorsal da Rafe
NeuN	Proteína Nuclear Neuronal
NMR	Núcleo Mediano da Rafe
NSQ	Núcleo Supraquiasmático
PACAP	Polipeptídio Ativador da Adenilato-Ciclase Pituitária
P	Valor de P
PIV	Polipeptídeo Intestinal Vasoativo
PN	Pós-natal
PL	Córtex Pré-Límbico
PV	Parvalbumina
PV	Percentual de variância

REA	Reconhecimento Espacial Associativo
RON	Reconhecimento de Objetos Novos
SAP	Sistema para Acionamento Programado
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
T	Período
T22	Período de 22 horas
TCA	Teste de Campo Aberto
TF	Tampão Fosfato
TFX	Triton X
TNF	Teste de Natação Forçada
TPS	Teste de Preferência a Sacarose
TGH	Trato Geniculado-Hipotalâmico
TRH	Trato Retino-Hipotalâmico
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
UFRN	Universidade Federal do Rio Grande do Norte
vINSQ	Porção Ventrolateral do Núcleo Supraquiasmático

RESUMO

Diversos estudos sobre ruptura circadiana em modelos animais utilizaram a dessincronização circadiana interna forçada empregando a exposição a ciclos anormais de claro-escuro (CE). Tais ciclos podem afetar o comportamento emocional e cognitivo, embora os mecanismos subjacentes às consequências de longo prazo não tenham sido totalmente esclarecidos. Com o objetivo de avaliar a ruptura circadiana na atividade locomotora e na sinalização de parvalbumina e NeuN, expusemos ratos Wistar recém-nascidos a um ciclo de CE de 22h simétrico (11h claro, 11h escuro) durante a infância (grupo DI) e adolescência (grupo DA). Os ratos do grupo DI foram expostos ao ciclo CE de 22 horas durante a gravidez e lactação, enquanto os ratos do grupo DA foram expostos ao mesmo esquema de CE desde o desmame até o dia 61 pós-natal. Todos os ratos foram ressincronizados e mantidos em um ciclo de LD de 24 horas até a idade adulta. O grupo controle foi exposto a um ciclo regular CE de 12:12h ao longo da vida. Verificamos que os grupos DI ($PV = 27,12 \pm 4,49$) e DA ($PV = 29,56 \pm 6,69$) apresentaram menor estabilidade do ritmo quando comparados ao Grupo Controle ($PV = 33,25 \pm 6,39$). Ambos os grupos DI e DA expressaram dois ritmos circadianos de atividade locomotora, analisados através de actogramas e periodogramas de Sokolove-Bushell, enquanto o grupo controle apresentou um ritmo estável sincronizado ao ciclo CE de 24h. Não foram observadas diferenças na expressão de NeuN e parvalbumina no córtex pré-frontal, hipocampo, amígdala, e núcleo supraquiasmático entre os grupos ($p > 0.05$), embora os grupos DI e DA dessincronizados tenham mostrado qualitativamente menos rotulagem de neurônios, o que merece ser investigado mais detalhadamente. Assim, concluímos que os animais expostos ao ciclo LD de 22h ao longo do desenvolvimento, recuperaram a estabilidade do ritmo na atividade locomotora e não alteraram o número de neurônios ou a expressão da parvalbumina em áreas do cérebro relacionadas a comportamentos cognitivo-emocionais após a ressincronização ao ciclo CE de 24h.

Palavras-chave: ritmo circadiano; dessincronização; ruptura circadiana; atividade locomotora, parvalbumina.

ABSTRACT

Many studies of circadian disruptions in animal models have involved a forced internal circadian desynchronization using abnormal exposure to light/dark cycles. These abnormal cycles may affect emotional and cognitive behavior, although the mechanisms underlying the long-term consequences remains unclear. Aimed to evaluate circadian disruptions on locomotor activity and parvalbumin and NeuN signalization, we exposed newborns Wistar rats a symmetric 22hr LD cycle (11hr light, 11hr dark) during infancy (DI group) and adolescence (DA group). Rats of the DI group were exposed to 22hr LD cycle throughout pregnancy and lactation, while rats of DA group were exposed to a same LD schedule from weaning to postnatal day 61. All rats were resynchronized and maintained in a 24hr LD cycle until adulthood. The control group was exposed to regular 12:12h light-dark cycle over lifetime. We found that the DI ($PV = 27,12 \pm 4,49$) and DA ($PV = 29,56 \pm 6,69$) group presented lower rhythm stability when compared with Control group ($PV = 33,25 \pm 6,39$). Both DI and DA groups expressed two circadian rhythms on locomotor activity analyzed using Sokolove-Bushell actograms and periodograms, while Control group showed a stable rhythm synchronized with 24hr LD cycle. We did not observed differences in NeuN or parvalbumin expression in the prefrontal cortex, hippocampus, amygdala, and suprachiasmatic nucleus between groups ($p > 0.05$) although both DI and DA desynchronized groups had showed qualitatively fewer neurons labeling, which deserve to be investigated further. Thus, we conclude that animals exposed to 22hr LD cycle along development recovery the rhythm stability on locomotor activity and did not change the number of neurons or parvalbumin expression in brain areas related to emotional-cognitive behaviors after resynchronization under 24hr LD cycles.

Keywords: circadian rhythm; desynchronization; circadian disruption; locomotor activity, parvalbumin.

1 INTRODUÇÃO

Desde o amanhecer e anoitecer decorrentes do movimento da terra à órbita translacional dos corpos celestes ao redor de sua estrela, padrões cíclicos de ritmicidade determinam a conformação funcional e organizacional dos diversos elementos que constituem o universo. Quando tais processos rítmicos ocorrem de maneira cíclica nos seres vivos, estes são denominados ritmos biológicos (Araújo & Marques, 2002; Pereira, 2017). A grande variedade de ritmos biológicos torna evidente que processos autônomos que ocorrem de forma periódica contribuem para a coordenação dos processos vitais assegurando uma função adaptativa que permite que os seres possam antecipar as mudanças periódicas do ambiente, assegurando a obtenção de alimentos, reprodução, disponibilidade de abrigo e fuga de predadores (Winfree, 1976; Menna-Barreto; Marques, 2003).

Dentre os ritmos biológicos, os ritmos circadianos são aqueles que possuem duração aproximada de vinte e quatro horas (Aschoff, 1960; Golombek *et al.*, 2013). Eles participam de todos os níveis de organização biológica, regulando desde o ciclo celular até a arquitetura do sono, incluindo também múltiplas variáveis fisiológicas e comportamentais (Casiraghi, Alzamendi & Giovambattista, 2016). Os ritmos circadianos nos mamíferos são gerados e sincronizados pelo Sistema de Temporização Circadiano (STC), composto por uma rede de osciladores centrais e periféricos que permite com que os ritmos endógenos de cada indivíduo possam se sincronizar aos ciclos ambientais externos através de três vias principais, que envolvem desde a captação dos estímulos fóticos pela retina até a modulação de efeitos não-fóticos por meio de vias neuropeptidérgicas e/ou serotoninérgicas (Alves, 2017; Albuquerque, 2014).

Os osciladores centrais são compostos pelo Núcleo Supraquiasmático (NSQ), uma estrutura formada por aglomerados de neurônios densamente compactados em um núcleo organizado e localizado bilateralmente na região periventricular do hipotálamo ventral anterior, adjacente ao terceiro ventrículo e logo acima do quiasma óptico (Hafner, Hoepp & Gonze, 2012; Rocha, 2010). Essa estrutura é considerada o principal marcapasso circadiano dos mamíferos, responsável por gerar ritmos com períodos de 24 horas por meios das informações luminosas recebidas do ambiente pela retina, controlando assim os osciladores circadianos periféricos localizados no córtex, glândula pineal, fígado, rins e coração (Hafner, Hoepp & Gonze, 2012; Rocha, 2010; De La Iglesia *et al.*, 2004; Albuquerque, 2014).

Essa estrutura se divide em duas porções principais de acordo com sua anatomia, função e composição neuroquímica: a porção ventrolateral (vlNSQ), também chamada de

“cerne” ou “core” e a porção dorsomedial (dmNSQ), também conhecida como “casca” ou “shell”. O neurotransmissor Ácido Gama-Aminobutírico (GABA) é sintetizado por quase todos os neurônios em ambas as porções do NSQ (Alves, 2017; Pereira, 2017).

A porção vlNSQ está conectada ao meio externo e contém o principal campo de aferência ao trato retino-hipotalâmico (TRH), a primeira de três vias que compõem o STC, responsável pela sincronização do ritmo circadiano ao claro-escuro ambiental. O TRH é a principal via de sincronização fótica dos ritmos circadianos. Através dele as informações fóticas do meio externo são captadas pelas células ganglionares da retina que expressam o fotopigmento melanopsina e são enviadas por projeções diretas até os neurônios imunorreativos ao Polipeptídeo Intestinal Vasoativo (PIV), sintetizados pelos neurônios das porções ventrolaterais do NSQ (Figura 1). O glutamato (Glu) e o Polipeptídeo Ativador da Adenilato-Ciclase Pituitária (PACAP) são libertados nas sinapses terminais do TRH e figuram como os principais neurotransmissores envolvidos nessa sinalização (Rocha, 2010; Pereira, 2017; Albuquerque, 2014).

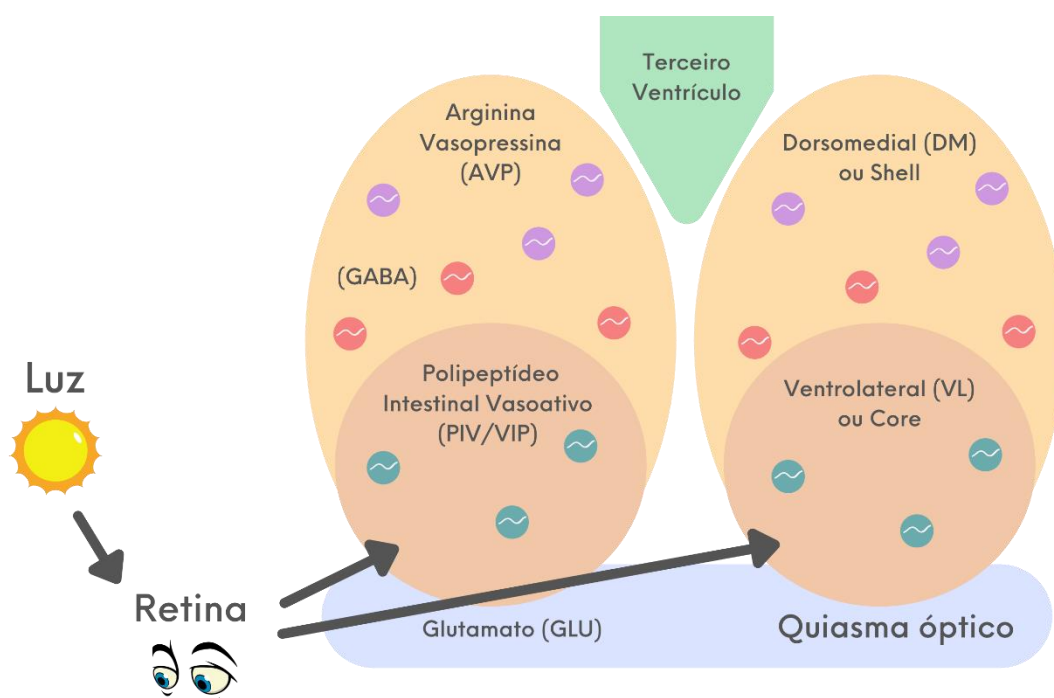


Figura 1 - Divisão anatomofuncional do Núcleo Supraquiasmático. O NSQ é dividido em dois núcleos idênticos localizados individualmente em cada hemisfério. Cada núcleo é composto por duas porções, a ventrolateral (VL) e a dorsomedial (DM,) mostradas na imagem à direita. Estas se distinguem de acordo com sua função, anatomia e pelo tipo de neurotransmissores que liberam. Na porção vlNSQ os neurônios expressam principalmente PIV (mostrado no hemisfério esquerdo), enquanto na porção dmNSQ, o principal neurotransmissor expressado é o AVP. Apenas um subconjunto de células na porção vlNSQ são sensíveis à luz e são arrastados por pistas luminosas originadas do quiasma óptico (OC). Elaboração própria adaptada de Hafner, Hoepp & Gonze (2012).

No que concerne às demais vias que compõem o STC, destaca-se a via do Trato Geniculohipotalâmico (TGH), formado pelas projeções retinianas dos neurônios do Folheto Intergeniculado (FIG). Essa via está associada à modulação de estímulos luminosos e não luminosos. É através dela que as informações sobre a luminosidade ambiental são indiretamente enviadas ao NSQ (Pereira, 2017; Albuquerque, 2014).

A terceira e última via é constituída pelas terminações serotoninérgicas (5-HT) dos núcleos dorsal e mediano da rafe (DRN e MRN, respectivamente), cujas fibras que se projetam para o NSQ participam da regulação não luminosa deste núcleo, que processa a informação e a transmite para os osciladores periféricos permitindo assim, a sincronização dos ritmos endógenos (Figura 2) (Pereira, 2017; Albuquerque, 2014).

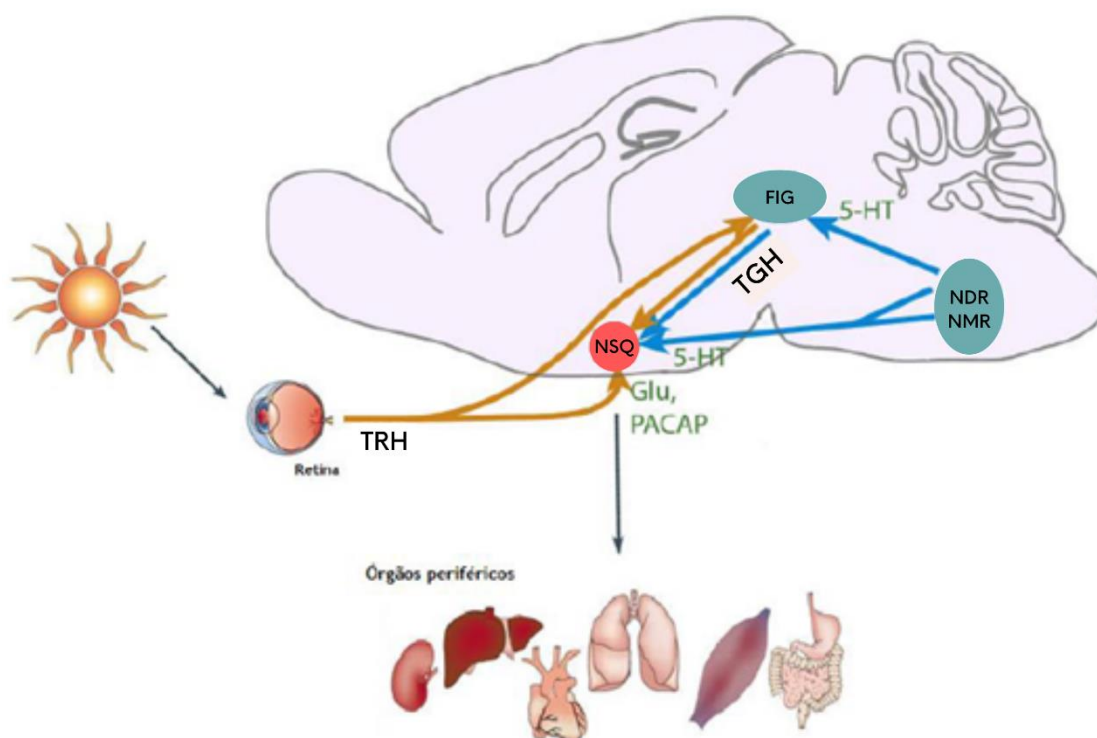


Figura 2 - Vias aferentes do núcleo supraquiasmático. As células ganglionares da retina fotossensíveis transmitem a informação luminosa do ambiente diretamente para o NSQ pelo TRH. Essas informações também chegam ao NSQ indiretamente pelo Folheto Intergeniculado (FIG) via TGH. As informações não fóticas são enviadas pelas vias serotoninérgicas (5HT) dos Núcleos Dorsal e Mediano da Rafe (NDR e NMR). O NSQ funciona como um oscilador circadiano central que gera ritmicidade circadiana, sendo necessário para a sincronização dos outros osciladores periféricos (Adaptado de Albuquerque, 2014).

O NSQ transmite informações aos osciladores periféricos presente nos órgãos por meio do sistema nervoso simpático e parassimpático e através de sinais fóticos e humorais que sinalizam a rede de osciladores sobre o estado de energia do corpo, os quais podem se ativar

em decorrência dos horários de alimentação e exercícios, indicando os momentos em que se deve descansar e procurar alimento (Logan & Colleen, 2019). Quando esses sinais fóticos e humorais sinalizam que o suprimento de energia está repleto, os sinais de feedback negativo nos osciladores garantem que o organismo não se envolva em comportamentos de busca de alimentos, excluindo outras atividades homeostáticas críticas (Schwartz & Zeltser, 2013).

Esses feedbacks negativos e positivos compõem as alças moleculares que caracterizam os loops transcricional e translacional no relógio molecular dos mamíferos, responsáveis por produzir a oscilação de 24 horas. A alça positiva é impulsionada por meio do processo de dimerização, que consiste na formação de uma molécula maior a partir de duas menores. Esse processo ocorre através do gene *Bmal1* que produz diferentes dímeros ao se ligar com a proteína *kaput* presente no gene *CLOCK* ou com a proteína 2 do domínio PAS neuronal (*NPAS2*) (Logan & Colleen, 2019). Esses diferentes dímeros se ligam a caixas intensificadoras (E-box) em promotores de genes para regular a transcrição de genes controlados por relógio (CCGs), incluindo aqueles que codificam as proteínas Período (PER) e Criptocromo (CRY) (Logan & Colleen, 2019). No caso da alça negativa, as proteínas PER e CRY atuam nesse complexo inibindo a atividade transcricional do dímero *CLOCK-BMAL1*, reprimindo sua própria expressão (Duong *et al.* 2013; Logan & Colleen, 2019, Bernard *et al.*, 2007).

No que concerne à porção dorsomedial do NSQ, ela é principalmente composta por uma população de neurônios que sintetizam arginina-vasopressina (AVP). Essa porção não recebe inervação fótica do TRH, mas é indiretamente inervada por meio das projeções vindas da porção vlNSQ. Se esta última representa a expressão rítmica arrastada pela luz que oscila com um período igual ao ciclo externo, enquanto a porção dmNSQ expressa o ritmo endógeno que não é arrastado e funciona livremente com um período maior que 24h (Rocha, 2010; De La Iglesia *et al.*, 2004; De La Iglesia, Cambras & Díez-noguera, 2016; Albuquerque, 2014).

Para produzir um ritmo unificado e estável, as células de ambas as porções do NSQ devem oscilar em sincronia. Essa sincronização e oscilação é obtida por meio de mecanismos de acoplamento intercelular através de loops de feedback transcricional e translacional expressos por genes relógio nos neurônios do NSQ, que se interconectam e formam uma rede circadiana central, permitindo que cada célula produza oscilações circadianas (Hafner, Hoepp & Gonze, 2012).

Quando o grau de acoplamento desses osciladores é alto, eles apresentarão um ângulo de fase estável que produz um padrão de ritmicidade unificado, mas quando esses osciladores são desacoplados por meio de conflitos existentes entre as informações temporais internas ou

externas, o oscilador circadiano central pode ser acometido por um fenômeno denominado cronoruptura (Ben-Hamo *et al.*, 2016; Erren & Reiter, 2009).

A cronoruptura é caracterizada por mudanças ambientais que levam a distúrbios cronobiológicos provocando um colapso dos sistemas biológicos internos em relação aos externos, levando à dissociação e a perda das relações normais de fase. Exposições ou efetores exógenos e endógenos cronobiologicamente ativos que podem interromper o tempo e a ordem dos ritmos biológicos, ou seja, a organização temporal das funções fisiológicas e hierarquias, são denominados cronodisruptores (Erren & Reiter, 2009).

Para além da cronoruptura, o termo dessincronização circadiana também é usualmente utilizado na literatura para se referir ao desajuste entre os ritmos externo e interno dos seres. Tanto a cronoruptura como a dessincronização são comuns no meio social. Elas comumente acontecem quando os indivíduos são expostos a sistemas de trabalho em turno, horários de verão, viagens transmeridianas, *jet lag* social entre outras. Esses fenômenos promovem a dessincronização entre os osciladores endógenos pela exposição a diferentes fotoperíodos em curtos intervalos de tempo (Davis & Mirick, 2006; Scheer *et al.*, 2009).

Uma das principais formas de se estudar os efeitos e as consequências desse fenômeno de uma forma ética, segura e controlada, é simulando essa dessincronização em modelos animais através de protocolos específicos de dessincronização forçada. Nesse contexto, um dos modelos mais utilizados é o chamado protocolo T22, CE22 (claro-escuro) ou LD22 (day-light), que consiste na manutenção de um ciclo claro-escuro simétrico com período de 22 horas, onde tanto a fase clara como a fase escura possuem duração de 11h. Esse protocolo induz o desacoplamento de ambas as porções de osciladores neuronais do NSQ: a ventrolateral (vlNSQ) e a dorsomedial (dmNSQ) (Pereira, 2017; Campuzano *et al.*, 1998; De La Iglesia *et al.*, 2004; Ben-Hamo *et al.*, 2016).

Sob essa condição, os animais expressam simultaneamente dois padrões de ritmicidade circadiana caracterizados por diferentes picos de atividade locomotora. O primeiro é expresso pelo vlNSQ e está associado à luz e ao ciclo externo de 22 ou 24 horas. O segundo é expresso pelo dmNSQ e está associado ao ciclo endógeno do animal que é superior a 24 horas, cujo ritmo ocorre em livre-curso. Esse fenômeno de dessincronização circadiana, manifestado pelo desacoplamento entre as duas porções do NSQ, são comumente visualizados por meio de gráficos específicos que registram a atividade locomotora dos animais, os chamados actogramas e periodogramas (Pereira, 2017; Campuzano *et al.*, 1998; De La Iglesia *et al.*, 2004; Ben-Hamo *et al.*, 2016).

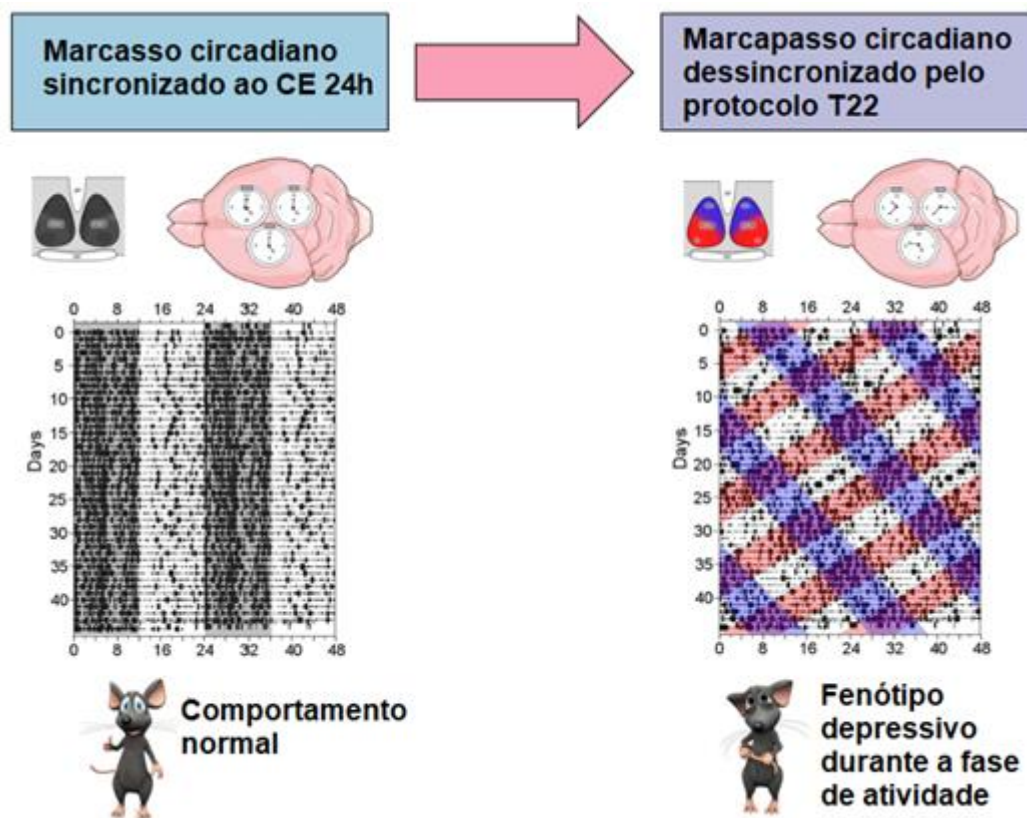


Figura 3 - Actograma de dessincronização forçada pelo protocolo T22. Cada ponto representa a expressão de atividade locomotora do rato em um determinado tempo. No eixo x de cada gráfico são mostradas as horas e no eixo y a quantidade de dias. Na imagem da esquerda, a faixa cinza representa a fase escura do animal (período de atividade), enquanto a faixa branca representa a fase clara. Na imagem da direita, a faixa vermelha representa o período de atividade expresso pela porção vlNSQ, enquanto a azul é expressa pela porção dmNSQ. Os gráficos estão duplamente plotados para facilitar a visualização (Adaptado de Ben-Hamo et al., 2016).

Em seres humanos, ainda não existem evidências suficientes que atestem que a dessincronização espontânea ou forçada dos ritmos fisiológicos e comportamentais também sejam representados pela atividade desses dois osciladores independentes e se seria possível identificar essas estruturas anatomicamente. De qualquer modo, já é bem consolidado na literatura que a dessincronização entre os osciladores centrais e periféricos ocasionados, por exemplo, por regimes de trabalho em turno e exposição excessiva à luminosidade artificial entre outros, estão correlacionados a prejuízos cognitivos e comportamentais e a uma maior vulnerabilidade a quadros patológicos como insônia, cardiopatias, distúrbios gastrointestinais, obesidade, diabetes e até câncer (Davis & Mirick, 2006; Scheer *et al.*, 2009).

Não obstante, a dessincronização circadiana também está fortemente relacionada ao surgimento de psicopatologias, tais como estresse, depressão e ansiedade. É bastante comum

que pacientes com quadros psicopatológicos apresentem interrupções nos seus ritmos circadianos, incluindo alterações do ciclo sono-vigília, variações na temperatura corporal, variações hormonais, falta ou excesso de apetite, desregulação dos ritmos metabólicos ou endócrinos, entre outros. Essas evidências sugerem que a desregulação dos ritmos circadianos pode estar relacionada à fisiopatologia dos transtornos de humor, podendo constituir inclusive, parte de sua etiologia. Nesse contexto, terapias com luzes, avanços de fase, privação do sono e terapias interpessoais e de ritmo social mostraram-se eficazes para o tratamento dos transtornos de humor (Ben-Hamo *et al.*, 2016).

Importante destacar também que a dessincronização pode ocasionar consequências diferentes a depender da faixa etária em que ocorre a exposição à luz. Sabe-se que tanto os seres humanos como uma imensa variedade de outros animais não nascem com seus ritmos circadianos definidos. Ao contrário, tais ritmos apresentam características e funções distintas entre diferentes fases da vida. Esses padrões de ritmicidade circadiana surgem durante a primeira infância e sofrem modificações ao longo de todo o processo de origem e desenvolvimento de um ser, processo esse denominado ontogênese (Grinevich *et al.*, 2015; Cambras *et al.*, 1997).

A ontogênese dos ritmos circadianos se refere às investigações sobre o perfil de desenvolvimento dos ritmos biológicos e descreve o estabelecimento das estruturas que os produzem em decorrência do padrão e da maturação genética de acordo com os estágios do neurodesenvolvimento (Pringuey, Tible & Cherikh, 2009).

Nesse contexto, o tempo em que o sono e vigília se iniciam e as flutuações nos níveis de melatonina, são exemplos de ritmos biológicos que se modificam durante a ontogênese. Tais ritmos são expressos mais cedo durante a primeira infância em relação aos adultos, se modificando durante a adolescência. Essa mudança no tempo pode ser conservada tanto entre roedores como em primatas não humanos (Logan & McClun, 2019).

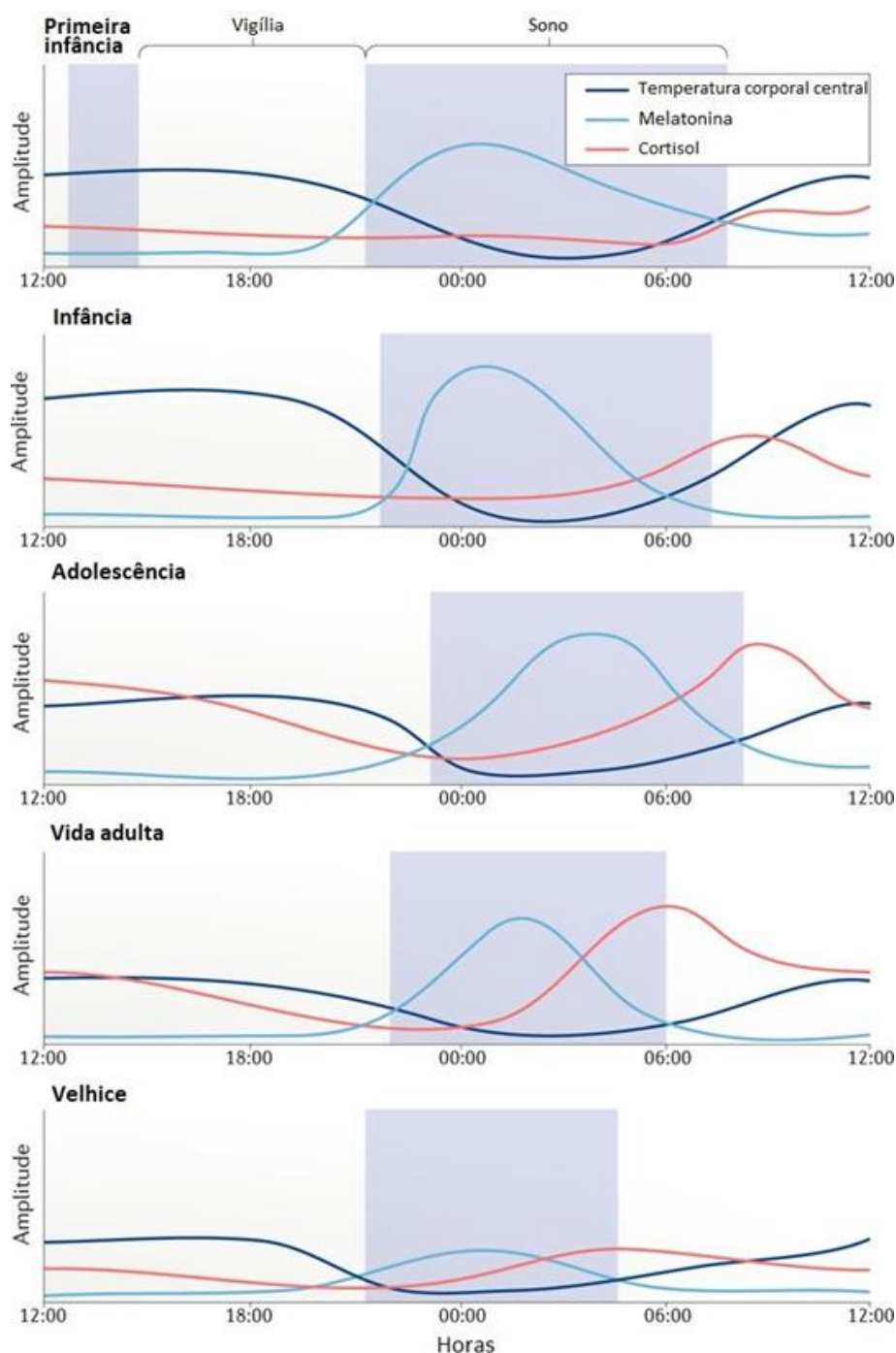


Figura 4 - Alterações circadianas ao longo da ontogênese. Na primeira infância os ritmos sono-vigília são ultradianos e se consolidam durante o primeiro ano de desenvolvimento. Da infância para a adolescência o cronotipo vai se tornando tardio, posteriormente retornando a um estado precoce durante a idade adulta, onde a duração do sono é mais curta. Os ritmos sofrem uma perda gradual de amplitude com o envelhecimento. A infância é o período em que a temperatura corporal está mais elevada, com a amplitude reduzindo progressivamente até o envelhecimento. Os ritmos da melatonina são atrasados durante a adolescência, o que explica a maior vespertinidade característica dessa fase. Estudos com roedores demonstraram que os ritmos de atividade do NSQ diminuem gradualmente ao longo da ontogênese (não mostrado). Os ritmos do cortisol atingem o pico no início da manhã durante a infância e, com a idade, aumentam e reduzem gradualmente a amplitude geral. A amplitude da expressão rítmica do gene no cérebro e em outros tecidos é reduzida durante o envelhecimento, afetando a homeostase e a função do tecido (não mostrado) (Adaptado de Logan & McClun, 2019).

No final da gestação, os ritmos de atividade metabólica e de expressão gênica são evidentes no NSQ de roedores e em primatas não humanos, no entanto, o papel do desenvolvimento pré-natal precoce para os ritmos e para a fisiologia do feto ainda é pouco compreendido (Logan & Mcclun, 2019).

No que tange a maturação dos ritmos circadianos nas proteínas dos genes relógio no NSQ durante a ontogenia. Um estudo realizado com camundongos em quatro diferentes estágios da ontogenia: fetal (18º dia embrionário), recém-nascido (dois dias de idade), infantil (10 dias de idade) e adulto identificou que imunorreações de todas as proteínas do relógio foram significativamente mais baixas em comparação com os níveis de adultos, exceto para BMAL1. As imunorreações semelhantes àsquelas encontradas na vida adulta começaram a partir da infância (Ansari *et al.*, 2009).

Em humanos, por volta da 36ª semana de gestação o NSQ já se desenvolveu, mas as conexões nervosas responsáveis pelo funcionamento efetivo do sistema de temporização ainda não estão maduras. Antes do nascimento, todos os ritmos biológicos do feto estão sincronizados pelos ritmos maternos. Após o nascimento, o STC precisa se ajustar a uma nova realidade temporal, que já não é mais totalmente mediada pela mãe, mas também pela entrada de informações fóticas e demais pistas ambientais como sons, comida, manipulações e intervenções (Menna-Barreto & Wey, 2007). Desse modo, a infância é a fase da ontogênese em que o STC trabalha para sincronizar os ritmos internos e externos. Com a puberdade, a adolescência, é marcada por profundas transformações morfológicas, hormonais e sociais, que provoca avanços de fase fazendo com que o STC passe por uma crise temporal que tende a ser superada apenas na vida adulta (Menna-Barreto & Wey, 2007).

No que tange aos efeitos das perturbações circadianas ao longo da ontogênese, um estudo com ratas grávidas expostas ao trabalho simulado em turnos indicou redução substancial no ganho de peso dessas mães durante o início da gravidez, além delas também terem sofrido perturbações profundas nos níveis de corticosterona, glicose, insulina, leptina, ácidos graxos livres, triglicerídeos e concentrações de colesterol. Além disso, essas mães também apresentaram redução do peso da gordura retroperitoneal e do fígado. O estudo concluiu que as interrupções do fotoperíodo podem interromper gravemente os perfis circadianos normais dos hormônios plasmáticos e metabólitos, tal como a expressão gênica nos tecidos materno e fetal, podendo produzir consequências para a homeostase metabólica do feto que podem durar a vida

toda, como aumento da adiposidade, hiperinsulinemia e baixa tolerância à glicose e à insulina no feto (Varcoe *et al.*, 2013; Logan & Mcclun, 2019).

Ainda no período pré-natal, outros estudos demonstraram que perturbações circadianas ocorridas nesse período também estão associadas à memória espacial prejudicada da prole e comportamentos de evitação social e hiperatividade nos filhotes, além de prejuízos da função imune adaptativa e aumento dos comportamentos semelhantes à depressão em seus descendentes (Vilches *et al.*, 2014; Voiculescu *et al.*, 2016; Smarr *et al.*, 2017; Cissé, Russart & Nelson, 2017a, 2017b).

No que concerne à primeira infância, a luz é o principal estímulo sincronizador dos ritmos circadianos dos filhotes após o nascimento, dado que nessa fase da vida os fotorreceptores de melanopsina são responsivos à luz após a gestação e sofrem reorganização e maturação funcionais durante as primeiras semanas de vida. Nos ratos, as entradas fóticas para o NSQ amadurecem após o 10º dia pós-natal (PN10), enquanto nos camundongos essas vias atingem a maturidade no PN14, no momento em que os olhos se abrem totalmente (Logan & Mcclun, 2019).

Perturbações circadianas na primeira infância, tais como a exposição de humanos recém-nascidos a padrões variados de iluminação na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) Neonatal, demonstraram que as condições de iluminação ciclada (CE 12:12) são mais eficazes que as condições de luz esmaecida irregularmente ou quase escuridão para o crescimento de bebês prematuros com três e seis meses de idade. Quando expostas a essa iluminação ciclada, os bebês apresentaram ganho de peso maior e mais rápido que aqueles expostos a condições de luz forte ou fraca, o que encurtou efetivamente suas estadias no hospital (Morag & Ohlsson, 2013).

No que tange à adolescência, estudos demonstraram que o protocolo de dessincronização forçada pelo modelo T22 não induziu a um comportamento do tipo ansioso nem prejudicou a memória aversiva de ratos *Wistar* machos submetidos aos testes de Campo Aberto (CA) e Esquiva Passiva (EP) (Pereira, 2017). Em contrapartida, a dessincronização forçada pelo referido modelo, prejudicou o desempenho de ratos nas tarefas de memória de Reconhecimento de Objetos Novos e Reconhecimento Espacial Associativo (Araújo, 2017).

Quanto aos efeitos da dessincronização na vida adulta, o protocolo T22 induziu a uma manifestação fenotípica de depressão em ratos, incluindo anedonia, disfunção sexual e aumento da imobilidade no teste de natação forçada (TNF), tal como alterações nos níveis e taxas de renovação de monoaminas no córtex pré-frontal (Ben-Hamo *et al.*, 2016). Outro estudo apresentou resultados contrários àqueles observados durante a adolescência descritos pelos

estudos de Pereira (2017) e Araújo (2017). O estudo em questão foi realizado com 28 ratos *Wistar* machos adultos (4-7 meses) também dessincronizados pelo modelo T22, no qual se observou comprometimento da memória aversiva de ratos submetidos ao teste de EP, mas não na memória de reconhecimento de objetos (Neto *et al.*, 2008).

A hipótese levantada para explicar essa diferença sugere que esse fenômeno ocorre devido à capacidade plástica das regiões corticais, sobretudo do córtex pré-frontal e também na amígdala, que se encontra em processo de maturação das funções comportamentais durante a adolescência, tornando esses organismos mais flexíveis e adaptáveis às mudanças que ocorrem nesse período da vida (Juraska & Willing, 2017; Lopes-Aguiar *et al.*, 2012). Desse modo, essa maior capacidade plástica na adolescência garantiria maior resistência e adaptação a protocolos experimentais de estresse crônico, reduzindo possíveis prejuízos cognitivos e emocionais durante essa fase da vida e preservando a performance mnemônica em testes de memória, especialmente com conteúdo aversivo, de curto e longo prazo (Pereira, 2017; Araújo, 2017).

Ademais, sabe-se que estas características também são fortemente influenciadas por significativas alterações morfofuncionais ao longo do neurodesenvolvimento, de modo que a formação e maturação do sistema nervoso dependem de processos de migração neuronal e densidade celular que devem ocorrer dentro do padrão espaço-temporal apropriado. As constantes alterações no número de células neuronais e gliais ao longo do neurodesenvolvimento são exemplos disso (Rahimi-Balaei *et al.*, 2018; Paolicelli *et al.*, 2011).

Durante a infância e adolescência, especialmente, uma série de mudanças estruturais ocorrem no sistema nervoso central, por exemplo no circuito frontoestriatal, onde ocorrem mudanças como neurogliogênese, angiogênese, crescimento axonal, sinaptogênese e poda sináptica. Desse modo, infecções pré-natais, mutações genéticas, disfunções microgliais, intervenções ou distúrbios ocorridos durante os processos de migração neuronal e maturação funcional em períodos críticos do desenvolvimento, podem acarretar em distúrbios do neurodesenvolvimento, doenças neuropsiquiátricas e neuropatologias de início tardio (Rahimi-Balaei *et al.*, 2018; Reemst *et al.*, 2016; Sakai, 2020; Paolicelli *et al.*, 2011; Stiles & Jernigan, 2010).

Nesse contexto alterações na ritmicidade circadiana e do sono podem amplificar as respostas comportamentais através da maior redução de controle de atividade cortical e aumento da atividade de circuitos, como o circuito de recompensa, o que pode favorecer alterações epigenéticas no relógio molecular e modificação da função dos circuitos de recompensa e, conseqüentemente, a longo prazo uma maior vulnerabilidade para o abuso de drogas (Hamidullah, Thorpe, Frie, Mccurdy, & Khokhar, 2020; Winters & Arria, 2011; Karatsoreos,

2014). Os efeitos a longo prazo de modificações nos ritmos circadianos em crianças e adolescentes também estão fortemente associados a depressão e a gravidade dos sintomas de humor. Embora os mecanismos subjacentes a essas associações permaneçam pouco elucidados, uma possibilidade também é que alterações nos ritmos circadianos e no ciclo de sono vigília afetem a poda sináptica e a maturação de circuitos neurais durante a adolescência (Rahimi-Balaei *et al.*, 2018; Reemst *et al.*, 2016; Sakai, 2020; Paolicelli *et al.*, 2011; Stiles & Jernigan, 2010).

Em conjunto, esses estudos evidenciam a importância de se elucidar os aspectos comportamentais e neuroquímicos dos efeitos da dessincronização circadiana ao longo de cada estágio do neurodesenvolvimento. Apesar disso, são bastante escassas as investigações a esse respeito, sobretudo aquelas que envolvem o protocolo de dessincronização forçada pelo modelo T22. Ademais, segundo o conhecimento dos autores, são inexistentes os estudos que determinam de que modo a dessincronização circadiana na infância e adolescência afetam a memória e expressão do comportamento do tipo ansioso e depressivo na fase adulta a nível comportamental e neuroquímico.

No que tange aos aspectos neuroquímicos, sabe-se que o desequilíbrio da atividade de disparo de neurônios excitatórios e inibitórios (E/I) está relacionado a prejuízos cognitivos e comportamentais associados à fisiopatologia da depressão, ansiedade, além de déficits na memória, de modo que a sinalização inibitória alterada contribui para esse contexto. Nesse sentido, interneurônios GABAérgicos de pico rápido que expressam parvalbumina (PV) mostraram ter um papel chave para a manutenção do equilíbrio E/I, uma vez que estes estão envolvidos na sincronia neuronal rítmica rápida que facilita o processamento de informações durante tarefas cognitivas (Harkness *et al.*, 2021; Cabungcal *et al.*, 2013).

Assim sendo, distúrbios relacionados à ritmicidade circadiana foram associados à alterações na densidade de proteínas de matriz extracelular de interneurônios GABAérgicos PV+ e associadas ao desequilíbrio E/I. Esses interneurônios são mais suscetíveis à desregulação redox e ao estresse oxidativo devido aos seus altos requisitos metabólicos, de modo que a maior densidade da matriz extracelular atua protegendo esses interneurônios contra esses efeitos. Desse modo, distúrbios circadianos e privação do sono parecem provocar alterações na densidade da matriz extracelular, aumentando a suscetibilidade das células PV+ ao estresse oxidativo, comprometendo também a sincronia neuronal rítmica (Harkness *et al.*, 2021; Cabungcal *et al.*, 2013; Pantazopoulos *et al.*, 2020).

Desse modo, a presente investigação trabalha para testar a hipótese de que a dessincronização circadiana forçada pelo protocolo T22 modificaria o número total de

neurônios reativos a proteína nuclear neuronal (NeuN) e interneurônios PV positivos em diferentes condições experimentais, provocando alterações do equilíbrio E/I, comprometendo a formação e consolidação das memórias e induzindo a um comportamento do tipo ansioso e depressivo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracterizar os efeitos da dessincronização circadiana em duas fases do período pós-natal sobre a expressão neuroquímica de parvalbumina e no número total de neurônios em áreas do circuito córtico-limbico e no núcleo supraquiasmático de ratos *Wistar* na idade adulta.

2.2 Objetivos específicos

Em ratos *Wistar* machos na idade adulta submetidos a dessincronização circadiana – em duas idades da vida pós-natal (até PN21 e entre PN21 e PN61) – pretendeu-se avaliar:

- a) o padrão de atividade locomotora;
- b) a expressão de parvalbumina em células de áreas do córtex pré-frontal medial, amígdala e hipocampo;
- c) a expressão da proteína NeuN em células de áreas do córtex pré-frontal medial, hipocampo e núcleo supraquiasmático.

3 MÉTODO

3.1 Animais e condições de manutenção

O projeto em questão se trata de um fragmento do projeto “Efeitos da dessincronização interna na memória, ansiedade e depressão de ratos *Wistar* ao longo da ontogênese” aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) sob o protocolo nº 5688110518 (ID 000297).

Foram utilizados 12 ratos machos da linhagem *Wistar* nascidos no laboratório mediante pareamento de três casais, nos quais uma fêmea grávida foi submetida ao ciclo T22 e duas ao T24. Desse modo, considera-se que a dissociação no grupo DI se iniciou ainda na fase pré-natal. Os filhotes permaneceram alojados individualmente em gaiolas de propileno (40 x 32 x 17 cm) mantidas em cabines de madeira iluminadas por fitas de LEDs de luz branca equipadas com sensores de movimento para detecção da atividade locomotora. Essas cabines permaneceram em uma sala com atenuação acústica, temperatura e umidade controlada e os animais tiveram acesso *ad libitum* a comida e água.

O estudo foi realizado entre 2019 a 2021 no Laboratório de Estudos em Memória e Cognição (LEMCOG) localizado no Centro de Ciências Humanas, Letras e Artes (CCHLA) da UFPB.

3.2 Desenho experimental

Uma vez que os ratos são animais de hábitos noturnos, foi necessário alinhar as fases de atividade entre os pesquisadores e os animais a fim de que o experimento fosse conduzido num horário confortável para ambos. Desse modo, na primeira semana após a chegada dos animais, todos os seis genitores (três fêmeas e três machos) foram submetidos à inversão de fase. Na semana seguinte, os animais foram pareados e divididos nos três grupos anteriormente citados. Constatada a gravidez, os machos foram retirados das gaiolas e as fêmeas permaneceram na cabine até o período de desmame dos filhotes.

Dentre os filhotes que nasceram, foram selecionados 12 machos, posteriormente divididos em três grupos de quatro. Esse número amostral foi definido com base na quantidade limite de compartimentos individuais em cada cabine e nas limitações impostas pela pandemia de Sars-CoV-2.

Esses animais foram submetidos a dessincronização circadiana em duas idades da vida pós-natal: a) O primeiro grupo, dessincronizado na infância, nasceu e permaneceu no ciclo T22

até o desmame, que acontece por volta do 20º dia pós-natal (PN20), período que corresponde a infância desses animais. A partir do PN21 os animais permaneceram sob o ciclo T24 (12 horas na fase clara e 12 horas na fase escura) até o fim do experimento. b) Os filhotes do segundo grupo nasceram em T24 e foram submetidos ao T22 entre o PN21 e PN61, considerado o período de adolescência. Após esse momento, os animais retornaram ao ciclo T24 e assim permaneceram até o fim do experimento. c) Por fim, foi definido um grupo controle, cujos filhotes nasceram e permaneceram no CE 24 ao longo de toda a pesquisa (figura 5).

A partir do PN62 os animais foram submetidos a testes comportamentais entre o PN90 e PN110 (não incluídos nessa pesquisa) que avaliaram o padrão de atividade motora, o comportamento tipo ansioso e as memórias de reconhecimento, espacial associativa e aversiva, respectivamente. Passado esse período, se iniciaram as etapas referentes à perfusão, craniotomia, microtomia, processamento e análises imunohistoquímicas entre o PN134 e PN314.

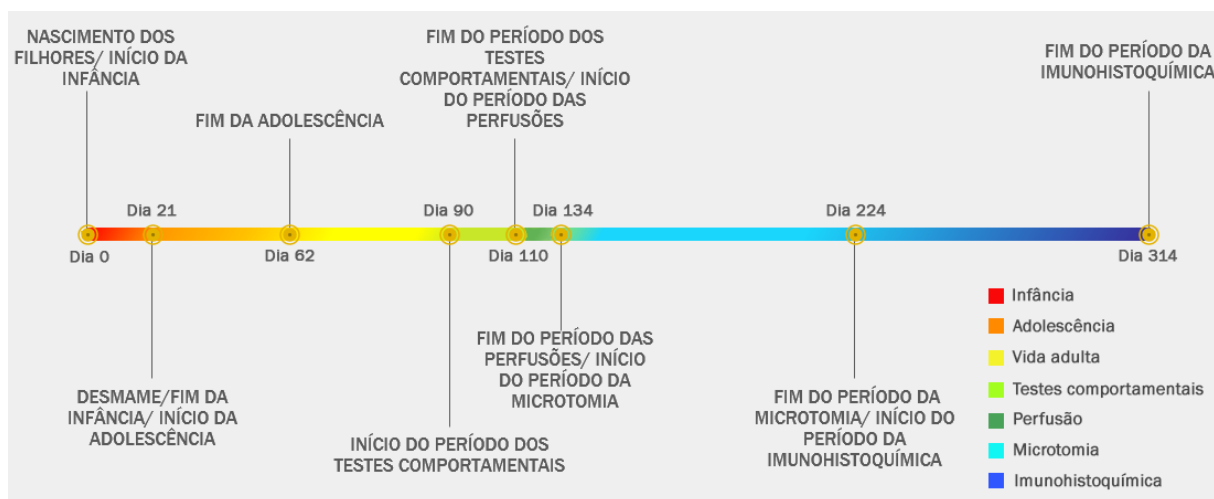


Figura 5 – Delineamento experimental do estudo.

3.3 Perfusão e microtomia

Os animais foram anestesiados por tiopental sódico associado a cloridrato de lidocaína na proporção de 0,95mg e 0,05mg, respectivamente, sendo posteriormente perfundidos em suas fases de atividade com solução salina a 0,9% em Tampão Fosfato (TF) 0,2 Molar (M) pH 7,4 associado a cloreto de sódio e solução fixadora de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,2 pH 7,4. Após a fixação dos tecidos e craniotomia, os encéfalos permaneceram por 24h em tampão sacarose a 30% crescido da referida solução fixadora e água destilada. Posteriormente,

se deu a pós-fixação em solução sacarose a 30% e paraformaldeído a 4%, onde os cérebros permaneceram refrigerados até o momento em que foram cortados no criostato.

Por meio de um micrótomo de criostato (Leica), os cérebros foram cortados em secções coronais com espessura de 50 μ m distribuídos sequencialmente em quatro compartimentos individuais contendo solução anticongelante à base de etileno-glicol e tampão fosfato, a fim de garantir a crioproteção das secções a uma temperatura de -20°C (Santos *et al.*, 2013).

3.4 Processamento imunohistoquímico

Os cortes foram submetidos ao processamento imunohistoquímico por agitação livre mediante protocolo de detecção enzimática tipo ABC (complexo avidina-biotina-peroxidase). As secções foram submetidas a constantes lavagens de 5min em tampão fosfato 0,1M pH 7.4 e posteriormente tratados com peróxido de hidrogênio durante 20min. Em seguida, os cortes permaneceram em solução de leite Molico™ com TF 0,1M durante 1 hora, para posteriormente, serem incubadas em solução contendo o anticorpo primário. Foi utilizado anticorpo de camundongo anti-rato para proteína nuclear neuronal (NeuN, 1:5000) e coelho anti-rato para a proteína parvalbumina (PV, 1:5.000) diluídos em tampão fosfato 0,1 M contendo 0,3% de Triton X-100 (TFX). Os cortes permaneceram nessa solução durante 16 horas sob agitação continua. Após o tempo de agitação, as secções foram incubadas em solução TFX com anticorpo secundário diluído na proporção de 1:1000 (anti-camundongo para NeuN e anti-coelho para PV), assim permanecendo durante 2 horas. Em seguida, os cortes foram incubados durante 2 horas em solução TFX mais NaCl 0,9% e complexo AB 0,5%. Após a incubação, as secções foram imunocoradas com Diaminobenzidina (DAB) durante 5min sendo posteriormente mantidas no peróxido de hidrogênio durante 7 min (Figura 6).

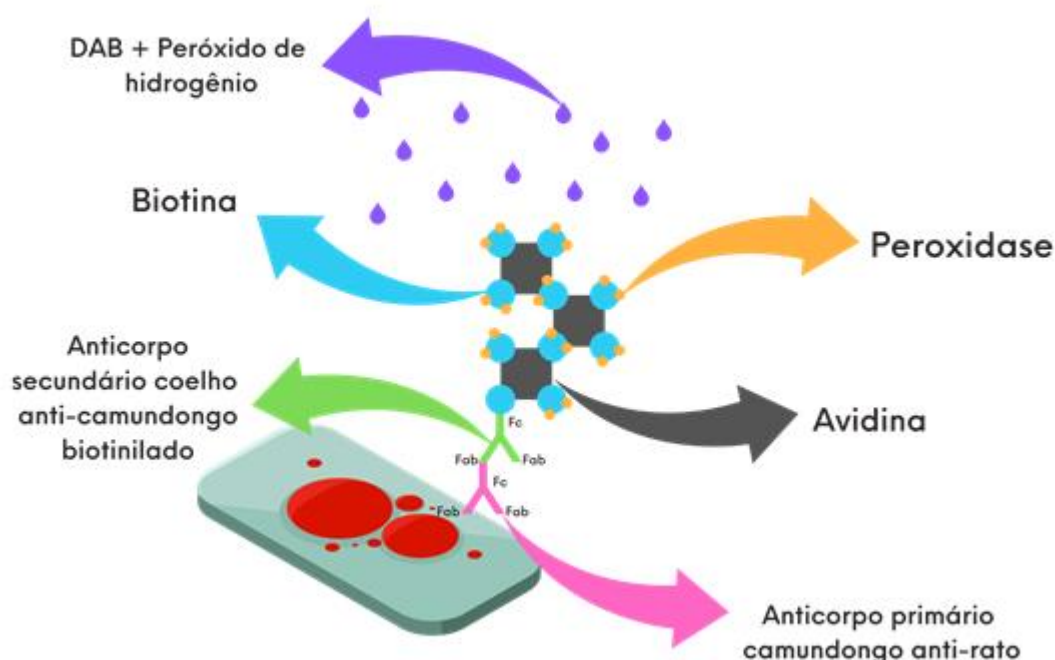


Figura 6 - Representação esquemática da imunoreatividade pelo complexo ABC. As lavagens e o tratamento com o peróxido de hidrogênio removem dos cortes as impurezas e as peroxidases presentes no sangue, evitando que a imunocoloração pelo DAB se ligue às peroxidases erradas, marcando assim, estruturas indesejadas. A lavagem com o leite confere proteínas neutras ao tecido evitando ligações inespecíficas dos anticorpos. O anticorpo primário (AC1), que se ligou às proteínas celulares, tem sua porção fc ligada à porção fab do anticorpo secundário biotinilado (AC2). A avidina, por sua vez, possui quatro sítios de ligação para a biotina, às quais foram incorporadas enzimas especiais chamadas peroxidases. Dessa maneira, as avidinas do complexo AB se ligam a biotina do anticorpo secundário formando uma torre de sinalização AC1 > AC2 > biotina > avidina > biotina > peroxidase que amplifica o sinal para ligação desta última ao peróxido de hidrogênio/DAB. A reação entre o peróxido de hidrogênio com as peroxidases do complexo AB libera oxigênio fazendo com que o DAB se precipite nos locais onde existe esse complexo, imunocorando essas células de interesse com a cor castanha (Imagem própria).

3.5 Análise de dados

3.5.1 Atividade motora

O registro da atividade locomotora para verificação do padrão de ritmicidade circadiana dos animais se deu mediante sensores de movimentos acoplados a porção superior localizadas no interior das cabines acima de cada gaiola. Para a captação dos dados e controle do tempo e luminosidade das cabines foi utilizado o software SAP - Sistema para Acionamento

Programado. Os dados brutos foram processados pelo software *El Temps* no para elaboração dos actogramas e consequente visualização e análise das expressões circadianas dos animais. Para o cálculo da periodicidade circadiana foram utilizados periodogramas de Sokolove-Bushell.

3.5.2 Processamento e análise da imunohistoquímica

As secções foram analisadas através de microscópio óptico (Motic Série BA310) com lente objetiva de 10x em campo claro. As fotomicrografias foram obtidas através de um sistema de imagem (Moticam) acoplado ao microscópio capturadas a partir do software Motic Images Plus. As imagens foram montadas no Adobe Photoshop CS3.

A medição da contagem celular positiva foi realizada utilizando o software ImageJ (NIH) em três secções coronais, rostral, média e caudal, de cada uma das quatro estruturas cerebrais de todos os 12 animais utilizados nesse estudo. No que concerne às porções de cada estrutura, foram selecionados os Núcleo Amidalóide Lateral (LaDL), Núcleo Amidalóide Basolateral (BL) e Núcleo Amidalóide Basolateral Ventral da amígdala; região 1 do corno de Amon (CA1), região 2 do corno de Amon (CA2), região 3 do corno de Amon (CA3) e Giro Denteado (GD) do hipocampo dorsal e Córtex Cingulado Anterior (CA), Córtex Pré-límbico (PL) e Infralímbico (IL) do Córtex Pré-Frontal Medial (CPFm). Ademais, devido às limitações do próprio marcador, não foi possível realizar a contagem de células nas duas porções individuais do NSQ, desse modo, foram contabilizados os neurônios de toda a estrutura.

As porções de cada estrutura foram delineadas no software Adobe Photoshop CS3 com base no Atlas Citoarquitetônico do Cérebro do Rato de Paxinos & Watson (2013). A contagem de células PV+ foi realizada manualmente com o plugin *Cell counter* do ImageJ. A contagem de neurônios totais NeuN+ ocorreu também de forma manual mediante amostragem por conglomerados, na qual foram selecionadas aleatoriamente quatro subpopulações neuronais de cada uma das sub-regiões do CPFm e hipocampo, tendo sido contabilizados todos os neurônios presentes em uma área de $27.225 \mu\text{m}^2$ delimitadas pela caixa de seleção nativa do ImageJ nas dimensões de $165 \times 165 \mu\text{m}$. Para os cortes do NSQ, contabilizados todos os neurônios presentes em uma área de $9.036 \mu\text{m}^2$ com a caixa de seleção nas dimensões de $30 \times 30 \mu\text{m}$. O contraste automático foi aplicado a todas as imagens de NeuN e o número total de neurônios foi normalizado pela área total analisada.

Foram contabilizadas as estruturas cujo citoplasma se apresentaram visivelmente marcados, considerando-se ainda a forma, intensidade da coloração, projeções axonais e dendríticas e a localização das estruturas.

3.5 Análise estatística dos dados

Histogramas com curva de distribuição, medidas de curtose e assimetria e os testes Kolmogorov-Smirnov e Levene foram utilizados para verificação da normalidade e homoscedasticidade dos dados. Ademais, os dados foram analisados por estatística paramétrica e não-paramétrica a depender dos resultados dos testes supracitados. Em caso de normalidade dos dados, comparações múltiplas utilizando ANOVA de medidas independentes. Os dados foram analisados utilizando o software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), versão 21 e foram considerados significativos os resultados de valor $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Ritmo de atividade locomotora

A análise em grupo do actograma e dos periodogramas, representados a seguir com o Percentual de Variância (PV) médio e o desvio-padrão, respectivamente, demonstrou que o grupo de ratos submetidos ao protocolo experimental T22 durante a lactação (**Figura 7**) apresentou 2 ritmos de expressão de atividade locomotora, sendo um de 1490 min (PV = 9,61) e outro de 1405 min (PV = 7,92). Considerando que o protocolo T22 foi criado e validado em modelos animais adultos e os picos de expressão da atividade locomotora variam entre as diferentes idades, acredita-se que os animais em questão tenham dissociado, ainda que a genitora estivesse presente na gaiola e que ambos os picos de expressão tenham sido superiores a 1320.

Durante a adolescência (PV = $16,76 \pm 3,93$) e vida adulta (PV = $27,12 \pm 4,49$), todos os animais desse grupo apresentaram um único ritmo de atividade de 1440 min. Esses e todos os demais percentuais de variância médio de cada grupo nas diferentes fases da vida estão agrupados e podem ser consultados nos materiais suplementares (**Suplemento 1**).

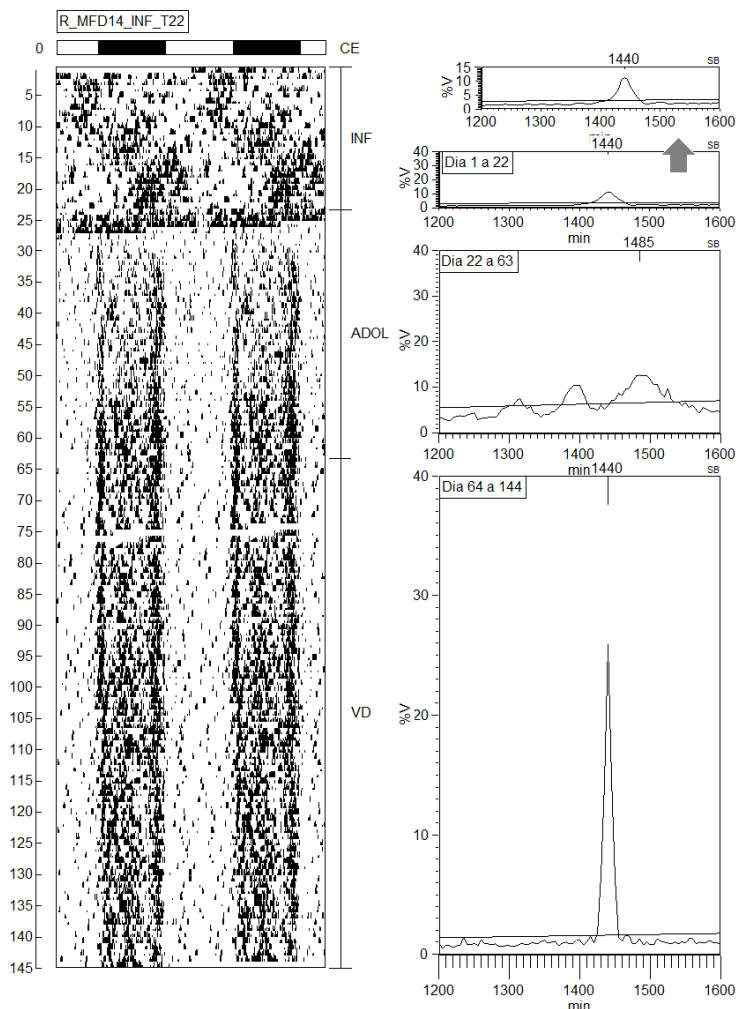


Figura 7 - Actograma e periodogramas de Sokolove-Bushell do experimento completo do grupo dissociado na infância. INF= infância, ADOL= adolescência, VD=Vida adulta. Cada ponto representa os momentos de atividade locomotora no interior da gaiola em um intervalo de 5min. Foi inserido um periodograma extra indicado com seta para facilitar a visualização dos picos de atividade locomotora em uma escala menor do percentual de variância. Os actogramas estão duplamente plotados.

O actograma do grupo experimental dissociado na adolescência (**Figura 8**) apresentou um ritmo único e estável de 1440 min (PV = 26,66). Após submetidos ao protocolo T22, três dos quatro animais dissociaram uma vez que demonstraram dois ritmos de expressão da atividade locomotora, um de 1320 min associado ao T22 (PV = 5,73 $\pm$ 1,25) e outro de 1503 min associado ao livre curso (PV = 5,31 $\pm$ 0,43). Quando submetidos novamente ao CE 24h durante a vida adulta, esses animais voltaram a apresentar um ritmo único e estável de 1440 min (PV = 29,56 $\pm$ 6,69).

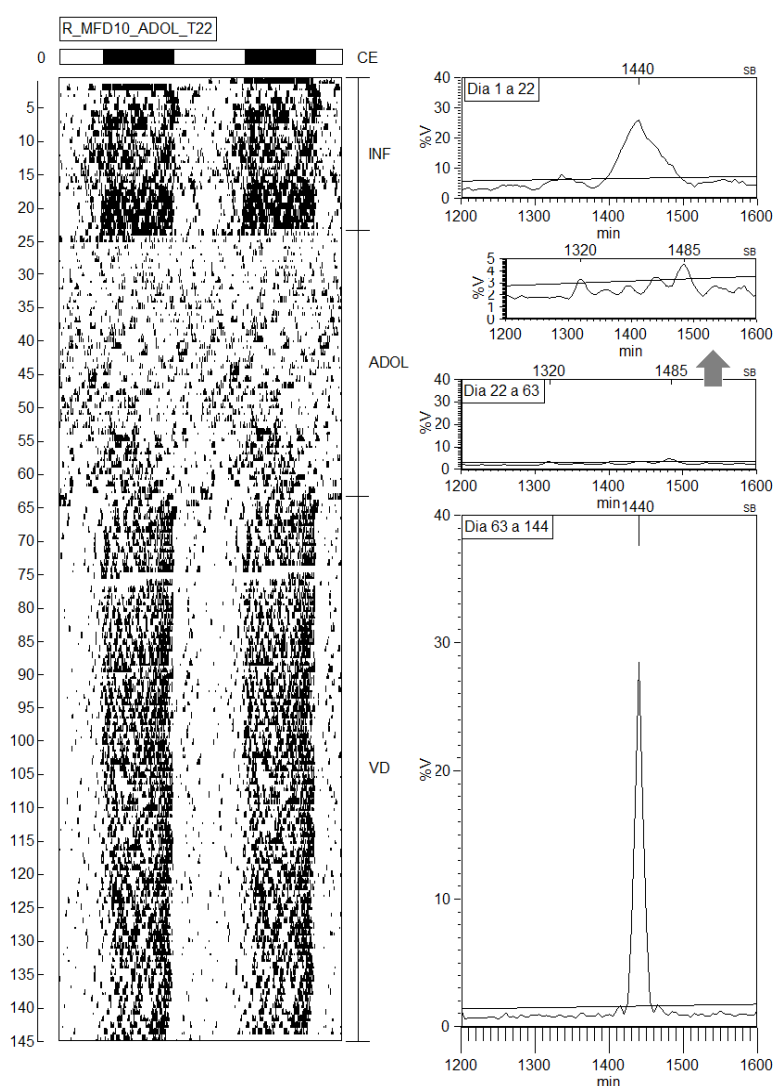


Figura 8 - Actograma e periodogramas de Sokolove-Bushell do experimento completo do grupo dissociado na adolescência. Cada ponto representa os momentos de atividade locomotora no interior da gaiola em um intervalo de 5min. Foram inseridos periodogramas extras, indicados com setas, para facilitar a visualização dos picos de atividade locomotora em uma escala menor do percentual de variância. Os actogramas estão duplamente plotados.

O animal que não dissociou (ver **material suplementar, suplemento 6, RM_D11_ADOL_T22**) apresentou um único ritmo durante a lactação (PV = 26,66), mas durante a adolescência (T22) este animal apresentou três picos de expressão da atividade locomotora, um de 1320 min (PV = 7,00) e outros dois de 1395 min (PV = 5,26) e 1480 min (PV = 5,03), respectivamente. Durante a vida adulta, esse animal tornou a apresentar um ritmo único de 1440 min (PV = 31,28). Todos os demais actogramas e periodogramas individuais de cada grupo nas diferentes fases da vida podem ser consultados nos materiais suplementares.

Todos os animais do grupo controle sincronizaram ao CE 24h, apresentando um ritmo estável de 1440 durante a infância (PV= $27,85 \pm 7,52$), adolescência (PV = $24,16 \pm 4,31$) e vida adulta (PV = $33,25 \pm 6,39$) (**Figura 9**).

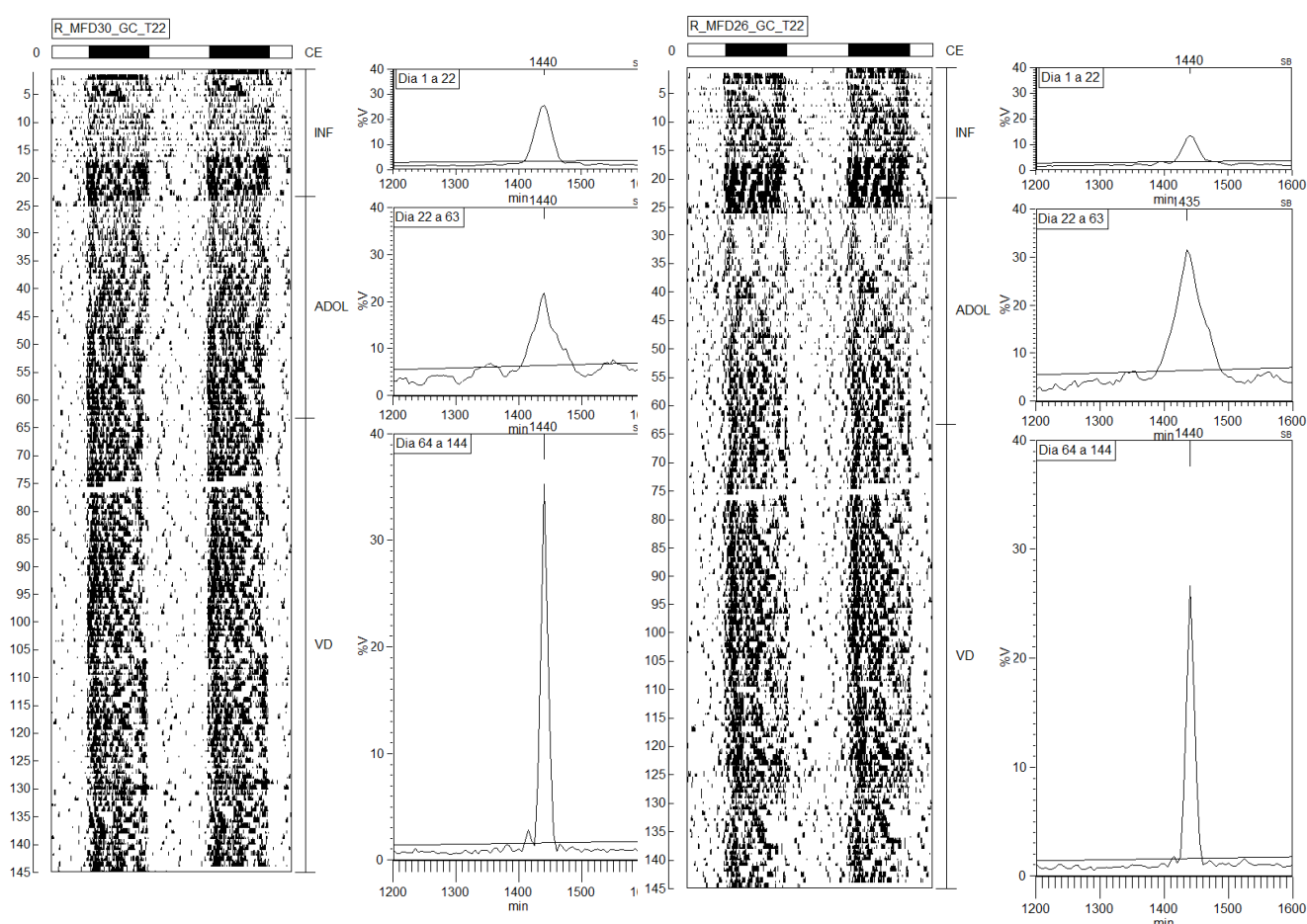


Figura 9 - Actogramas e periodogramas de Sokolove-Bushnell do experimento completo do grupo controle. Cada ponto representa os momentos de atividade locomotora no interior da gaiola em um intervalo de 5min. Duas figuras são apresentadas porque os animais do grupo controle foram divididos em duas cabines. Cada figura representa a atividade de dois animais controle desse estudo. Os actogramas estão duplamente plotados.

A estabilidade do ritmo de atividade locomotora na vida adulta entre os diferentes grupos experimentais ocorreu de maneira gradual conforme o momento da vida em que os animais foram submetidos ao protocolo T22, sendo menor no grupo experimental submetidos à dissociação na infância ($PV = 27,12 \pm 4,49$), aumentando naqueles dissociados na adolescência ($PV = 29,56 \pm 6,69$) e atingindo maior valor para o grupo controle que nunca foi dissociado ($PV = 33,25 \pm 6,39$) (**Material suplementar, Suplemento 1**).

4.2 Efeito da dessincronização circadiana em T22 no número de neurônios reativos para proteína Neu-N

A ANOVA de uma via revelou não existir diferenças na expressão da proteína NeuN nas áreas do córtex pré-frontal medial, hipocampo e NSQ (**Tabela 1**).

Tabela 1 - Diferenças estatísticas entre dos grupos experimentais e controle no número de neurônios reativos a NeuN nas áreas do CPFm e hipocampo, João Pessoa, 2021.

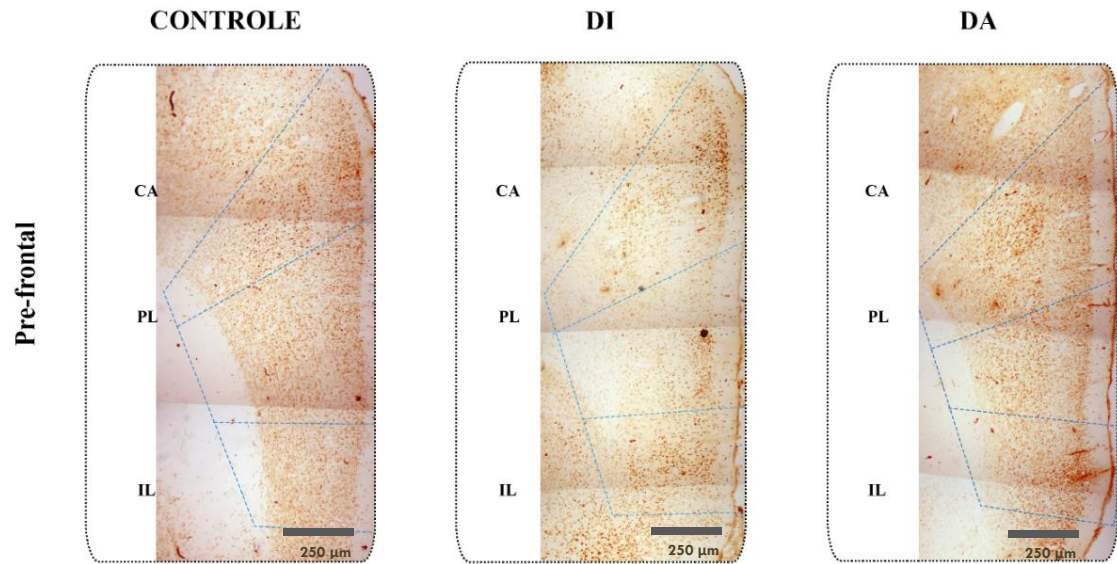
ÁREA	df	F	Valor de P	EFEITO
<i>Córtex Pré-Frontal Medial</i>				
Cingulado anterior	(2,12)	0,757	0,497	0,144
Pré-límbico	(2,12)	1,61	0,252	0,264
Infra-límbico	(2,12)	0,524	0,609	0,104
<i>Hipocampo</i>				
Giro denteado	(2,12)	0,628	0,555	0,123
CA1	(2,12)	1,139	0,362	0,202
CA2	(2,12)	1,594	0,255	0,262
CA3	(2,12)	1,679	0,24	0,272

df = grau de liberdade (do inglês *degree of freedom*), F = estatística F, P = Valor de P e Tamanho do efeito.

Fonte: Elaboração própria

As fotomicrografias e a quantidade média de células que expressam a proteína NeuN nas áreas do CPFm encontram-se dispostos na figura 10, abaixo:

A



B

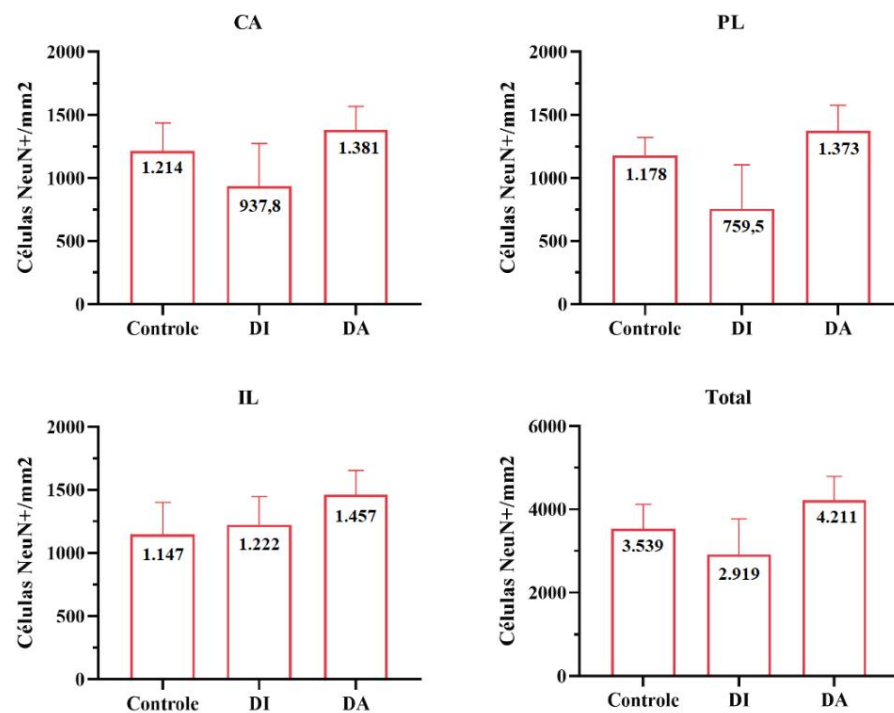
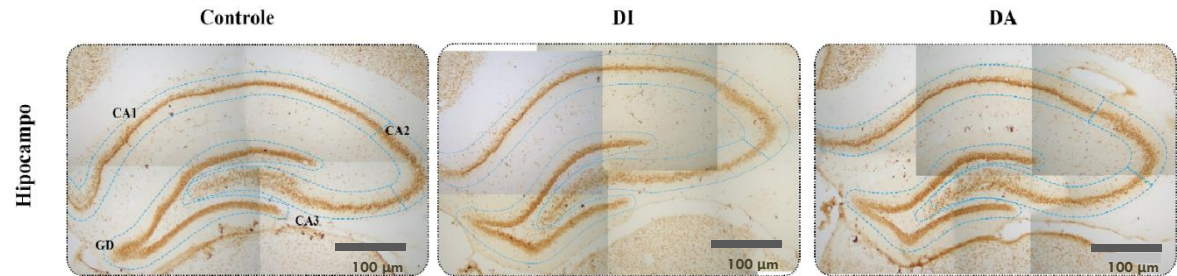


Figura 10 – A) Fotomicrografias do número de neurônios reativos a NeuN no CPFm. Número de neurônios reativos a NeuN nas subáreas do CPFm (córtex cingulado – CA, área pré-límbica – PL, área infra-límbica – IL) e total do córtex pré-frontal de ratos submetidos ao protocolo de dessincronização circadiana T22 na infância e adolescência comparados ao grupo controle. B) Dados dos grupos controle, dessincronizados na infância (DI) e dessincronizados na adolescência (DA) representados como média e erro padrão da média. Barra de escala: 250 μm. N=12.

As fotomicrografias e a quantidade média de células que expressam a proteína NeuN nas áreas do hipocampo encontram-se dispostos na figura 11, abaixo:

A



B

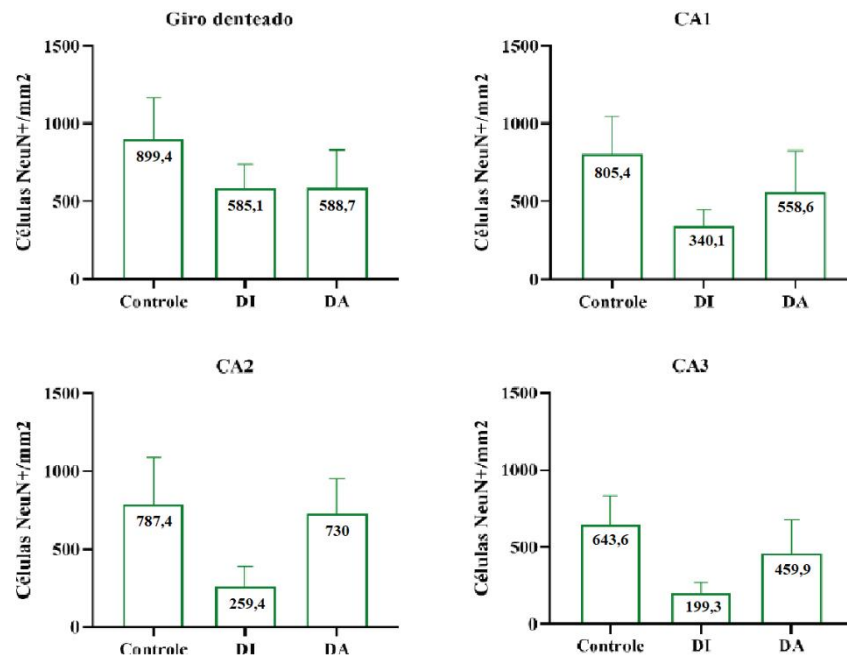


Figura 11 – A) Fotomicrografias do número de neurônios reativos a proteína NeuN no hipocampo. Número de neurônios reativos a proteína NeuN nas subáreas CA1, CA2, CA3 e GD do hipocampo de ratos submetidos ao protocolo de dessincronização circadiana T22 na infância e adolescência comparados ao grupo controle. B) Dados dos grupos controle (GC), dessincronizados na infância (DI) e dessincronizados na adolescência (DA) representados como média e erro padrão da média. Barra de escala: 100µm. N=12.

As fotomicrografias e a quantidade média de células que expressam a proteína NeuN nas áreas do NSQ encontram-se dispostos na figura 12, abaixo:

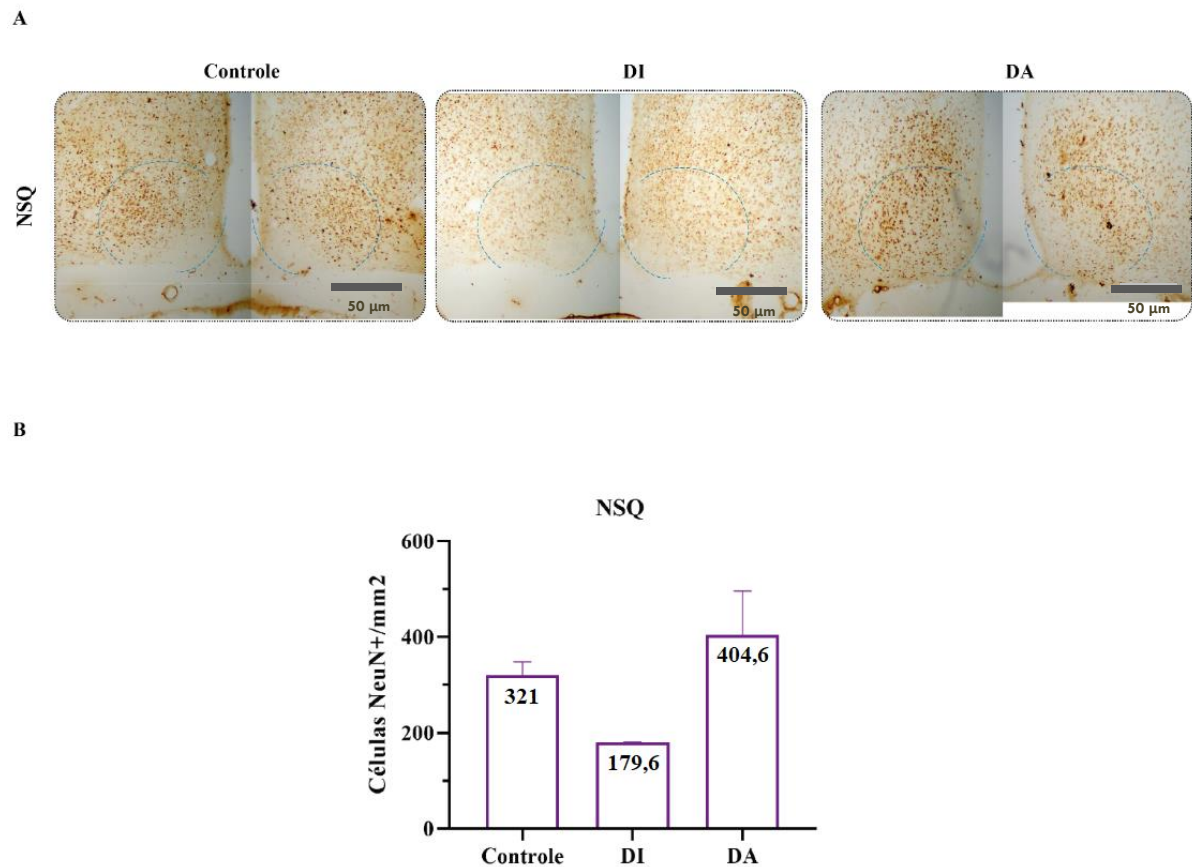


Figura 12 – A) Número de neurônios reativos a proteína NeuN no Núcleo Supraquiasmático de ratos submetidos ao protocolo de dessincronização circadiana T22 na infância e adolescência comparados ao grupo controle. B) Dados dos grupos controle (GC), dessincronizados na infância (DI) e dessincronizados na adolescência (DA) representados como média e erro padrão da média. Barra de escala: 50μm. N=8.

4.3 Efeito da dessincronização circadiana em T22 no número de neurônios Parvalbumina positivos

A ANOVA de uma via revelou não existir diferenças na expressão da proteína parvalbumina nas áreas do córtex pré-frontal medial, hipocampo e amígdala conforme demonstrado na tabela 2.

Tabela 2 - Diferenças estatísticas entre dos grupos experimentais e controle no número de neurônios reativos a PV nas áreas do córtex pré-frontal medial, hipocampo e amígdala, João Pessoa, 2021.

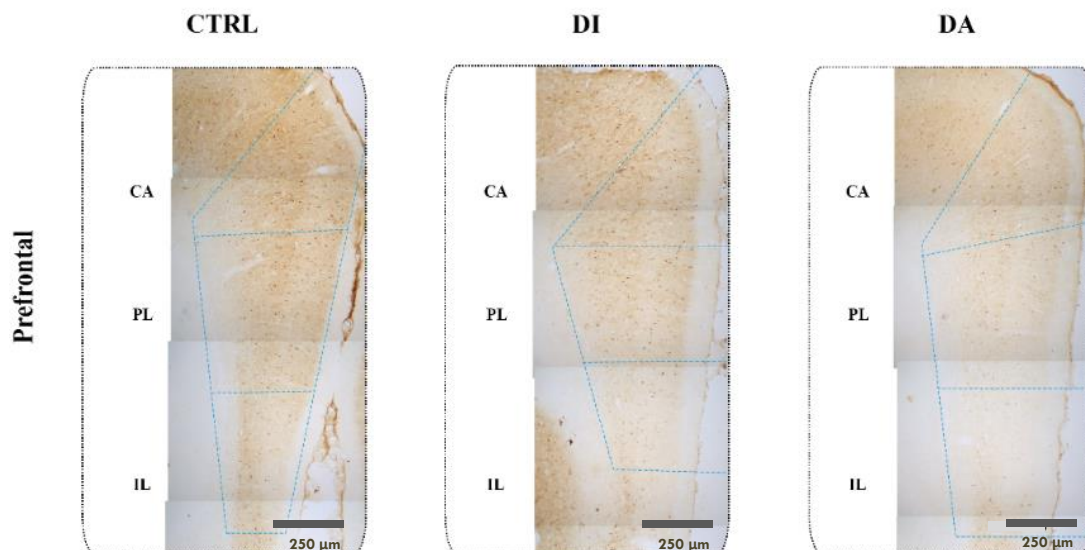
ÁREA	df	F	Valor de P	EFEITO
<i>Córtex Pré-Frontal Medial</i>				
Cingulado anterior	(2,12)	0,793	0,482	0,15
Pré-límbico	(2,12)	0,017	0,983	0,004
Infra-limbico	(2,12)	0,738	0,505	0,141
<i>Hipocampo</i>				
Giro denteado	(2,12)	0,155	0,859	0,033
CA1	(2,12)	1,281	0,324	0,222
CA2	(2,12)	0,359	0,708	0,074
CA3	(2,12)	0,644	0,548	0,033
<i>Amígdala</i>				
LaDL	(2,12)	0,051	0,951	0,011
BL	(2,12)	1,057	0,387	0,19
BLV	(2,12)	0,391	0,687	0,08
Total	(2,12)	1,472	0,28	0,246

df = grau de liberdade (do inglês *defree*), F = estatística F, P = Valor de P e Tamanho do efeito.

Fonte: Elaboração própria

As fotomicrografias e a quantidade média de interneurônios PV+ nas áreas do CPFm encontram-se dispostos na figura 13, abaixo:

A



B

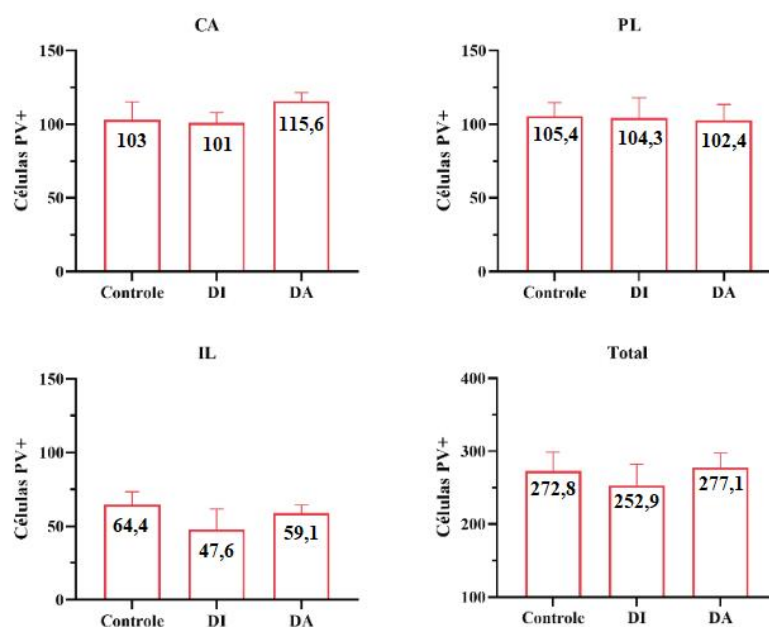
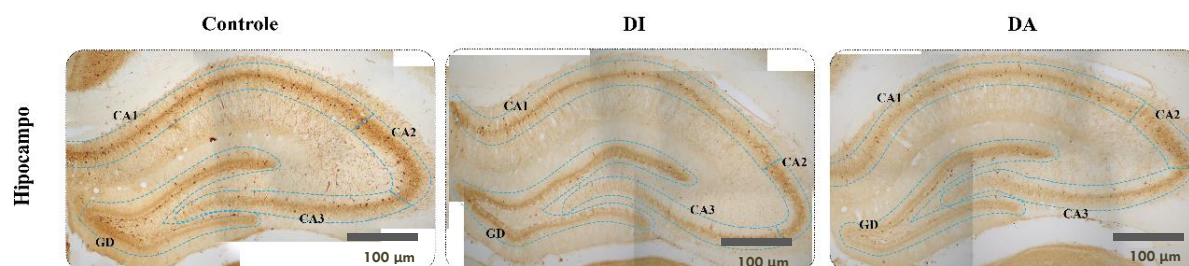


Figura 13 – A) Número de neurônios reativos a Parvalbumina no Córtex Pré-frontal Medial. Número de neurônios reativos a Parvalbumina nas subáreas (córtex cingulado – CA, área pré-limbica – PL, área infra-limbica – IL) e total do córtex pré-frontal de ratos submetidos ao protocolo de dessincronização circadiana T22 na infância e adolescência comparados ao grupo controle. B) Dados dos grupos controle (GC), dessincronizados na infância (DI) e dessincronizados na adolescência (DA) representados como média e erro padrão da média. Barra de escala: 250μm. N=8.

As fotomicrografias e a quantidade média de interneurônios PV+ nas áreas do hipocampo encontram-se dispostos na figura 14, abaixo:

A



B

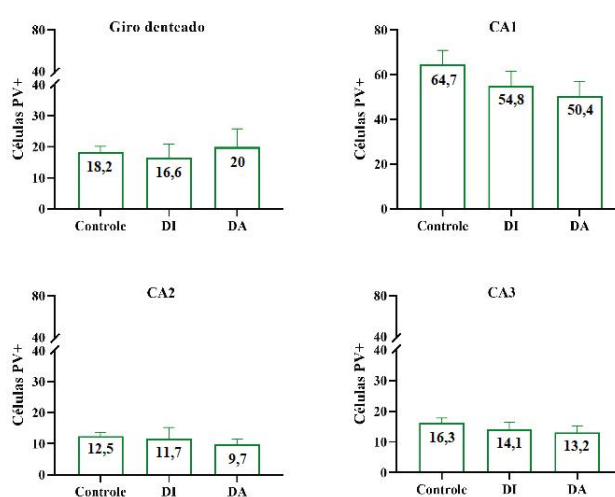


Figura 14 – A) Número de neurônios reativos a Parvalbumina no hipocampo. Número de neurônios reativos a Parvalbumina no Córtex Pré-frontal Medial nas subáreas (giro dentado – GD, região 1 do corno de amon – CA1, região 2 do corno de amon – CA2, região 3 do corno de amon – CA3) e total do hipocampo de ratos submetidos ao protocolo de dessincronização circadiana T22 na infância e adolescência comparados ao grupo controle. B) Dados dos grupos controle (GC), dessincronizados na infância (DI) e dessincronizados na adolescência (DA) representados como média e erro padrão da média. Barra de escala: 100µm. N=12.

As fotomicrografias e a quantidade média de interneurônios PV+ nas áreas do CPFm encontram-se dispostos na figura 15, abaixo:

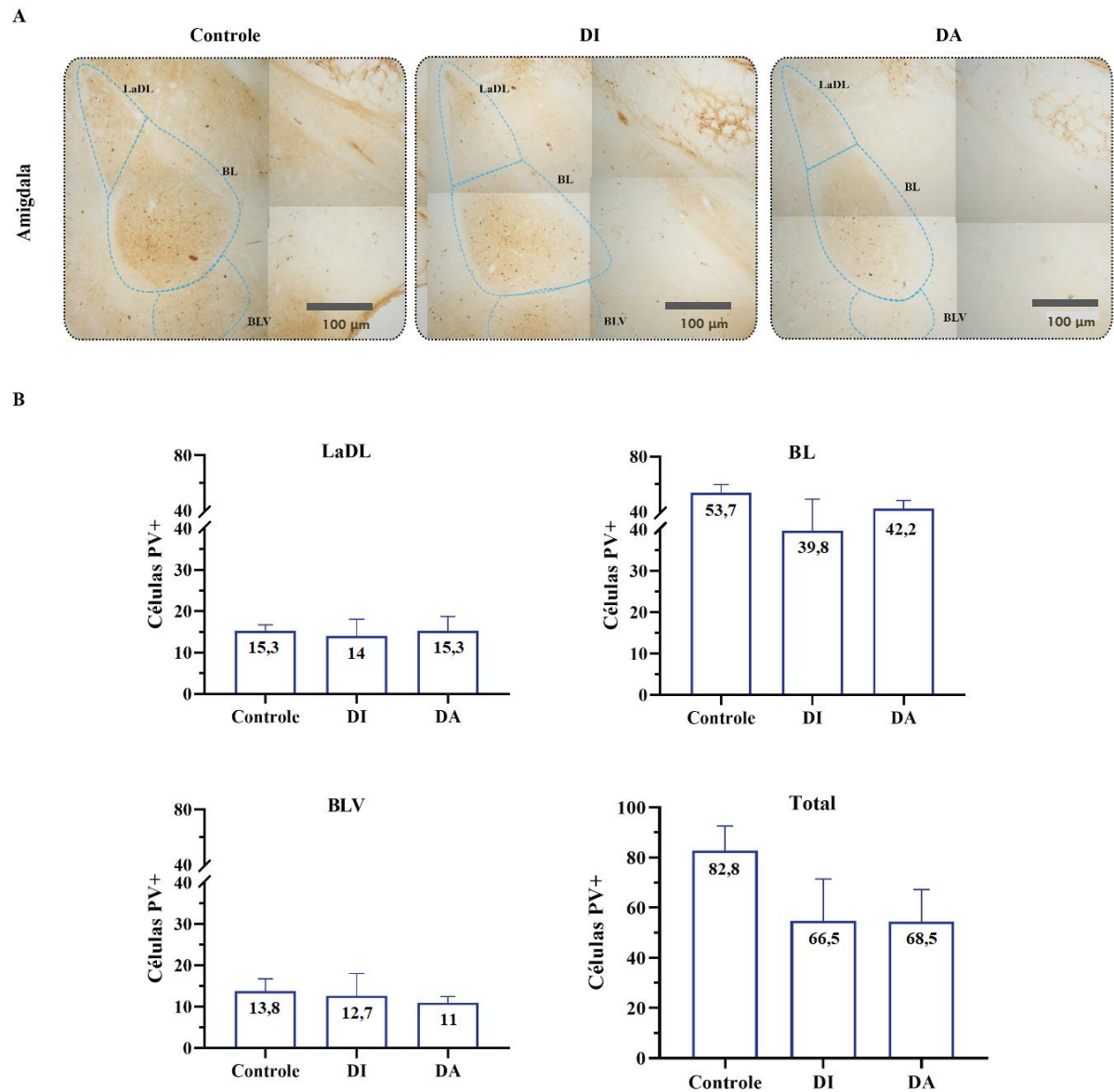


Figura 15 – Número de neurônios reativos a Parvalbumina na amígdala. Número de neurônios reativos a Parvalbumina nas subáreas (Núcleo Amidalóide Lateral - LaDL, Amígdala basolateral - BL, Amígdala Basolateral Ventral- BLV) e total da amígdala de ratos submetidos ao protocolo de dessincronização circadiana T22 na infância e adolescência comparados ao grupo controle. Dados dos grupos controle (GC), dessincronizados na infância (DI) e dessincronizados na adolescência (DA) representados como média e erro padrão da média. Barra de escala: 100 μ m. N=12

5 DISCUSSÃO

A exposição a padrões anormais de luminosidade pode comprometer o funcionamento adequado dos mecanismos internos associados à expressão da ritmicidade circadiana, induzindo a uma dissociação entre os ritmos da atividade locomotora em um mesmo indivíduo, a qual está associada à expressão de genes independentes nas duas sub-regiões anatomicamente identificáveis do núcleo supraquiasmático, marcapasso responsável pela geração do ritmo com frequência de um ciclo a cada 24 horas (Menna-Barreto & Marques, 2003; De La Iglesia, Cambras & Díez-noguera, 2016).

Desse modo, a dissociação dos ritmos circadianos induzida experimentalmente através de protocolos de dessincronização forçada têm se mostrado fundamentais para a compreensão dos mecanismos subjacentes aos efeitos comportamentais e neuroquímicos da dessincronização, uma vez que esta é uma importante assinatura de muitos distúrbios circadianos associados aos transtornos de humor e prejuízos na memória, figurando como um importante modelo para compreensão da base circadiana associada à etiologia dessas doenças, sobretudo quando se considera que essa dessincronização pode produzir consequências diferentes a depender da fase da vida em que esta ocorra (De La Iglesia, Cambras & Díez-noguera, 2016).

Em consonância com os demais achados da literatura, os resultados aqui apresentados atestaram a eficácia do protocolo T22 como modelo experimental válido de dessincronização forçada, dado que este foi capaz de provocar a dissociação dos animais durante as fases da infância e adolescência, caracterizados pela expressão dois ritmos da atividade locomotora (De La Iglesia, Cambras & Díez-noguera, 2016).

Apesar da eficácia do protocolo em promover a dissociação, perdas amostrais também deveriam ser consideradas, podendo chegar a aproximadamente 20% da amostra, como relatado em alguns trabalhos (Ben-Hamo *et al.*, 2016). Considerando que um dos animais do estudo não dissociou, acredita-se que a perda desse animal em questão tenha ocorrido devido as interrupções do fotoperíodo decorrente das quedas de energia transcorridas durante a realização do experimento, algumas delas com duração superior a 5h, o que pode ter afetado os padrões correntes de expressão rítmica desses animais, fazendo com que o desacoplamento de ambas as porções de osciladores neuronais do NSQ tenham se desestabilizado, agrupando-se em três diferentes picos de expressão rítmica, sendo o segundo mais estável inferior ao período de 24h (Ben-Hamo *et al.*, 2016; Varcoe *et al.*, 2013; Logan & Mcclun, 2019; Campuzano *et al.*, 199; De La Iglesia *et al.*, 2004).

Ademais, os dados do presente estudo indicam que a estabilidade do ritmo na vida adulta foi aumentando gradualmente conforme o momento da vida em que ocorreu a dissociação, sendo menor no grupo dissociado na infância, aumentando no grupo da adolescência e atingindo seu ápice no grupo que nunca foi dissociado. Esse achado confirma a hipótese inicial de que a dissociação na infância e adolescência compromete de forma diferente a estabilidade do ritmo na vida adulta. Isso parece indicar que as consequências para o padrão rítmico de atividade locomotora na vida adulta dos animais submetidos à dissociação forçada em duas idades na vida pós-natal são mais prejudiciais quando este fenômeno ocorre nas fases iniciais da vida, havendo menor comprometimento quando este ocorre em fases posteriores.

Nesse sentido, um estudo que examinou os efeitos da exposição crônica a corticosterona (CORT) em animais adolescentes e adultos, também identificou que existem diferenças marcantes nos efeitos dessa exposição a depender da fase da vida em que esta ocorreu. Por exemplo, os animais adultos tratados com CORT exibiram diminuição da preferência pela sacarose, aumento dos níveis de ansiedade e prejuízo cognitivo, enquanto os animais adolescentes tratados com CORT demonstraram aumento da preferência pela sacarose, diminuição dos níveis de ansiedade e aumento das funções de bloqueio sensoriomotor (Li *et al.*, 2017).

Achados como esse reforçam a ideia de que a adolescência é um período crítico com processos de maturação contínuos em sistemas sensíveis ao estresse e que os ratos adolescentes parecem apresentar boa capacidade adaptativa para os modelos experimentais que geram estresse crônico, uma vez que alguns estudos não encontraram prejuízos cognitivos, comportamentais e emocionais em testes de campo aberto, esquiva passiva, labirinto em cruz elevada, entre outros (Juraska & Willing, 2017; McCormick, Smith & Mathews, 2008; Pereira, 2017).

Importante ressaltar que é durante a fase da adolescência que ocorre a maturação das funções comportamentais do córtex pré-frontal, envolvido na tomada de decisão, controle inibitório, memória de trabalho, atenção, entre outros (Juraska & Willing, 2017). Essas funções executivas e algumas funções comportamentais relacionadas dependem das interações do córtex pré-frontal com outras partes do sistema límbico, tais como o CA1 e outras sub-regiões do hipocampo, além da amígdala basolateral, podendo afetar a reestruturação e a modulação hormonal do comportamento, além de induzir a prejuízos de plasticidade sináptica no mPFC (Juraska & Willing, 2017; Lopes-Aguiar *et al.*, 2012).

Em conjunto, todos esses resultados, incluindo o deste estudo, parecem indicar que os ratos dissociados na adolescência, por encontrarem-se em pleno estágio de desenvolvimento, possuem uma alta capacidade plástica que os torna capazes de se adaptar a mudanças ocorridas

nessa fase da vida, flexibilidade essa que parece não ocorrer durante a infância e vida adulta de ratos submetidos a protocolos experimentais de estresse crônico como o T22 (Neto *et al.*, 2008; Ben-Hamo *et al.*, 2016).

Além dos prejuízos rítmicos e comportamentais anteriormente descritos, estudos demonstraram que o protocolo T22 também está associado a comprometimentos cardiometabólicos e neuroquímicos. Os ratos do estudo de Oliveira *et al* (2019) exibiram dessincronização na atividade locomotora após 8 semanas da exposição ao T22 e esses animais apresentaram dislipidemia, hipertrofia significativa da zona fasciculada da glândula adrenal, redução na produção de enzimas antioxidantes como SOD e CAT e aumento da expressão de fosfoenolpiruvato carboxiquinase no fígado, enzima essencial envolvida na gliconeogênese e homeostase da glicose (Oliveira *et al.*, 2019). Outro estudo demonstrou que animais dissociados apresentaram ganho de peso acelerado, obesidade, perda de comprimento dendrítico e diminuição da complexidade dos neurônios no PL do CPFm, envolvido na função executiva e controle emocional (Karatsoreos *et al*, 2011).

Os achados neuroquímicos associados T22 ficam por conta do estudo da Ben-Hamo *et al.* (2016), um dos únicos a investigar os aspectos neuroquímicos da dessincronização. Seu estudo identificou, além dos prejuízos comportamentais associados ao T22, incluindo anedonia, disfunção sexual e aumento da imobilidade no TNF, alterações nos níveis e taxas de renovação de monoaminas no córtex pré-frontal dos ratos dissociados (Ben-Hamo *et al*, 2016).

No que tange aos aspectos neuroquímicos destaca-se o papel dos núcleos neuronais, que figuram entre as mais conhecidas técnicas utilizadas para marcação de neurônios pós-mitóticos, células altamente conservadas entre as diferentes espécies. Tais neurônios contêm uma série de proteínas específicas cujo aparecimento dessas células pós-mitóticas são indicativos de sua diferenciação neuronal (Wang *et al.*, 2015; Gusel’Nikova & Korzhevskiy, 2015). Algumas dessas proteínas são características de apenas alguns tipos específicos de neurônios. Uma delas é a proteína NeuN, localizada nos núcleos e citoplasma perinuclear da maioria dos neurônios do sistema nervoso central dos mamíferos. Essa proteína é frequentemente utilizada como marcador de neurônios pós-mitóticos devido, justamente, à sua propriedade de localização nuclear. Há mais de 20 anos que os anticorpos monoclonais para a proteína NeuN vem sendo ativamente utilizados em pesquisas imunohistoquímicas para contagem e diferenciação neuronal em estados normais e patológicos (Wang *et al.*, 2015; Gusel’Nikova & Korzhevskiy, 2015).

Para além, desse motivo, a marcação por NeuN foi utilizada nesse estudo por ser um marcador confiável de neurônios adultos e pelo seu papel como regulador transcricional que influencia na maturação em diferentes circuitos, sendo, portanto, uma alternativa promissora

para estudos que como esse, pretendem avaliar a manifestação de fenômenos ocorridos em diferentes estágios do neurodesenvolvimento (Yu *et al.*, 2013/ Duan *et al.*, 2016).

Nesse sentido, buscamos investigar se a dissociação circadiana em momento precoce era capaz de provocar efeitos de longo prazo no número total de neurônios em áreas do circuito córtico-límbico, incluindo hipocampo dorsal, NSQ, amígdala e o CPFm.

Apesar de não termos encontrado diferenças estatísticas no número de células que expressam NeuN nas áreas estudadas, possivelmente devido ao reduzido número amostral, sugestões numéricas foram observadas em algumas estruturas e regiões.

No caso do hipocampo, por exemplo, o número de neurônios reativos à proteína NeuN parecer aumentar de maneira gradual conforme o momento da vida em que os animais foram submetidos ao protocolo T22. Tal como ocorrido com o percentual de variância do ritmo de atividade locomotora, a expressão de NeuN pareceu ser menor no grupo experimental dissociado na infância, aumentando no grupo dissociado na adolescência e atingindo maior valor no grupo controle, que nunca foi dissociado. Esse mesmo fenômeno, contudo, não foi observado no CPFm e NSQ, no qual o número de células reativas a NeuN foi numericamente menor no grupo controle que no grupo dissociado na adolescência.

Uma das possíveis explicações para isso se deve ao fato de que o protocolo pode ter provocado alterações nos processos naturais de apoptose no CPFm. No que tange a expressão normal de NeuN no CPFm durante o neurodesenvolvimento de roedores, estudo demonstrou que entre a infância, adolescência e a idade adulta, ocorre uma perda natural e esperada de neurônios no CPFm ventral, que não ocorre no CPFm dorsal, sinalizando uma onda tardia de apoptose específica dessa região que pode produzir uma susceptibilidade adicional a fatores ambientais para essa área (Markham, Morris, & Juraska, 2007).

Considerando que a intervenção do presente estudo foi realizada nesse período crítico de maturação, acredita-se que a dessincronização possa ter atrasado ainda mais essa onda tardia de apoptose no CPFm, acarretando em uma manutenção elevada no número de células NeuN+ nessa região. Esse número elevado de células pode comprometer os mecanismos de plasticidade e interconectividade sináptica, uma vez que essas células ainda não possuem maturidade funcional.

Um exemplo disso é o estudo de Majcher-Maślanka *et al.*, (2019) que avaliou os efeitos neuroquímicos de um protocolo de exposição precoce a agentes estressores também no CPFm de ratos. O protocolo utilizado foi o de separação materna e os ratos submetidos a ele apresentaram redução pró-apoptose e aumento da sinalização pró-sobrevivência no PL do CPFm em adolescentes. Isso significa que as células do córtex pré-límbico que deveriam morrer, não morreram, acarretando em um aumento no número de neurônios, astrócitos e NG2-

glia nessa região, semelhante aos resultados encontrados no presente estudo (Majcher-Maślanka *et al.*, 2019).

Uma outra possibilidade é a de que o córtex pré-frontal não estava totalmente formado no período em que ocorria a dissociação na fase da adolescência. Desse modo, a alta capacidade plástica do cérebro adolescente associada a um protocolo de dissociação ocorrido nessa fase pode ter contribuído para mecanismos compensatórios durante a maturação do fenótipo neuroquímico como forma de proteção das condições de estresse crônico ocorridas nessa fase.

A exemplo disto, um estudo anterior identificou que o estresse provoca uma condição neuroinflamatória que afeta a ativação de células gliais que induz a atrofia dos dendritos apicais do hipocampo, perda de sinapses e morte neuronal (Orellana *et al.*, 2015). Esses prejuízos na plasticidade e sobrevivência neuronal demonstram que o estresse afeta áreas do cérebro envolvidas no aprendizado e nas respostas emocionais. Nesse sentido, a liberação de fatores neuroinflamatórios sob intervenções estressoras durante a ontogênese pode participar da patogênese de transtornos psiquiátricos associados ao estresse, como os transtornos de humor (Orellana *et al.*, 2015).

Além disso, outros estudos identificaram que os núcleos das células cerebrais de camundongos com altos níveis expressos de NeuN/FOX3 possuíam cromatina descondensada em relação à maioria dos núcleos com baixa ou nenhuma expressão de NeuN. A cromatina descondensada é uma característica marcante de células multipotentes com núcleos aumentados, associadas a atividades epigenéticas e transcricionais elevadas, responsáveis por preparar essas células para entrar no ciclo celular ou se diferenciar. Esta propriedade é conhecida como “plasticidade da cromatina das células pluripotentes” (Melcer & Meshorer, 2010; Yu *et al.*, 2013).

No que tange ao presente estudo, a opção pela marcação de NeuN em estruturas envolvidas no sistema límbico, memória e funções executivas, ocorreu devido ao achado de que células gliais e neuronais pós-mitóticas adultas altamente ramificadas podem produzir certas classes de células progenitoras, contribuindo para a neurogênese e neuroplasticidade (Encinas *et al.*, 2011). O córtex, hipocampo, hipotálamo, tálamo e o nucleus accumbens são exemplos de estruturas nas quais foram encontradas células com altos níveis expressos de NeuN descondensados. Estudos demonstraram que a diminuição contínua do número de células-tronco neurais, como consequência de sua divisão, pode contribuir para a diminuição relacionada à idade na neurogênese hipocampal, reforçando a ideia de que a produção de novos neurônios no hipocampo adulto diminui com a idade (Encinas *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2013).

Esse achado, fundamentou a hipótese desse estudo de que a dessincronização circadiana na infância e adolescência poderia prejudicar ainda mais a neurogênese hipocampal na vida

adulta, acarretando em prejuízos para a memória e aumentando a suscetibilidade à comportamentos do tipo ansioso e depressivo. Nesse sentido, apesar de todos os resultados de NeuN encontrados nesse estudo terem revelado a inexistência de diferenças significativas entre os grupos nas diferentes estruturas cerebrais, acredita-se que esse resultado negativo possa ser uma consequência do reduzido número amostral do estudo, visto que alguns achados neuroquímicos estão em consonância com os padrões de ritmicidade locomotora.

Além de tentarmos demonstrar as consequências morfológicas, anatômicas e funcionais manifestadas por alterações no número total de células provocadas pela dissociação nas regiões estudadas. Também o buscamos demonstrar as consequências dessa dissociação na expressão de células do circuito inibitório, especificamente os interneurônios PV+.

Os interneurônios GABAérgicos possuem papel na modulação da atividade neuronal através de mecanismos de inibição que garantem a manutenção do equilíbrio entre as sinapses excitatórias e inibitórias, impedindo excitabilidade excessiva da circuitaria neuronal (Kepecs & Fishell, 2014). Estudos demonstraram que esse desequilíbrio excitatório/inibitório (E/I) está relacionado a prejuízos cognitivos e comportamentais associados à fisiopatologia dos transtornos de humor e déficits de memória, tendo sido observadas reduções na atividade do córtex pré-frontal em quadros de depressão e ansiedade (Page *et al.*, 2019).

Apesar dos mecanismos dessa hipofrontalidade ainda não estarem completamente esclarecidos, sabe-se que os interneurônios inibitórios que expressam parvalbumina (PV +) possuem um papel chave para a manutenção do equilíbrio E/I, por estarem envolvidos na sincronia neuronal rítmica rápida que auxilia no processamento de informações durante tarefas cognitivas (Harkness *et al.*, 2021; Cabungcal *et al.*, 2013). Ademais, trabalhos anteriores de estresse crônico demonstraram que os aumentos induzidos pelo estresse na expressão de PV no pré-frontal se correlacionam com o aumento de comportamentos de ansiedade em camundongos fêmeas (Page *et al.*, 2019). Posto isso, uma vez que alterações no padrão de sono e prejuízos circadianos e mnemônicos são comumente relacionados aos transtornos de humor, o presente estudo optou pela marcação de interneurônios GABAérgicos PV+ em estruturas cerebrais associadas à memória, ritmicidade circadiana e funções executivas.

A parvalbumina pertence a uma família de proteínas denominadas quelantes de cálcio, sendo encontradas em diferentes tipos de interneurônios inibitórios e em alguns neurônios piramidais no neocórtex dos mamíferos. Essa proteína está presente em todo o axônio, soma e dendritos (Hof *et al.*, 1999; Bishop *et al.*, 2012) e apresenta uma função de tamponamento das concentrações de Ca^{2+} que modulam diferentes cascatas de sinalização intracelulares dentro dos neurônios. A ausência desses tampões em subpopulações de neurônios específicos leva a

alterações Ca^{2+} intracelulares, afetando o equilíbrio excitatório-inibitório em neurônios (Hof et al., 1999; Bishop et al., 2012; Schwaller, Meyer & Schiffmann, 2002; Schwaller, 2012).

Para além da sua função no equilíbrio E/I, a parvalbumina, juntamente com a acetilcolinesterase, dopamina, calbindina e calretinina também foram utilizadas em um estudo como método para definição de critérios citoarquitetônicos utilizados na definição de áreas corticais pré-frontais no cérebro de camundongo, incluindo as regiões do pré-frontal medial como os córtices cingulado anterior, pré-límbico, infra-límbico e outras porções do CPF como a dorsal e a ventral (Werd et al., 2010).

Nesse contexto, apesar de não termos encontrado diferenças estatísticas no número de células PV+ nas áreas estudadas, também puderam ser observadas sugestões numéricas em algumas estruturas e regiões. No caso do hipocampo, o número de neurônios reativos à proteína NeuN diminuiu numericamente em algumas regiões de acordo com o momento em que ocorreu a dissociação, possuindo maior número no grupo controle, diminuindo durante a infância e atingindo seu menor número durante a adolescência. Na amígdala, uma sugestão numérica semelhante pôde ser observada apenas quando se considera a qualidade de células da estrutura como um todo.

Em relação a amígdala estudo demonstrou que o desenvolvimento normal dessas células se inicia em PN17, período em que também realizamos nossa intervenção, com interneurônios PV+ inicialmente expressos nas porções basolateral e basolateral ventral. Nesse momento não há expressão de células PV+ na porção lateral. Em P21 ocorre um aumento no número de células PV, mas ainda limitados às porções BL e BLV (Berdel & Morys, 2000). A partir de P30 a expressão de NeuN começa a se aproximar da quantidade que terá na vida adulta, começando a haver expressão de células PV+ na região lateral. Nossos dados mostraram sugestão numérica de diminuição para os grupos experimentais na quantidade total de neurônios da amígdala, sinalizando para um possível prejuízo dessa dissociação no número total de neurônios a longo prazo (Berdel & Morys, 2000).

Quanto ao hipocampo, os neurônios imunorreativos a PV iniciam sua organização ao longo do desenvolvimento no córtex e hipocampo no PN11, que corresponde justamente ao período em que os animais desse estudo foram dessincronizados durante a infância. O trabalho em questão identificou que em PN11, o número de células PV+ se limitavam exclusivamente a áreas mais profundas do córtex, se organizando de forma mais agrupada, demonstrando que essas células não adquiram identidade fenotípica e não migraram para seus locais de destino (Seto-Ohshima et al., 1990). Em P16 a distribuição e número de células é semelhante ao encontrado no animal adulto em P90, contudo, essas células ainda não possuem maturidade funcional e interconectividade (Seto-Ohshima et al., 1990).

Como a intervenção realizada nesse estudo ocorreu durante essa fase de migração, maturação e desenvolvendo celular, isso poderia explicar as sugestões numéricas encontradas em algumas áreas do hipocampo, tal como observado no estudo de Meurer *et al.*, (2021) que identificou que a exposição a fármacos psicotrópicos na adolescência acarretou em prejuízos na memória operacional, reconhecimento de curto prazo, redução de células PV+ no hipocampo, além de manifestações comportamentais do tipo ansioso e depressivo nos teste de campo aberto, preferência por sacarose e TNF (Meurer *et al.*, 2021).

Outro estudo que avaliou a expressão de PV no hipocampo identificou que as proteínas de ligação ao cálcio parvalbumina e calbindina são expressas em populações neuronais que regulam as redes cerebrais envolvidas na navegação espacial, processos de memória e interações sociais (Bjerke *et al.*, 2021). Empregando a análise de imagem semiautomática, os autores identificaram que os neurônios que expressavam parvalbumina eram mais abundantes nas áreas motoras, sensoriais e na maior parte da região hipocampal, enquanto os neurônios de calbindina estão mais presentes em outras áreas do circuito límbico e do hipotálamo. Segundo esse estudo, a formação hipocampal apresentou densidades moderadas de neurônios de parvalbumina. Nas regiões retro-hipocampais, as densidades eram geralmente altas, com o parasubículo mostrando a maior densidade de neurônios de parvalbumina de todas as regiões do cérebro de camundongos (Bjerke *et al.*, 2021).

Tais resultados dialogam com a premissa deste estudo ao demonstrar que o estresse químico durante o desenvolvimento pode provocar mudanças na estrutura e função em circuitos cerebrais associados à cognição e emoção, acarretando em prejuízos comportamentais na idade adulta em humanos e modelos animais (Meurer *et al.*, 2021).

Considerando todo o exposto, a utilização conjunta dos marcadores neuronais de expressão da proteína NeuN e interneurônios parvalbumina positivos em áreas associadas à memória, funções executivas, ritmicidade circadiana e memória aversiva, também se baseou no achado de que o NeuN é necessário para o equilíbrio e função do circuito hipocampal, uma vez que este foi identificado como RBFOX3, um regulador de *splicing* alternativo pré-RNA. Isso acontece porque o NeuN é uma proteína nuclear específica do neurônio que é identificada por imunorreatividade com um anticorpo monoclonal, anti-NeuN, contudo, a identidade de seu antígeno era desconhecida (Kim, Adelstein & Kawamoto, 2009). Hoje se sabe que essa proteína de núcleo neuronal é produto do gene Fox-3. O Rbfox1, Rbfox2 e Rbfox3 são codificados por genes da família RBFOX de proteínas de ligação do RNA. Isso significa que o NeuN/RBFOX3, promove a diferenciação neuronal através do *splicing* alternativo do pré-mRNA Numb durante o desenvolvimento do cérebro (Wang *et al.*, 2015).

Estudo com camundongos knockout para *Rbfox3* demonstrou que a deleção de *Rbfox3* causa redução do peso do cérebro, expressão prejudicada do neurofilamento e diminuição do volume da substância branca, além de aumentar a suscetibilidade a convulsões, prejudicar os comportamentos relacionados à ansiedade (Wang *et al.*, 2015). Ademais, se identificou que o RBFOX3 modula a expressão do *Arc*, gene imediato relacionado a plasticidade, assim como do gene regulador da transcrição *Egr4*, além de regular a neurotransmissão de entradas de células granulares do giro denteado. Nesse contexto, um dos achados mais importantes pelos autores apontou para o fato de que a deleção de RBFOX3 pareceu aumentar a densidade da coluna dendrítica e a complexidade das células granulares no giro denteado, contribuindo para um aumento da conectividade no cérebro (Wang *et al.*, 2015).

Assim, uma vez que NeuN possui um papel regulador de mecanismos de plasticidade ao longo do desenvolvimento e é expresso em diferentes neurônios no SNC do cérebro adulto, buscamos avaliar as consequências da dessincronização forçada sobre o equilíbrio E/I, avaliando os circuitos neurais de maneira mais genérica através de NeuN e, de maneira mais específica, usando o marcador parvalbumina para interneurônios comumente GABAérgicos, como forma de entender possíveis mecanismos relacionados às alterações cognitivas e emocionais desencadeadas pelas alterações na ritmicidade circadiana já observadas na literatura.

No entanto, apesar dos resultados do presente estudo terem apontado para a inexistência de diferenças significativas entre os grupos em todas as estruturas avaliadas com ambos os marcadores. De fato, acreditamos que esse resultado negativo seja decorrente da limitação do número amostral utilizado no trabalho. Assim, mais estudos são necessários para avaliar com precisão os efeitos neuroquímicos da dessincronização forçada pelo protocolo T22 sobre a expressão células NeuN+ e PV+ em áreas do circuito córtico-límbico.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo demonstrou que o protocolo T22 se mostrou eficaz para promover a dissociação do ritmo da atividade locomotora de animais dessincronizados em duas idades pós-natal. Os ratos dissociados tiveram dois ritmos de expressão da atividade locomotora, um associado ao T22 e outro associado ao CE 24h com um padrão rítmico de livre curso. Todos os animais dissociados ressinchronizaram ao CE 24h apresentando um único e estável pico associado ao CE 24h.

Ademais, a estabilidade do ritmo na vida adulta foi aumentando gradualmente conforme o momento da vida em que ocorreu a dissociação, sendo menor no grupo dissociado na infância, aumentando no grupo da adolescência e atingindo seu ápice no grupo que nunca foi dissociado, indicando que as consequências da dissociação forçada na vida adulta de ratos podem ser mais prejudiciais quando ocorrida durante a infância, havendo menor comprometimento quando esta ocorre durante a adolescência.

Apesar dos resultados imunohistoquímicos terem relevado não existir diferenças na expressão da proteína NeuN nas áreas do hipocampo, córtex pré-frontal medial e núcleo supraquiasmático, a literatura aponta que proteína NeuN está tem importância fundamental nos processos de neurogênese, neuroplasticidade, aprendizagem e memória (Melcer & Meshorer, 2010; Yu *et al.*, 2013; Encinas *et al.*, 2011). Desse modo, a expressão dessa proteína permanece em aberto como uma alternativa viável para determinação dos efeitos da dissociação na plasticidade sináptica ao longo da ontogênese, tal como de possíveis prejuízos para a memória e aumento da suscetibilidade à comportamentos do tipo ansioso e depressivo.

O presente estudo também mostrou não existir diferenças na expressão da proteína parvalbumina no hipocampo, córtex pré-frontal medial e amígdala dos animais, contudo, a análise dos interneurônios GABAérgicos PV+ parece promissora em estudos sobre dissociação circadiana que incluem NeuN, uma vez que a ação inibitória desses neurônios são fundamentais para a manutenção do equilíbrio E/I, que pode ser comprometido devido ao sinapses excitatórias no cérebro pelo aumento do número de células RBFOX3/ NeuN decorrentes da dissociação.

O presente estudo trouxe contribuições iniciais acerca dos efeitos rítmicos e neuroquímicos na vida adulta de ratos dissociados em duas idades pós-natal. Também foi apontada a necessidade da realização de novos estudos sobre a expressão de NeuN e PV e outros marcadores neuroquímicos em áreas do cérebro relacionadas a memória, funções executivas, ritmicidade circadiana e memória aversiva, a fim de se elucidar os efeitos na memória e nos transtornos de humor da dissociação ocorrida em diferentes fases da ontogênese.

7 REFERÊNCIAS

- Albuquerque, T.C.O. (2014). Regulação dos genes circadianos Per1 e Per2 pelo estradiol em células epiteliais do Plexo Coróide. Dissertação de mestrado, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Disponível em: <https://ubibliorum.ubi.pt/handle/10400.6/5695>.
- Alves, R. (2017). O Sistema Circadiano. Relatório de estágio e monografia, Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. Disponível em: <https://estudogeral.uc.pt/handle/10316/83686>.
- Ansari, N., Agathagelidis, M., Lee, C., Korf, H.-W., & von Gall, C. (2009). Differential maturation of circadian rhythms in clock gene proteins in the suprachiasmatic nucleus and the pars tuberalis during mouse ontogeny. *European Journal of Neuroscience*, 29(3), 477–489. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06605.x>
- Araújo, K.K.B.C. Memória e ritmicidade circadiana em ratos adolescentes submetidos a um protocolo de dessincronização forçada- modelo T22. Dissertação de mestrado, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa. Disponível em: https://repositorio.ufpb.br/jspui/handle/123456789/12007?locale=pt_BR.
- Aschoff, J. (1960). Exogenous and Endogenous Components in Circadian Rhythms. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 25(0), 11–28. <https://doi.org/10.1101/sqb.1960.025.01.004>
- Ben-Hamo, M., Larson, T. A., Duge, L. S., Sikkema, C., Wilkinson, C. W., de la Iglesia, H. O., & González, M. M. C. (2016). Circadian Forced Desynchrony of the Master Clock Leads to Phenotypic Manifestation of Depression in Rats. *Eneuro*, 3(6), ENEURO.0237-16.2016. <https://doi.org/10.1523/eneuro.0237-16.2016>
- Berdel, B., & Morys, J. (2000). Expression of calbindin-D28k and parvalbumin during development of rat's basolateral amygdaloid complex. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 18(6), 501–513. [https://doi.org/10.1016/s0736-5748\(00\)00024-1](https://doi.org/10.1016/s0736-5748(00)00024-1)
- Bernard, S., Gonze, D., Čajavec, B., Herzel, H., & Kramer, A. (2007). Synchronization-Induced Rhythmicity of Circadian Oscillators in the Suprachiasmatic Nucleus. *PLoS Computational Biology*, 3(4), e68. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0030068>
- Bischof, D. P., Orduz, D., Lambot, L., Schiffmann, S. N., & Gall, D. (2012). Control of Neuronal Excitability by Calcium Binding Proteins: A New Mathematical Model for Striatal Fast-Spiking Interneurons. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 5. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2012.00078>
- Bjerke, I. E., Yates, S. C., Laja, A., Witter, M. P., Puchades, M. A., Bjaalie, J. G., & Leergaard, T. B. (2021). Densities and numbers of calbindin and parvalbumin positive neurons across the rat and mouse brain. *IScience*, 24(1), 101906. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101906>

- Cabungcal, J.-H. ., Steullet, P., Morishita, H., Kraftsik, R., Cuenod, M., Hensch, T. K., & Do, K. Q. (2013). Perineuronal nets protect fast-spiking interneurons against oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(22), 9130–9135. <https://doi.org/10.1073/pnas.1300454110>
- Cambras, T., Canal, M. M., Torres, A., Vilaplana, J., & Díez-Noguera, A. (1997). Manifestation of circadian rhythm under constant light depends on lighting conditions during lactation. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 272(4), R1039–R1046. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1997.272.4.r1039>
- Casiraghi, L. P., Alzamendi, A., Giovambattista, A., Chiesa, J. J., & Golombek, D. A. (2016). Effects of chronic forced circadian desynchronization on body weight and metabolism in male mice. *Physiological Reports*, 4(8), e12743. <https://doi.org/10.14814/phy2.12743>
- Cissé, Y. M., Russart, K. L. G., & Nelson, R. J. (2017). Depressive-like behavior is elevated among offspring of parents exposed to dim light at night prior to mating. *Psychoneuroendocrinology*, 83, 182–186. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2017.06.004>
- Cissé, Y. M., Russart, K. L. G., & Nelson, R. J. (2017). Parental Exposure to Dim Light at Night Prior to Mating Alters Offspring Adaptive Immunity. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/srep45497>
- 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>
- De La Iglesia, H. O., Cambras, T., & Díez-Noguera, A. (2008). Circadian internal desynchronization: Lessons from a rat. *Sleep and Biological Rhythms*, 6(2), 76–83. <https://doi.org/10.1111/j.1479-8425.2008.00346.x>
- Duan, W., Zhang, Y.-P., Hou, Z., Huang, C., Zhu, H., Zhang, C.-Q., & Yin, Q. (2015). Novel Insights into NeuN: from Neuronal Marker to Splicing Regulator. *Molecular Neurobiology*, 53(3), 1637–1647. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9122-5>
- Duong, H. A., Robles, M. S., Knutti, D., & Weitz, C. J. (2011). A Molecular Mechanism for Circadian Clock Negative Feedback. *Science*, 332(6036), 1436–1439. <https://doi.org/10.1126/science.1196766>
- Encinas, Juan M., Michurina, Tatyana V., Peunova, N., Park, J.-H., Tordo, J., Peterson, Daniel A., ... Enikolopov, G. (2011). Division-Coupled Astrocytic Differentiation and Age-Related Depletion of Neural Stem Cells in the Adult Hippocampus. *Cell Stem Cell*, 8(5), 566–579. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.03.010>
- Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T., Alborn, A.-M., Nordborg, C., Peterson, D. A., & Gage, F. H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature Medicine*, 4(11), 1313–1317. <https://doi.org/10.1038/3305>
- Golombek, D. A., Casiraghi, L. P., Agostino, P. V., Paladino, N., Duhart, J. M., Plano, S. A., & Chiesa, J. J. (2013). The times they're a-changing: Effects of circadian

desynchronization on physiology and disease. *Journal of Physiology-Paris*, 107(4), 310–322. <https://doi.org/10.1016/j.jphysparis.2013.03.007>

- Grinevich, V., Desarménien, M. G., Chini, B., Tauber, M., & Muscatelli, F. (2015). Ontogenesis of oxytocin pathways in the mammalian brain: late maturation and psychosocial disorders. *Frontiers in Neuroanatomy*, 8. <https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00164>
- Gusel'nikova, V. V., & Korzhevskiy, D. E. (2015). NeuN As a Neuronal Nuclear Antigen and Neuron Differentiation Marker. *Acta Naturae*, 7(2), 42–47. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4463411/>
- Hafner, M., Koeppel, 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>
- Hamidullah, S., Thorpe, H. H. A., Frie, J. A., Mccurdy, R. D., & Khokhar, J. Y. (2020). Adolescent Substance Use and the Brain: Behavioral, Cognitive and Neuroimaging Correlates. *Frontiers in Human Neuroscience*, 14. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2020.00298>
- Harkness, J. H., Gonzalez, A. E., Bushana, P. N., Jorgensen, E. T., Hegarty, D. M., Di Nardo, A. A., ... Sorg, B. A. (2021). Diurnal changes in perineuronal nets and parvalbumin neurons in the rat medial prefrontal cortex. *Brain Structure and Function*, 226(4), 1135–1153. <https://doi.org/10.1007/s00429-021-02229-4>
- Hof, P. R., Glezer, I. I., Condé, F., Flagg, R. A., Rubin, M. B., Nimchinsky, E. A., & Vogt Weisenhorn, D. M. (1999). Cellular distribution of the calcium-binding proteins parvalbumin, calbindin, and calretinin in the neocortex of mammals: phylogenetic and developmental patterns. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 16(2), 77–116. [https://doi.org/10.1016/s0891-0618\(98\)00065-9](https://doi.org/10.1016/s0891-0618(98)00065-9)
- Juraska, J. M., & Willing, J. (2017). Pubertal onset as a critical transition for neural development and cognition. *Brain Research*, 1654, 87–94. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.04.012>
- Karatsoreos, I. N. (2014). Links between Circadian Rhythms and Psychiatric Disease. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 8. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00162>
- Kepecs, A., Fishell, G. (2014). Interneuron cell types are fit to function. *Nature* 505:318–326.
- Kim, K. K., Adelstein, R. S., & Kawamoto, S. (2009). Identification of Neuronal Nuclei (NeuN) as Fox-3, a New Member of the Fox-1 Gene Family of Splicing Factors. *Journal of Biological Chemistry*, 284(45), 31052–31061. <https://doi.org/10.1074/jbc.m109.052969>
- Lau, C., Hebert, M., Vani, M. A., Walling, S., Hayley, S., Lagace, D. C., & Blundell, J. (2016). Absence of neurogenic response following robust predator-induced stress response. *Neuroscience*, 339, 276–286. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.10.001>

- Li, J., Xie, X., Li, Y., Liu, X., Liao, X., Su, Y.-A., & Si, T. (2017). Differential Behavioral and Neurobiological Effects of Chronic Corticosterone Treatment in Adolescent and Adult Rats. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00025>
- Logan, R. W., & McClung, C. A. (2018). Rhythms of life: circadian disruption and brain disorders across the lifespan. *Nature Reviews Neuroscience*, 20(1), 49–65. <https://doi.org/10.1038/s41583-018-0088-y>
- Lopes-Aguiar, C., Rossignoli, M., Esteves, I., Ruggiero, R., Bueno Júnior, L., Romcy-Pereira, R., & Leite, J. (2012). Indução prévia de LTP na via CA1-córtex pré-frontal medial de ratos bloqueia os prejuízos de plasticidade pré-sináptica induzidos por modelo de psicose pós-ictal in vivo. *Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology*, 18(2), 45–49. <https://doi.org/10.1590/s1676-26492012000200005>
- Majcher-Maślanka, I., Solarz, A., Wędzony, K., & Chocyk, A. (2017). The effects of early-life stress on dopamine system function in adolescent female rats. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 57(1), 24–33. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2017.01.001>
- Marques, N., Menna-Barreto, L. (1997). *Cronobiologia: princípios e aplicações*, São Paulo: Edusp, 1997.
- Markham, J. A., Morris, J. R., & Juraska, J. M. (2007). Neuron number decreases in the rat ventral, but not dorsal, medial prefrontal cortex between adolescence and adulthood. *Neuroscience*, 144(3), 961–968. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.10.015>
- McCormick, C., Smith, C., & Mathews, I. (2008). Effects of chronic social stress in adolescence on anxiety and neuroendocrine response to mild stress in male and female rats. *Behavioural Brain Research*, 187(2), 228–238. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.09.005>
- Melcer, S., & Meshorer, E. (2010). Chromatin plasticity in pluripotent cells. *Essays in Biochemistry*, 48, 245–262. <https://doi.org/10.1042/bse0480245>
- Menna-Barreto, L., Wey, D. (2007). Ontogênese do sistema de temporização: a construção e as reformas dos ritmos biológicos ao longo da vida humana. *Psicologia USP*, 2007, 18(2), 133–153. <https://www.revistas.usp.br/psicousp/article/view/41924/45592>.
- Meurer, Y. da S. R., Linhares, S. S. G., Lima, A. da C., Aquino, A. C. Q., Brandão, L. E. M., Nôga, D. A., ... Silva, R. H. (2021). Postnatal exposure to fluoxetine led to cognitive-emotional alterations and decreased parvalbumin positive neurons in the hippocampus of juvenile Wistar rats. *International Journal of Developmental Neuroscience*. <https://doi.org/10.1002/jdn.10139>
- Morag, I., & Ohlsson, A. (2013). Cycled light in the intensive care unit for preterm and low birth weight infants. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. <https://doi.org/10.1002/14651858.cd006982.pub3>

- Neto, S. P. D., Carneiro, B. T. S., Valentinuzzi, V. S., & Araújo, J. F. (2008). Dissociation of the circadian rhythm of locomotor activity in a 22 h light–dark cycle impairs passive avoidance but not object recognition memory in rats. *Physiology & Behavior*, 94(3), 523–527. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2008.03.013>
- Oliveira, I. G. B., Junior, M. D. F., Lopes, P. R., Campos, D. B. T., Ferreira-Neto, M. L., Santos, E. H. R., ... Rosa, D. A. (2019). Forced internal desynchrony induces cardiometabolic alterations in adult rats. *Journal of Endocrinology*, 242(2), 25–36. <https://doi.org/10.1530/joe-19-0026>
- Orellana, J. A., Moraga-Amaro, R., DÃ-az-Galarce, R., Rojas, S., Maturana, C. J., Stehberg, J., & SÃ-chez, J. C. (2015). Restraint stress increases hemichannel activity in hippocampal glial cells and neurons. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00102>
- Pantazopoulos, H., Gisabella, B., Rexrode, L., Benefield, D., Yildiz, E., Seltzer, P., ... Berretta, S. (2020). Circadian Rhythms of Perineuronal Net Composition. *Eneuro*, 7(4), ENEURO.0034-19.2020. <https://doi.org/10.1523/eneuro.0034-19.2020>
- Page, C. E., Shepard, R., Heslin, K., & Coutellier, L. (2019). Prefrontal parvalbumin cells are sensitive to stress and mediate anxiety-related behaviors in female mice. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56424-9>
- Paolicelli, R. C., Bolasco, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., ... Gross, C. T. (2011). Synaptic Pruning by Microglia Is Necessary for Normal Brain Development. *Science*, 333(6048), 1456–1458. <https://doi.org/10.1126/science.1202529>
- Pereira, J. C. (2017). A dissociação do ritmo circadiano da atividade locomotora em um ciclo claro-escuro de 22 horas não induz o comportamento do tipo ansioso, nem prejudica a memória aversiva de ratos Wistar adolescentes. Dissertação de mestrado, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.
- Pringuey, D., Tible, O., & Cherkh, F. (2009). Ontogenèse des rythmes circadiens chez l'humain. *L'Encéphale*, 35, S46–S52. [https://doi.org/10.1016/s0013-7006\(09\)75533-2](https://doi.org/10.1016/s0013-7006(09)75533-2)
- Rahimi-Balaei, M., Bergen, H., Kong, J., & Marzban, H. (2018). Neuronal Migration During Development of the Cerebellum. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00484>
- Reemst, K., Noctor, S. C., Lucassen, P. J., & Hol, E. M. (2016). The Indispensable Roles of Microglia and Astrocytes during Brain Development. *Frontiers in Human Neuroscience*, 10. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2016.00566>
- Rocha, V.A. Caracterização química do núcleo supraquiasmático do primata Cebus apella. Dissertação de mesgrado, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42131/tde-12082011-093351/fr.php>.
- Sakai, J. (2020). Core Concept: How synaptic pruning shapes neural wiring during development and, possibly, in disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(28), 16096–16099. <https://doi.org/10.1073/pnas.2010281117>

- Sarnat, H. B., Nochlin, D., & Born, D. E. (1998). Neuronal nuclear antigen (NeuN): a marker of neuronal maturation in the early human fetal nervous system. *Brain and Development*, 20(2), 88–94. [https://doi.org/10.1016/s0387-7604\(97\)00111-3](https://doi.org/10.1016/s0387-7604(97)00111-3)
- Smarr, B. L., Grant, A. D., Perez, L., Zucker, I., & Kriegsfeld, L. J. (2017). Maternal and Early-Life Circadian Disruption Have Long-Lasting Negative Consequences on Offspring Development and Adult Behavior in Mice. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03406-4>
- Stiles, J., & Jernigan, T. L. (2010). The Basics of Brain Development. *Neuropsychology Review*, 20(4), 327–348. <https://doi.org/10.1007/s11065-010-9148-4>
- Schwaller, B. (2012). The use of transgenic mouse models to reveal the functions of Ca²⁺ buffer proteins in excitable cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1820(8), 1294–1303. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.11.008>
- Schwaller, B., Meyer, M., & Schiffmann, S. (2002). “New” functions for “old” proteins: The role of the calcium-binding proteins calbindin D-28k, calretinin and parvalbumin, in cerebellar physiology. Studies with knockout mice. *The Cerebellum*, 1(4), 241–258. <https://doi.org/10.1080/147342202320883551>
- Schwaller, B., Tetko, I. V., Tandon, P., Silveira, D. C., Vreugdenhil, M., Henzi, T., ... Villa, A. E. P. (2004). Parvalbumin deficiency affects network properties resulting in increased susceptibility to epileptic seizures. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 25(4), 650–663. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2003.12.006>
- Schwartz, G. J., & Zeltser, L. M. (2013). Functional Organization of Neuronal and Humoral Signals Regulating Feeding Behavior. *Annual Review of Nutrition*, 33(1), 1–21. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-071812-161125>
- Van De Werd, H. J. J. M., Rajkowska, G., Evers, P., & Uylings, H. B. M. (2010). Cytoarchitectonic and chemoarchitectonic characterization of the prefrontal cortical areas in the mouse. *Brain Structure and Function*, 214(4), 339–353. <https://doi.org/10.1007/s00429-010-0247-z>
- Varcoe, T. J., Boden, M. J., Voultios, A., Salkeld, M. D., Rattanatrak, L., & Kennaway, D. J. (2013). Characterisation of the Maternal Response to Chronic Phase Shifts during Gestation in the Rat: Implications for Fetal Metabolic Programming. *PLoS ONE*, 8(1), e53800. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053800>
- Vilches, N., Spichiger, C., Mendez, N., Abarzua-Catalan, L., Galdames, H. A., Hazlerigg, D. G., ... Torres-Farfan, C. (2014). Gestational Chronodisruption Impairs Hippocampal Expression of NMDA Receptor Subunits Grin1b/Grin3a and Spatial Memory in the Adult Offspring. *PLoS ONE*, 9(3), e91313. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091313>
- Voiculescu, S. E., Le Duc, D., Roșca, A. E., Zeca, V., Chițimbuș, D. M., Arsene, A. L., ... Zăgrean, A.-M. (2016). Behavioral and molecular effects of prenatal continuous light exposure in the adult rat. *Brain Research*, 1650, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.08.031>

- Wang, H.-Y., Hsieh, P.-F., Huang, D.-F., Chin, P.-S., Chou, C.-H., Tung, C.-C., ... Huang, H.-S. (2015). RBFOX3/NeuN is Required for Hippocampal Circuit Balance and Function. *Scientific Reports*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/srep17383>
- Winfrey, A. T. (1967). Biological rhythms and the behavior of populations of coupled oscillators. *Journal of Theoretical Biology*, 16(1), 15–42. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(67\)90051-3](https://doi.org/10.1016/0022-5193(67)90051-3)
- Yu, P., McKinney, E. C., Kandasamy, M. M., Albert, A. L., & Meagher, R. B. (2014). Characterization of brain cell nuclei with decondensed chromatin. *Developmental Neurobiology*, 75(7), 738–756. <https://doi.org/10.1002/dneu.22245>

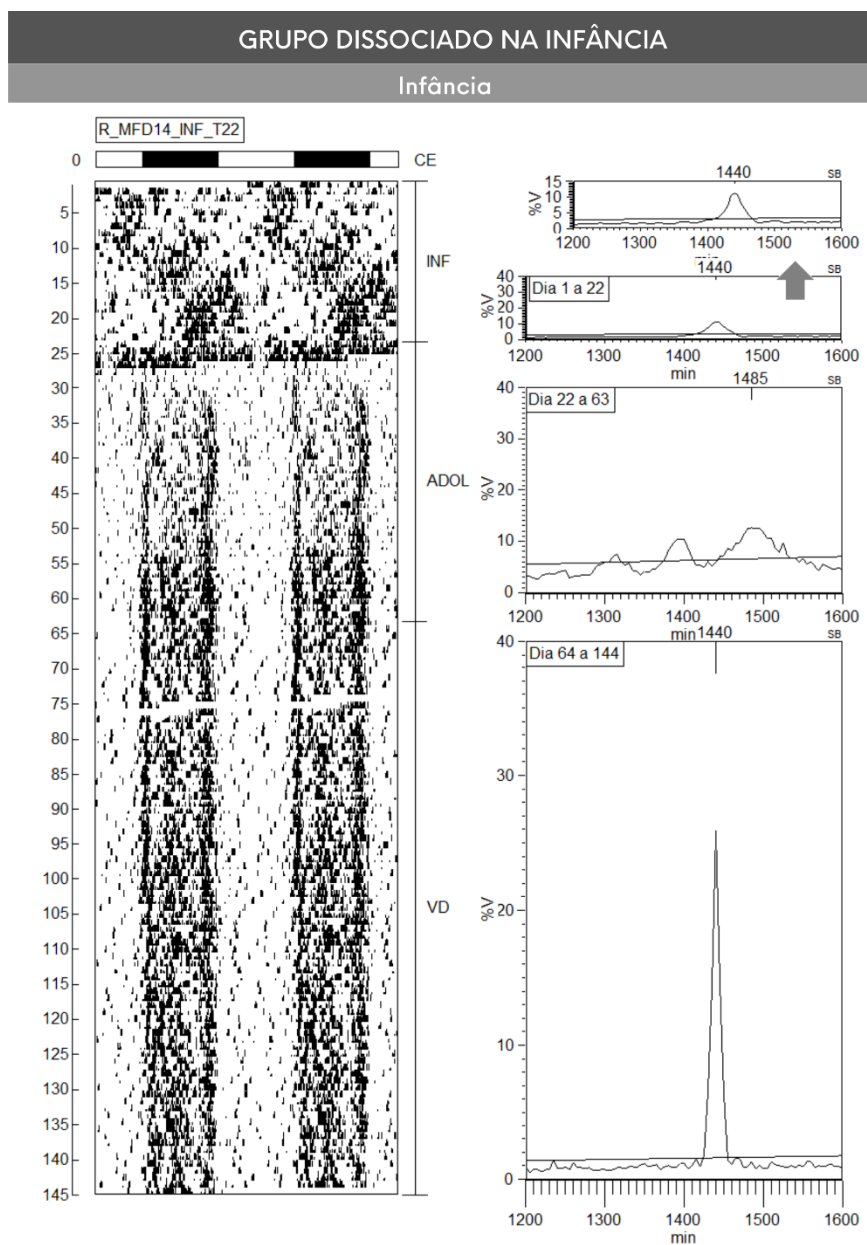
MATERIAL SUPLEMENTAR

Suplemento 1 - Estabilidade do ritmo expressa pelo percentual de variância médio de todos grupos nas diferentes fases da vida, João Pessoa, 2021.

		INFÂNCIA			ADOLESCÊNCIA		VIDA ADULTA
		1490	1405	1440	1320	>1440	>1440
Grupo DI	$\bar{X}$	9,61	7,92	-	-	16,76	27,12
	DP	-	-	-	-	3,93	4,49
Grupo DA	$\bar{X}$	-	-	26,66	5,73	5,31	29,56
	DP	-	-	-	1,25	0,43	6,69
Controle	$\bar{X}$	-	-	27,85	-	24,16	33,25
	DP	-	-	7,52	-	4,31	6,39

$\bar{X}$ =Média, DP=Desvio-padrão. Os traços representam os dados que não se aplicam a cada grupo específico, sendo portanto, inexistentes. Os valores em negrito representam os momentos em que os animais estiveram submetidos ao protocolo T22. Não foram realizados testes estatísticos com os dados aqui apresentados.

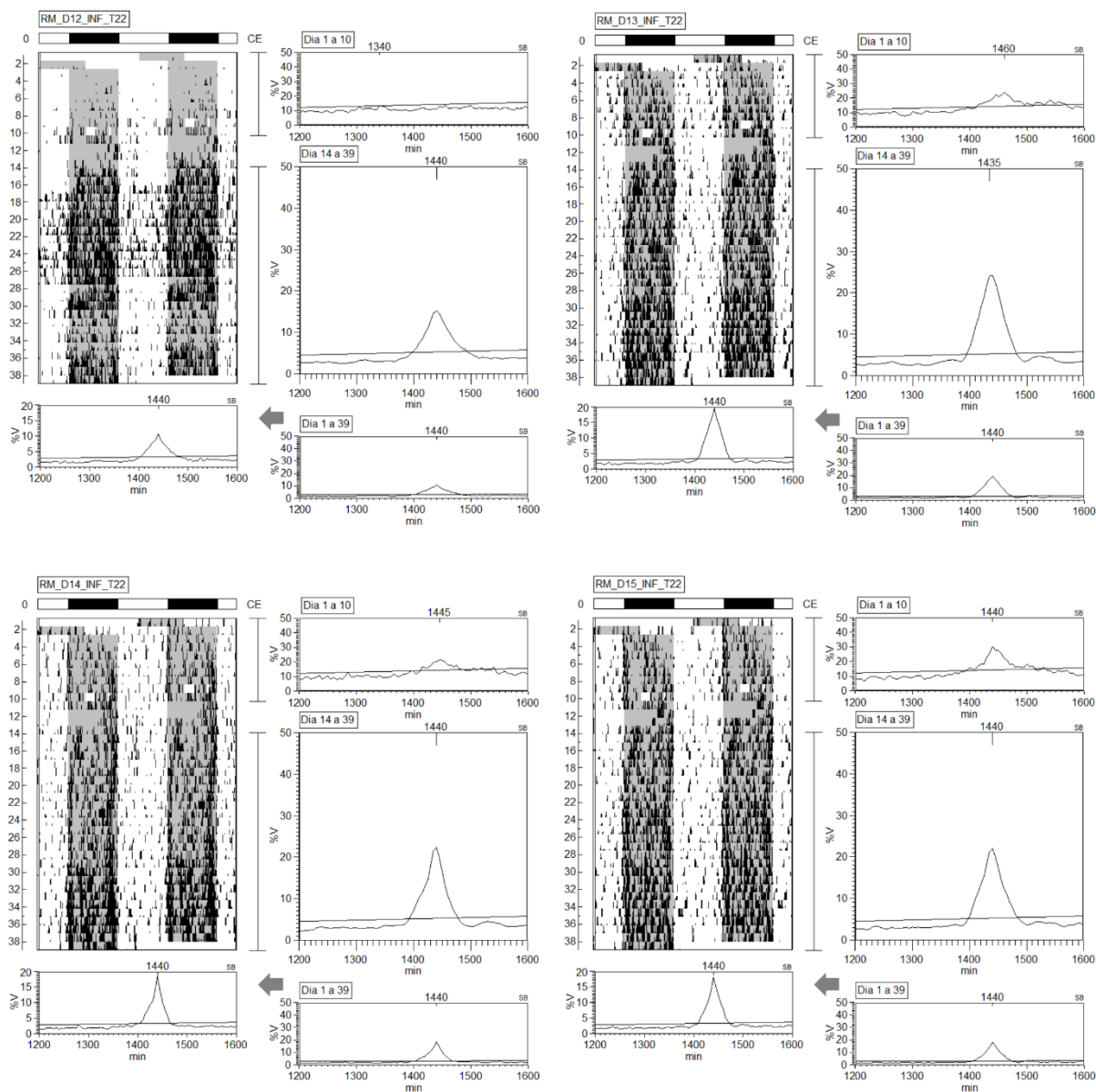
FONTE: Elaboração própria



Suplemento 3 – Adolescência do grupo dissociado na infância (actogramas e periodogramas individuais).

GRUPO DISSOCIADO NA INFÂNCIA

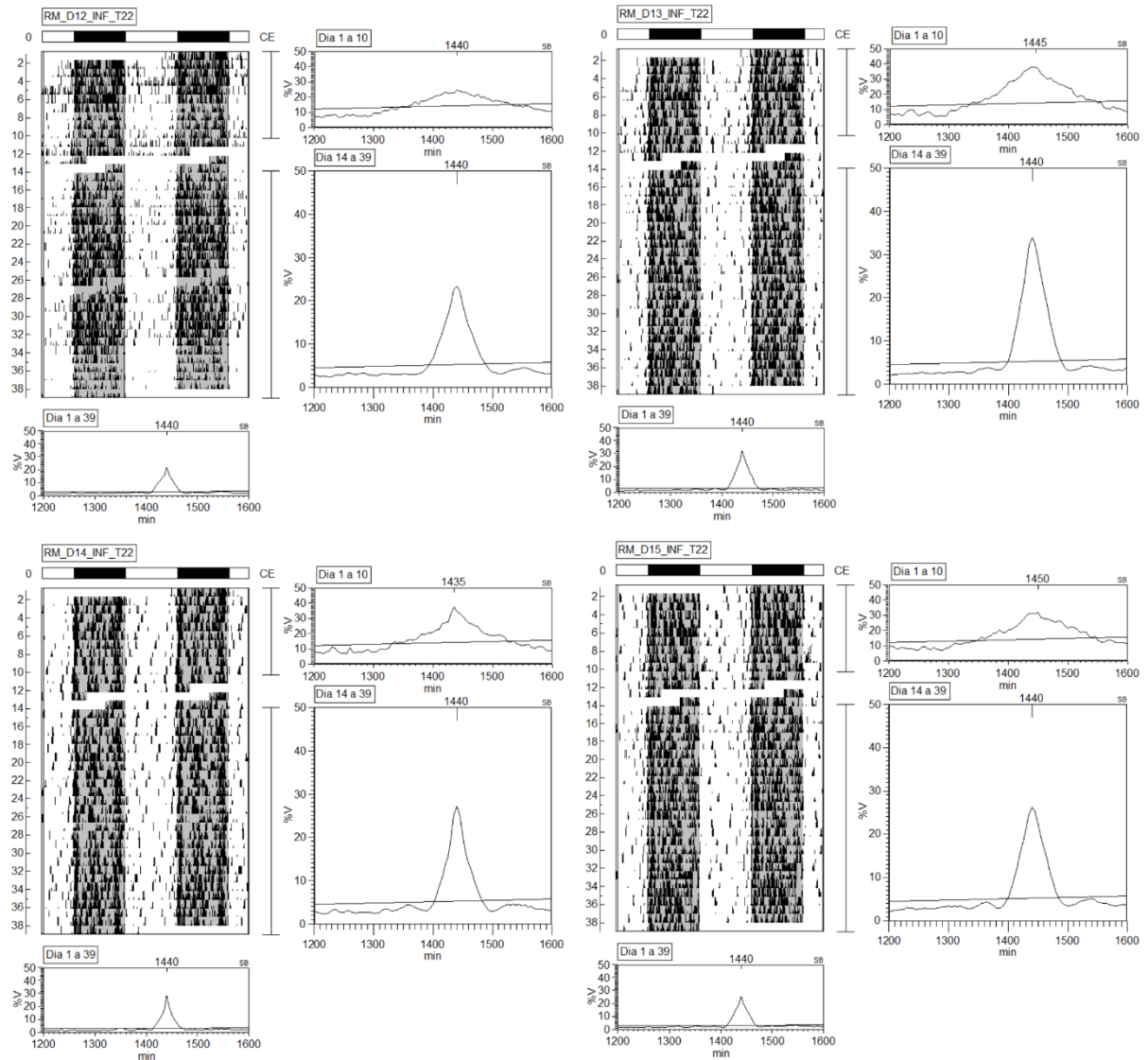
Adolescência



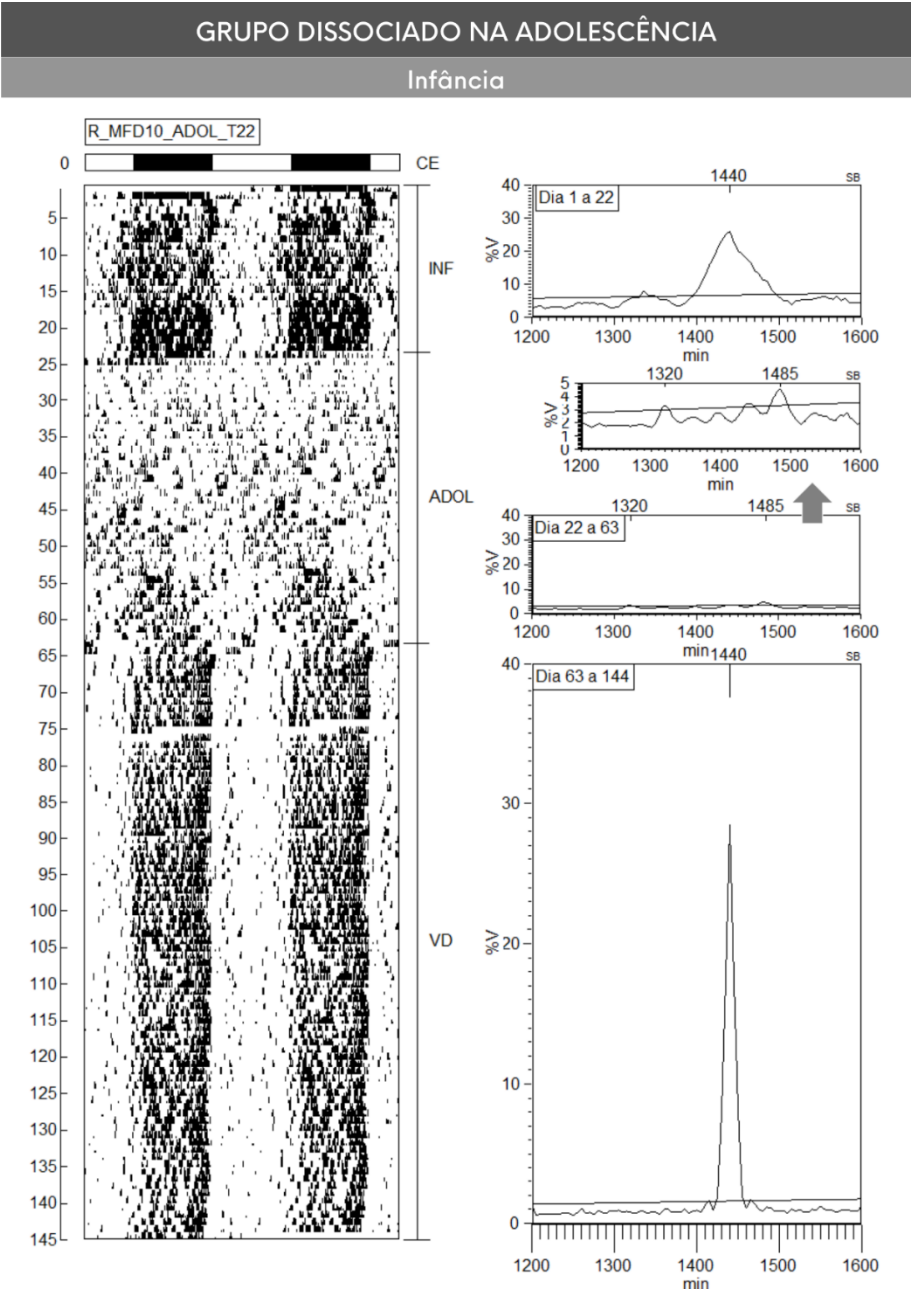
Suplemento 4 – Vida adulta do grupo dissociado na infância (actogramas e periodogramas individuais).

GRUPO DISSOCIADO NA INFÂNCIA

Vida adulta



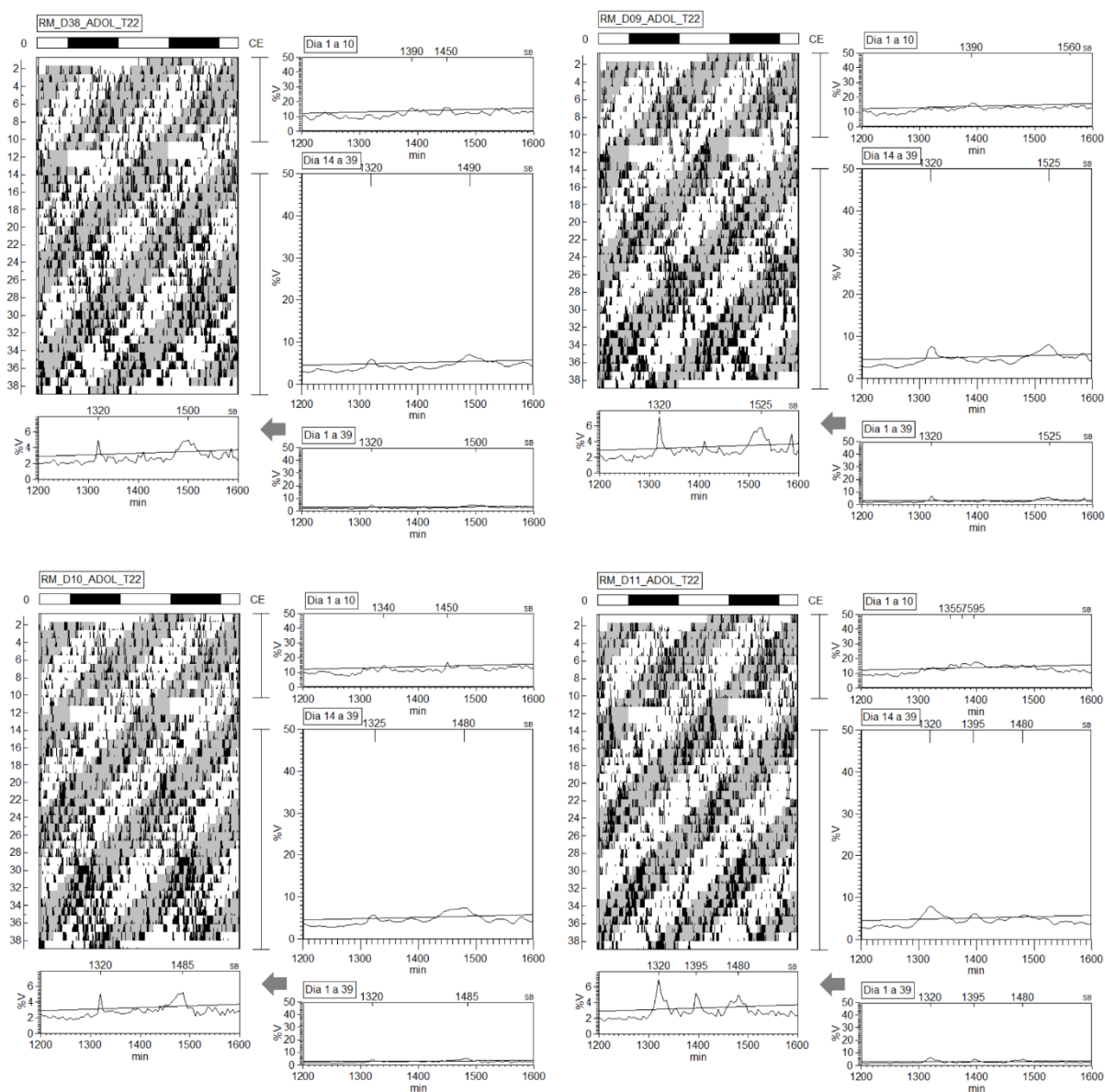
Suplemento 5 – Infância do grupo dissociado na adolescência (actogramas e periodogramas individuais).



Suplemento 6 – Adolescência do grupo dissociado na adolescência (actogramas e periodogramas individuais).

GRUPO DISSOCIADO NA ADOLESCÊNCIA

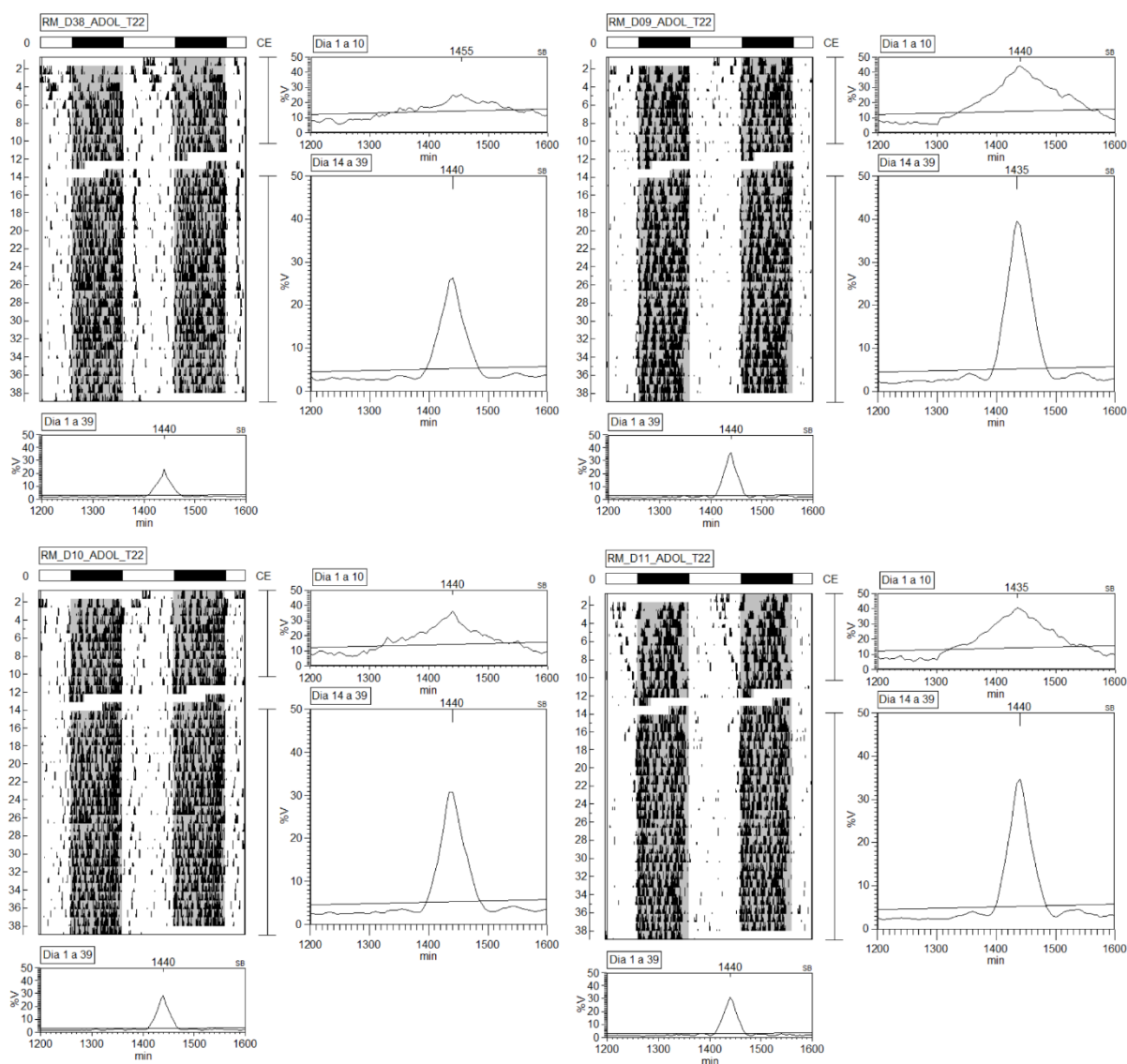
Adolescência



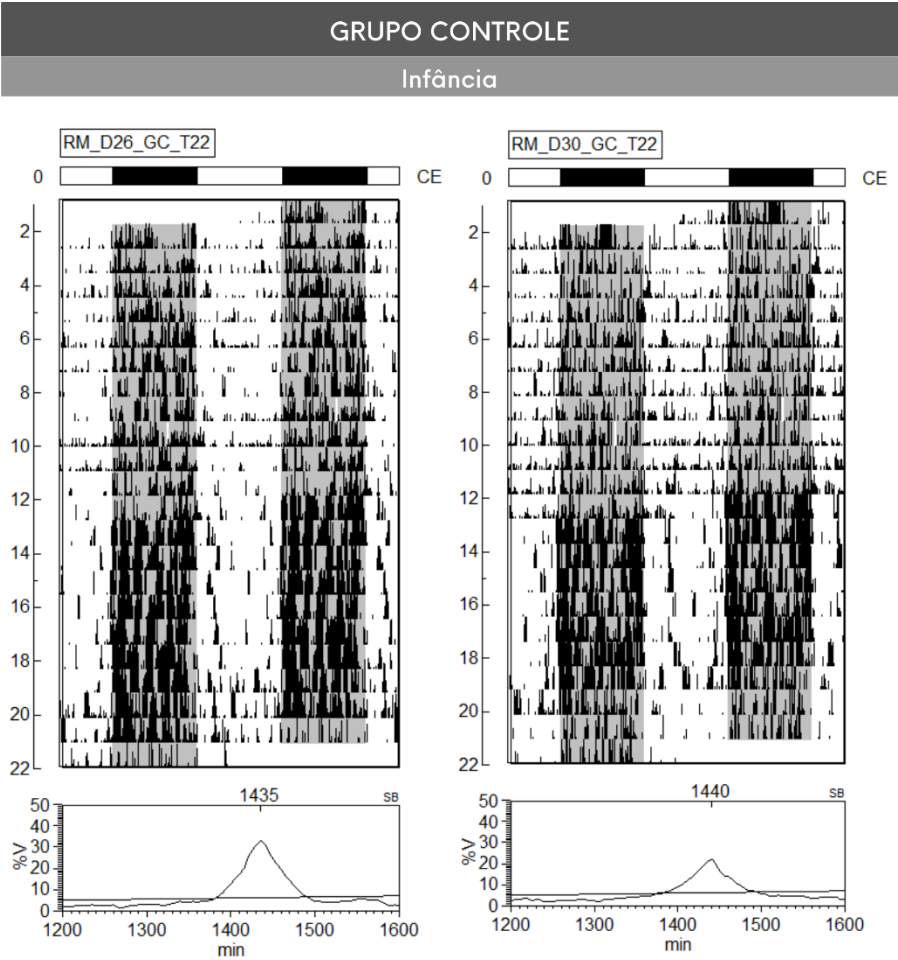
Suplemento 7 – Vida adulta do grupo dissociado na adolescência (actogramas e periodogramas individuais).

GRUPO DISSOCIADO NA ADOLESCÊNCIA

Vida adulta



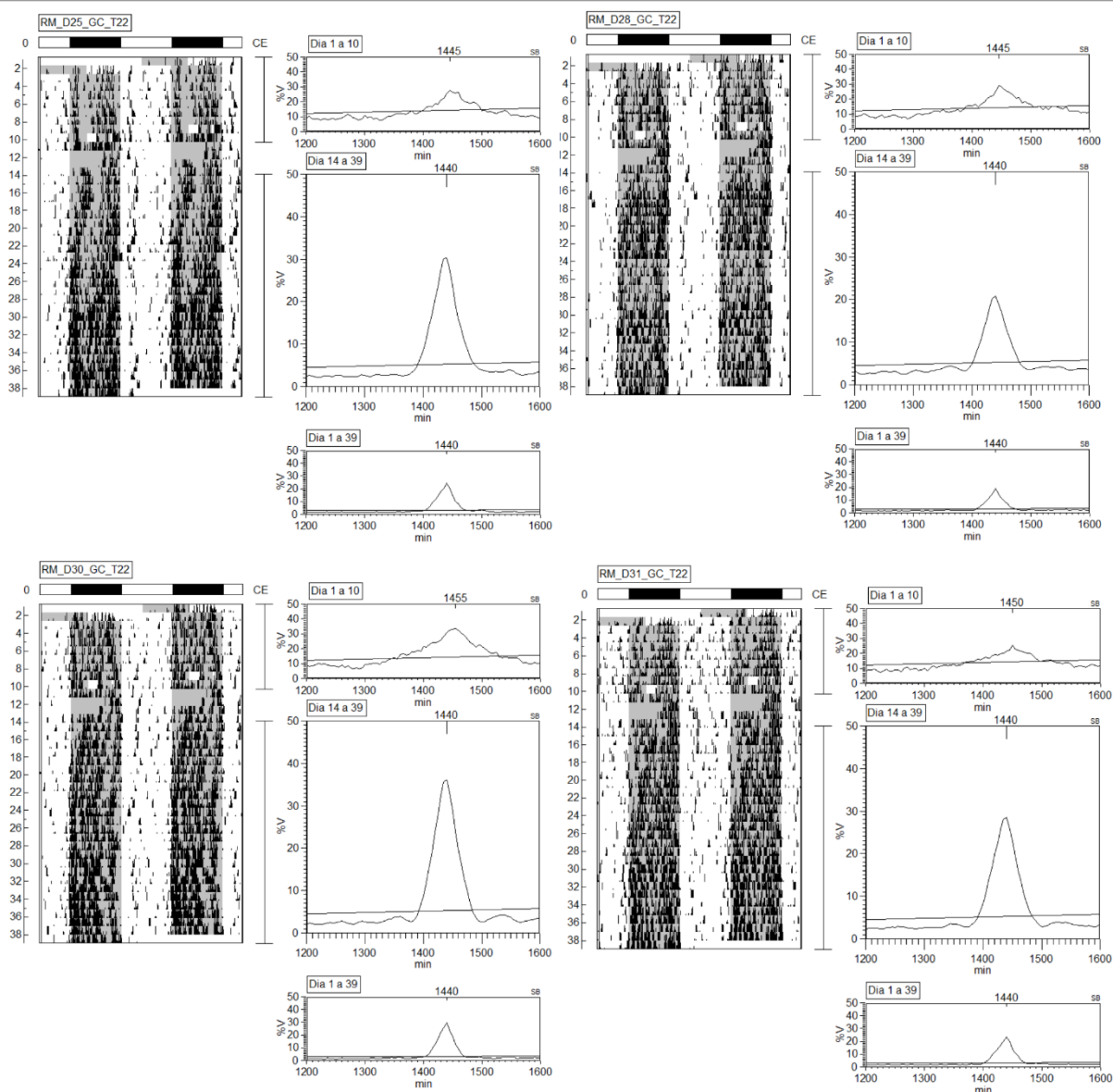
Suplemento 8 – Infância do grupo controle (actogramas e periodogramas individuais).



Suplemento 9 – Adolescência do grupo controle (actogramas e periodogramas individuais).

GRUPO CONTROLE

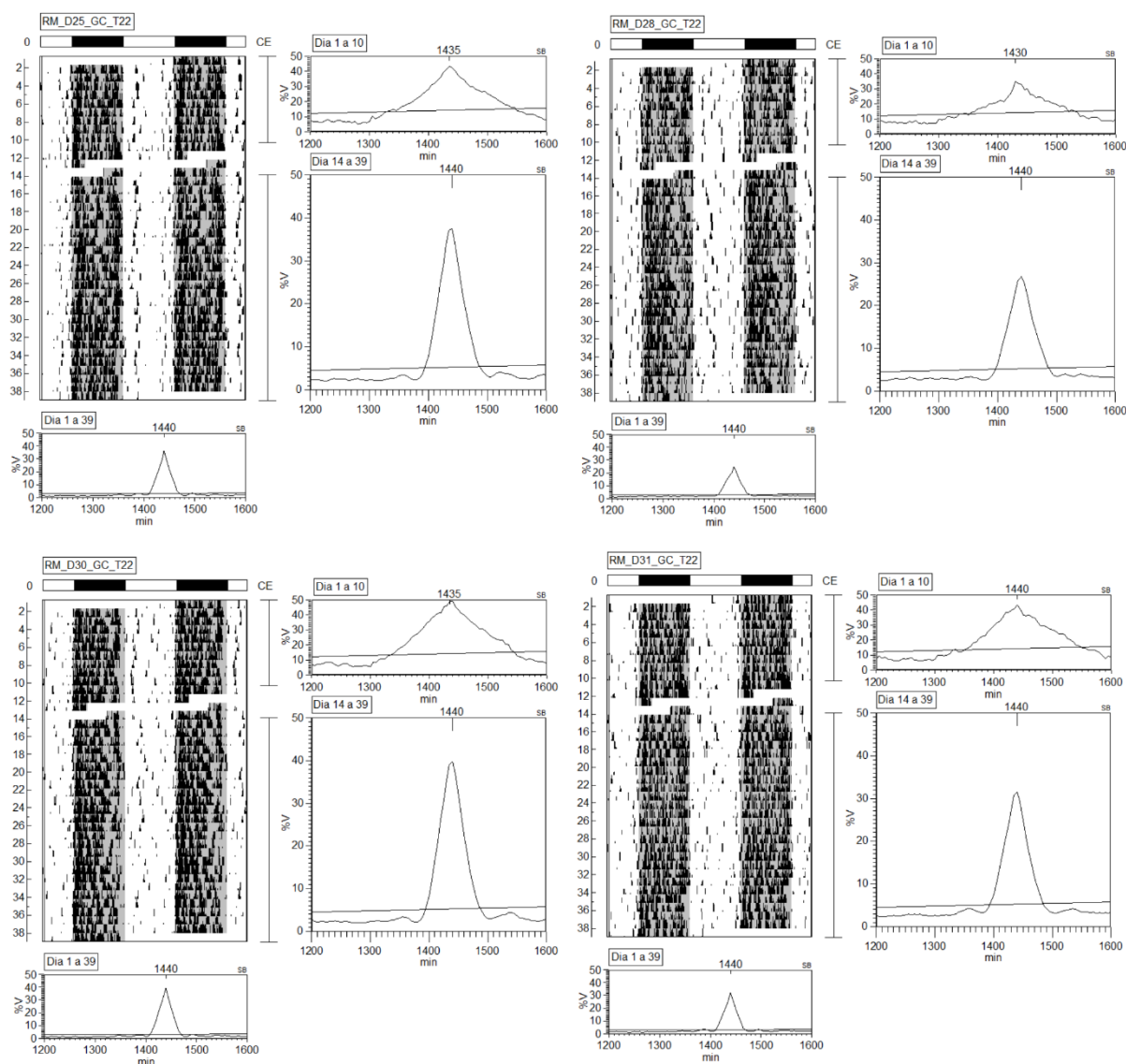
Adolescência



Suplemento 10 – Vida adulta do grupo controle (actogramas e periodogramas individuais).

GRUPO CONTROLE

Vida adulta



ANEXO A – Parecer aprovado pela Comissão Ética no Uso de Animais



Universidade
Federal da
Paraíba

Comissão de Ética no
Uso de Animais

Reitoria



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos da dessincronização interna na memória, ansiedade e depressão de ratos Wistar ao longo da ontogênese", protocolada sob o CEUA nº 5688110518 (ID 000297), sob a responsabilidade de **Adriana Maria Fernandes de Oliveira Golzio e equipe; Crhistiane Andressa da Silva; Karen Cristina Pugliane** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) na reunião de 17/07/2018.

We certify that the proposal "Effects of internal desynchronization on memory, anxiety and depression of Wistar rats along ontogenesis", utilizing 12 Heterogenics rats (12 males), protocol number CEUA 5688110518 (ID 000297), under the responsibility of **Adriana Maria Fernandes de Oliveira Golzio and team; Crhistiane Andressa da Silva; Karen Cristina Pugliane** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Paraíba (CEUA/UFPB) in the meeting of 07/17/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **08/2018** a **07/2019** Área: **Psicologia**

Origem: **Unidade de Produção Animal IPeFarM**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **3 a 4 meses**

N: **12**

Linhagem: **Rattus Norvegicus - Wistar**

Peso: **300 a 350 g**

Local do experimento: Laboratório de Estudo da memória e Cognição (Lemcog) - Universidade Federal da Paraíba)Campus I)

João Pessoa, 19 de agosto de 2021

Profa. Dra. Adriana Maria Fernandes de Oliveira Golzio
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. Ivya Carmem Talieri
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba