



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

MAYARA RODRIGUES BARBOSA

**EFEITO DE VARIAÇÕES DE FOTOPERÍODO NA EXPRESSÃO DE *PER2* e *BDNF*
CÉREBRO DE CAMUNDONGOS DA LINHAGEM C57BL/6**

MACEIÓ

2017

MAYARA RODRIGUES BARBOSA

**EFEITO DE VARIAÇÕES DE FOTOPERÍODO NA EXPRESSÃO DE *PER2* E *BDNF*
NO CÉREBRO DE CAMUNDONGOS DA LINHAGEM C57BL/6**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas para obtenção do título de mestre em ciências da saúde.

Orientador: Prof. Dr. Tiago Gomes de Andrade.

Maceió

2017

Catálogo na fonte
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

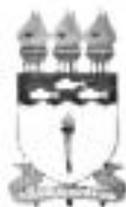
B238e Barbosa, Mayara Rodrigues.
 Efeito de variações de fotoperíodo na expressão de Per²e Bdnf no cérebro
 cérebro de camundongos da linhagem C57BL/6 / Mayara Rodrigues Barbosa.
 – 2017.
 72 f. : il.

Orientador: Tiago Gomes de Andrade.
Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de
Alagoas. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ciências
da Saúde. Maceió, 2017.

Bibliografia: f. 58-63.
Apêndices: f. 64-70.
Anexos: f. 71-72

1. Ritmo biológico. 2. Fotoperíodo. 3. Neutrófilos - Fator de desenvolvimento
4. Variação sazonal. 5. Camundongos – Estudo experimental. I. Título.

CDU: 61



Folha de Aprovação

Mayara Rodrigues Barbosa

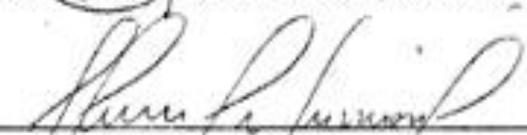
Efeito de variações de fotoperíodo na expressão de PER2 e BDNF no cérebro de camundongos da linhagem C57BL/6

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 03 de março de 2017.

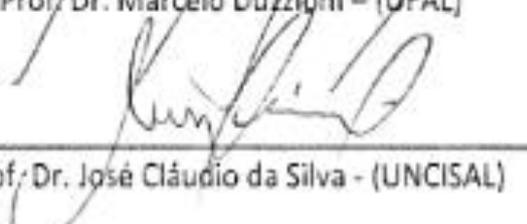
Banca Examinadora



Prof. Dr. Tiago Gomes de Andrade (Orientador)



Prof. Dr. Marcelo Duzzioni - (UFAL)



Prof. Dr. José Cláudio da Silva - (UNCISAL)

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida, meu guia, e inspiração constante; ao meu pai João Arnaldo Barbosa (*in memoria*), a minha mãe Marinalva Rodrigues dos Reis por toda dedicação, aos meus irmãos Natanael Neto e Eraldo Junior, a meu namorado, companheiro e amigo Rodrigo Pedrosa de Freitas, aos professores e amigos.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Alagoas – *Campus Arapiraca* e A. C. Simões, bem como ao Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde – ICBS, através do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, que me proporcionou a formação acadêmica e me permitiu alcançar muitos objetivos, com atenção especial a professora Salete Smannioto, coordenadora sempre presente;

Agradeço a todos os professores, coordenadores por me proporcionarem o conhecimento não apenas racional, mas a manifestação do caráter e afetividade da educação no processo de formação profissional, por tanto que se dedicaram, não somente por terem me ensinado, mas por terem me feito aprender, desde a graduação. A palavra mestre, nunca fará justiça aos professores dedicados aos quais terão os meus eternos agradecimentos. Um agradecimento especial ao professor Dr^o Tiago Gomes de Andrade, que me permitiu conhecer o mundo da pesquisa e da ciência, onde me encontrei, ainda ao professor Tiago agradeço o tempo em mim investido para orientação, desde quanto me recebeu em seu laboratório, em janeiro de 2011, no primeiro semestre da graduação e com sua competência e amor pela ciência, com sua maiêutica própria despertou em mim a curiosidade, o interesse e o amor pela ciência, enquanto orientador ajudou-me a construir a base e alicerce desta eterna construção que é o conhecimento científico, meu eterno agradecimento e admiração, por ser professor, pesquisador, humano e pai científico.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Biologia Molecular e Expressão Gênica (LABMEG), agora Laboratório de Cronobiologia Molecular (LCM) que é uma família, especialmente a Daniel Gomes Coimbra, Diego de Siqueira Figueredo, José Luiz Araújo Santos, Maria José dos Santos, Ellyda Fernanda Lopes Costa, Bruna Del Vechio Koike e a todos os integrantes desta família. Por todas as noites em claro no laboratório, por todos os momentos de pesquisa, de diversão, de estresse, conselhos, encencas e reconciliações, ah, foram tantas. Daniel, quantos momentos de desabafos, conselhos sábios e amigo, quantos dias e noites de trabalho, quantos momentos divertidos, que chorávamos de tanto rir. Muito obrigada por ser além de um colega de trabalho um amigo para todas as horas. Diego, que desde a graduação tem me “orientado”, me instruído, a quem tanto acompanhei e que tanto me ajudou nas inúmeras madrugadas, noites de sexta-feira no laboratório e nas análises e gráficos (cosinor man). Luiz e Ellyda, minha menina, quantos perrengues passamos juntos, quanta diversão vivemos também, amigos de pesquisa, de festas, de momentos bons e momentos ruins.

A minha banca de qualificação, professora Magna Suzana e professor Olagide Castro, e a banca de defesa final, professores José Cláudio e Marcelo Duzzioni, por suas sugestões e enriquecimento do trabalho.

Agradeço a CAPES por proporcionar-me financiamento enquanto bolsista durante todo o mestrado.

Ao meu pai João Arnaldo Barbosa (*in memoria*) e minha avó Benedita (*in memoria*), que infelizmente não puderam acompanhar esta trajetória, mas sempre vejo seus reflexos em minhas atitudes e ao me enxergar no espelho. Obrigada por terem me ensinado o que é respeito e amor ao próximo, e por tanto me incentivarem a trilhar o caminho dos estudos, da formação, com honra, moral e dignidade; a minha mãe Marinalva Rodrigues dos Reis por tanto ter se dedicado a realização dos nossos sonhos, muitas vezes deixando de viver os próprios e aos meus irmãos Natanael Barbosa da Silva Neto e Eraldo Junior pelo amor, carinho e compreensão.

Aquele que é mais que namorado, meu par e parceiro, companheiro e amigo, meu presente preparado por Deus que adentrou os meus caminhos na hora certa, Rodrigo Pedrosa de Freitas, obrigada por me incentivar, entender, apoiar, ser ombro e carinho, por preocupar-se, encorajar-me e aconselhar sabiamente com um cuidado próprio de quem ama. Por ficar ao meu lado durante os inúmeros momentos de estudo, sempre me fortalecendo, por me fazer transformar lágrimas em sorrisos. Nossa caminhada agora é uma só e tenho a certeza que juntos viveremos muitos momentos de felicidade como já vivemos. Agradeço também a sua família que me acolheu como sendo sua, com amor e respeito, com um carinho especial a Valdevez da Rocha Pedrosa, esta sogra-mãe;

A minha amiga, mãe e conselheira, Iracilda Maria Pires Santos por me acolher, me aconselhar sabiamente, e a toda sua família, que posso considerar como minha, sendo Maurício Silva Santos como um pai e Demitry Messias Santos;

De forma geral aos familiares mais próximos que acompanharam minha caminhada;

Por fim a Deus, por ter me concedido vida, saúde e sapiência, proporcionando me alcançar tantas conquistas e superar obstáculos;

“A estação das cores.
Primaverei-me os sentimentos deixando
florescer-me a esperança, esquecendo
outonos outros passados, carregados de tons
marrons. Me refiz em cores, renasci em
flores, cheiros e amores... e quem bem-me-
queira, ei de querer tão bem.”

(Rodrigo Pedrosa de Freitas)

“Toda nossa ciência, comparada com a
realidade, é primitiva e infantil – e, no
entanto, é a coisa mais preciosa que temos.”

(Albert Einstein)

RESUMO

Apesar de existirem alguns estudos demonstrando o efeito de diferentes fotoperíodos na morfologia cerebral, ainda há inúmeras lacunas no que se refere a investigação da modulação de processos fisiológicos e comportamentais, por alterações de fotoperíodo de forma gradual, que se aproxime das variações que acontecem no ambiente natural, uma vez que os estudos mostram o efeito de regimes de fotoperíodos constantes. Para entender como o fotoperíodo pode ter efeito em estruturas envolvidas com funções executivas (*mPFC* medial - mPFC e estriado), analisamos a expressão de um gene envolvido com neuroplasticidade (*Bdnf*) e um gene central do sistema temporizador circadiano (*Per2*) em diferentes regimes de fotoperíodo, em dois momentos de um ciclo de 24 horas (ZT06 e ZT18). Além de regimes de fotoperíodo convencionalmente descritos na literatura (12:12; 08:16 e 16:08), avaliamos a expressão destes genes em regimes de transição gradual de fotoperíodo, com incremento (TCL) ou diminuição (TLC) diária de uma hora de luz, simulando variações sazonais ambientais. Os resultados demonstram que o regime de transição gradual do fotoperíodo curto ao longo altera o perfil de expressão dos transcritos de *Per2* e *Bdnf* em estriado, uma vez que os níveis destes transcritos apenas não diferem no grupo TCL. A ausência da diferença dos níveis de expressão dos genes analisados, entre os ZTs 06 e 18, no grupo TCL, sugere que este regime de transição module de maneira mais significativa a expressão destes genes. A análise do perfil diário, ao longo de um ciclo de 24 h destes genes nos regimes 12:12 e TCL, demonstrou que *Per2* e *Bdnf* apresentam variação gradual apenas no grupo 12:12. No regime TCL não foi identificada ritmicidade destes genes, em nenhum dos tecidos. Os níveis de expressão destes genes são significativamente menores no grupo TCL comparado ao grupo 12:12 em mPFC, sugerindo que esta redução no nível de expressão esteja associada à perda de ritmicidade. Assim, este regime, que simula contextos ambientais associados ao comportamento suicida, afetou a expressão rítmica dos genes *Per2* e *Bdnf*, sugerindo uma inadaptação temporal destas estruturas a variações de fotoperíodo no modelo estudado.

Palavras-Chave: Ritmo Biológico. Fotoperíodo. Fator de Desenvolvimento Neurotrófico. Variação sazonal.

ABSTRACT

Although there are some studies demonstrating the effect of different photoperiods on the cerebral morphology, there are still many gaps in the investigation of the modulation of physiological and behavioral processes, by photoperiod changes in a gradual way, that approximates the variations that occur in the environment Whereas the studies show the effect of constant photoperiod regimes. In order to understand how the photoperiod can have an effect on structures involved with executive functions (mPFC and mRFC), we analyzed the expression of a gene involved with neuroplasticity (Bdnf) and a central gene of the circadian timer system (Per2) in different photoperiod, in two moments of a 24 hour cycle (ZT06 and ZT18). In addition to the photoperiod regimes conventionally described in the literature (12:12, 08:16 and 16:08), we evaluated the expression of these genes in gradual photoperiod transition regimes, with increment (TCL) or daily decrease of one hour of light, simulating seasonal environmental variations. The results demonstrate that the gradual transition regime of the short photoperiod changes the expression profile of the transcripts of Per2 and Bdnf in striatum, since the levels of these transcripts only do not differ in the TCL group. The absence of the difference of the levels of expression of the analyzed genes between ZTs 06 and 18 in the TCL group suggests that this transition regime modulates the expression of these genes more significantly. Analysis of the daily profile along a 24 h cycle of these genes in the 12:12 and TCL regimes de, demosntrated that Per2 and Bdnf show gradual variation only in the 12:12 group. In the TCL regime, no rhythmicity of these genes was identified in any of the tissues. The expression levels of these genes are significantly lower in the TCL group compared to the 12:12 group in mPFC, suggesting that this reduction in expression level is associated with loss of rhythmicity. Thus, this scheme, which simulates environmental contexts associated with suicidal behavior, affected the rhythmic expression of the Per2 and Bdnf genes, suggesting a temporal maladaptation of these structures to photoperiod variations in the model studied.

Key-Words: Biological Rhythms. Brain Derived Neurotrophic Factor. Seasonal Variation.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 Ritmos Biológicos	16
2.2 Mecanismos de sincronização	20
2.3 Sincronização à variação sazonal de fotoperíodo	23
2.4 Efeito da mudança de fotoperíodo na função cerebral	26
2.5 Neuroplasticidade como via potencial de regulação das adaptações fotoperiódicas	28
2.6 Regiões do cérebro associadas ao comportamento suicida possivelmente moduladas pelo fotoperíodo	31
3 OBJETIVOS	34
3.1 Objetivo geral	34
3.2 Objetivos específicos	34
4 MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1 Manutenção dos animais e protocolos de fotoperíodo	35
4.1.1 Procedimento cirúrgico	36
4.2 Extração de RNA total	36
4.3 Quantificação por espectrofotometria	38
4.4 Síntese de cdna	38
4.5 qPCR	39
4.6 Análise de dados	40
5 Resultados	42
5.1 Análise da expressão relativa de <i>PER2</i> no cérebro	42
5.2 Análise da expressão relativa de <i>BDNF</i> no cérebro	48
6 DISCUSSÃO	53
7 CONCLUSÕES	57
REFERÊNCIAS	58
ANEXOS	64
APÊNDICES	71

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Representação das propriedades de um ritmo..... 16
- Figura 2 - Representação esquemática simplificada do mecanismo molecular do sistema temporizador circadiano de mamíferos. Composto por alças de retroalimentação positivas e negativas. 19
- Figura 3 - Integração hierárquica da organização do sistema multioscilar envolvendo o sistema temporizador endógeno e as vias de sincronização através dos NSQs, além da presença de osciladores periféricos sincronizados por outras vias, como alimentação.....22
- Figura 4 - Expressão dos transcritos de *Per2* nas sub-regiões que formam o hipocampo (CA1, 2, 3 e Giro Denteado) (A) e em NSQs (B) . O RNAm está em antifase comparando as duas estruturas..... 23
- Figura 5 - Actogramas de atividade total de Hamsters mantidos em fotoperíodo natural durante um ano inteiro. As linhas curvas representam o nascer e o por do sol. A barra em preto refere-se à época reprodutiva da espécie. 24
- Figura 6 - Expressão de *Bdnf* e *Trkb* em hipocampo, sob fotoperíodo curto e longo ao longo de um ciclo diário. Em A perfil de expressão de *Bdnf* e B perfil de expressão de *Trkb*. 30
- Figura 7 - Esquema do modelo experimental, onde as barras brancas representam a duração da fase de claro e as pretas a duração da fase de escuro, para os grupos de diferentes regimes de fotoperíodo. No esquema são mostrados os momentos da coleta seriada. Números em negrito representam os dois ZTs estabelecidos para análise inicial em dois pontos. Regime de luz para os 5 grupos, com coleta em dois ZTs (ZT06 e ZT18). 36
- Figura 8 - Teste de eficiência dos iniciadores de *Per2* e *Bdnf*, utilizando 5 diluições, fator 1:2. 40
- Figura 09 - Níveis de RNAm de *Per2* avaliados em mPFC. As barras em branco representam o grupo de animais do ZT06 e as barras em cinza representam o ZT18. A análise dos dados entre o ZT 06 e o ZT18 foi feita através de teste t de student e entre os diferentes regimes de fotoperíodo através de ANOVA de uma via, utilizando a média do Cycle Threshold. 43
- Figura 10 - Níveis de RNAm de *Per2* avaliados em estriado. As barras em branco representam o grupo de animais do ZT06 e as barras em cinza representam o ZT18. A análise dos dados entre o ZT 06 e o ZT18 foi feita através de teste t de student e entre os diferentes regimes de fotoperíodo através de ANOVA de uma via, utilizando a média do Cycle Threshold. 44
- Figura 11 - Perfil da expressão diária de *Per2* em mPFC. Níveis de expressão de *Per2* em regime de 12:12 (C:E) e TCL. As análises são dos dados de 2 elevado a menos CT (Cycle Threshold) ajustados a curva cosseno. 45

Figura 12 - Perfil da expressão diária de Per2 em estriado. Níveis de expressão de Per2 em regime de 12:12 (C:E) e no regime TCL. As análises são dos dados de 2 elevado a menos CT (Cycle Threshold) ajustados a curva cosseno.....	46
Figura 13 - Comparação dos níveis de expressão do grupo 12:12 com o grupo TCL. A: Diferença entre os níveis dos transcritos de Per2 em mPFC. B: Diferença entre os níveis dos transcritos de Per2 em estriado. Análise por Teste t de student.	47
Figura 14 - Níveis de RNAm de Bdnf avaliados em mPFC e em estriado. As barras em branco representam o grupo de animais do ZT06 e as barras em preto representam o ZT18. A análise dos dados entre o ZT 06 e o ZT18 foi feita através de teste t de student e entre os grupos através de ANOVA de uma via.	48
Figura 15 - Níveis de RNAm de Bdnf avaliados em mPFC e em estriado. As barras em branco representam o grupo de animais do ZT06 e as barras em preto representam o ZT18. A análise dos dados entre o ZT 06 e o ZT18 foi feita através de teste t de student e entre os grupos através de ANOVA de uma via.	49
Figura 16 - Perfil da expressão diária de Bdnf em mPFC. Níveis de expressão em regime de 12:12 (C:E) e no regime TCL. As análises são dos dados de 2 elevado a menos CT (Cycle Threshold) ajustados a curva cosseno.	50
Figura 17 - Perfil da expressão diária de Bdnf em estriado. Níveis de expressão em regime de 12:12 (C:E) e no regime TCL. As análises são dos dados de 2 elevado a menos CT (Cycle Threshold) ajustados a curva cosseno.	51
Figura 18 - Comparação dos níveis de expressão do grupo 12:12 com o grupo TCL. A: Diferença entre os níveis dos transcritos de Bdnf em mPFC. B: Diferença entre os níveis dos transcritos de Bdnf em estriado. Análise por Teste t de student.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de qPCR, tamanho do amplicon resultante e resultado do teste de eficiência da reação.....	39
Tabela 2 - Diferença de expressão relativa (fold change) dos níveis de expressão de RNAm dos genes <i>Per2</i> e <i>Bdnf</i> em mPFC e estriado, comparando os níveis de expressão do ZT18 em relação ao ZT06 (utilizado como calibrador para todas as amostras do ZT06). *= p<0,005 para o teste t.....	52

1 INTRODUÇÃO

A cronobiologia é responsável pelo estudo sistemático da organização temporal da matéria viva. Os ritmos biológicos são essenciais na vida dos organismos e estão presentes em diversos níveis, perpassando todas as classes taxonômicas. Os ritmos biológicos são subdivididos de acordo com sua frequência e período de oscilação.

Os ritmos mais estudados tem sido os circadianos, aqueles com período de oscilação em torno de 24 horas (+/- 4 horas). Em mamíferos, os Núcleos Supraquiasmáticos (NSQs) constituem o marcapasso central da ritmicidade circadiana. Esta estrutura é responsável por receber os estímulos dos ciclos ambientais de claro escuro e, como resposta, sincronizar todo o organismo às condições ambientais, ou seja, ajustar as fases do ritmo ambiental ao ritmo endógeno do organismo. Estes ritmos são promovidos endogenamente por uma maquinaria molecular composta por alças de retroalimentação moleculares de ativação e inibição presentes em todas as células do organismo.

A sincronização dos ritmos biológicos resulta num ajuste de fase estável entre o ritmo ambiental e o ritmo endógeno dos organismos. A luz é o principal agente sincronizador de mamíferos. A informação luminosa é captada pela retina e transmitida pelo trato retino hipotalâmico ao NSQ, que coordena e sincroniza diferentes estruturas e tecidos, dentro e fora do sistema nervoso central, permitindo o ajuste de todos os relógios periféricos.

Os relógios periféricos são estruturas, áreas, tecidos, ou órgãos que são sincronizados através dos NSQs. Estão presentes em todo o organismo, inclusive no próprio encéfalo. Diferentes estruturas cerebrais têm sido descritas como relógios periféricos, sincronizados pelos NSQs, que recebem a informação via trato retino-hipotalâmico e através de vias neurais e humorais coordenam e regulam as informações para temporização dos relógios periféricos. Ao longo das estações do ano, a duração da fase de luz varia gradualmente e os relógios biológicos, central e periféricos, precisam ajustar-se diariamente para sincronização a estes ciclos geofísicos.

As variações sazonais de fotoperíodo estão associadas a variações metabólicas, padrão reprodutivo, perfil cognitivo e níveis de alguns neurotransmissores, como serotonina e dopamina. Diversas patologias têm sido associadas à sazonalidade, como doenças coronarianas, infecciosas e psiquiátricas. Dentre as doenças psiquiátricas com perfil sazonal e potencialmente moduladas pelo fotoperíodo estão a depressão, o transtorno bipolar, esquizofrenia, além do

comportamento suicida, que é, em 98% dos casos associado a distúrbios psiquiátricos, como os descritos anteriormente. Embora haja discrepância na literatura, a maior incidência de tentativa de suicídio e suicídio tem sido significativamente associada à primavera em diferentes populações, especialmente aquelas localizadas em latitudes mais distantes do Equador. Entretanto ainda não se sabe o que ocasiona esta sazonalidade. Alguns estudos têm demonstrado que o cérebro de pacientes que cometeram suicídio apresentam alteração morfológica em algumas estruturas como o *mPFC*, estriado, córtex orbito-frontal. Além disto, a dosagem pós-morte de neurotrofinas como *Bdnf* (Fator de Desenvolvimento Neurotrófico do Cérebro/ *Brain Derived Neurotrophic Factor*) demonstrou redução em córtex frontal e em hipocampo de indivíduos que cometeram suicídio. *Bdnf* é amplamente expresso em todo o cérebro e está diretamente associado à neuroplasticidade, diferenciação e desenvolvimento do sistema nervoso central. Os níveis séricos de *Bdnf* dosados em população holandesa demonstram uma variação sazonal dependente de fotoperíodo ao longo do ano, sugerindo que este gene poderia estar envolvido com a sazonalidade do suicídio. Entretanto, ainda não existem estudos sobre as bases neurobiológicas da sazonalidade do comportamento suicida.

Em modelos animais, alguns regimes de fotoperíodo induzem alterações, como disparo de neurônios serotoninérgicos e dopaminérgicos em diferentes áreas do cérebro. Todavia, os estudos que buscam compreender como as variações de fotoperíodo modulam as funções biológicas e comportamentais realizam experimentos com condições de fotoperíodo estáveis, ou seja, os animais são sincronizados durante vários dias a estes regimes. Estes protocolos não reproduzem a variação diária gradual do tempo de luz que ocorre em um ciclo sazonal e, portanto, não mimetizam, de fato, o que ocorre no ambiente natural.

A hipótese central deste trabalho é que variações de fotoperíodo modulam a expressão cíclica dos níveis de transcritos envolvidos com neuroplasticidade e com o sistema de temporização circadiano em regiões do cérebro previamente associadas ao comportamento suicida. Esta interferência do fotoperíodo poderia explicar o perfil epidemiológico sazonal observado para esta condição.

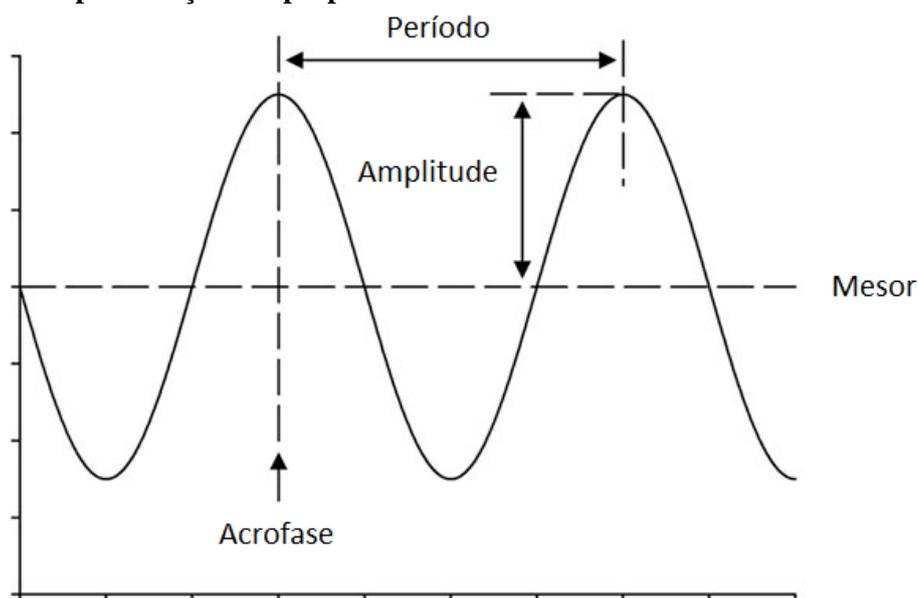
2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Ritmos biológicos

As interações da Terra com o Sol e com a Lua, associadas à inclinação do eixo terrestre, resultam nos ciclos de dia e noite, nas estações do ano, nas fases da lua, nas oscilações das marés. Estes ciclos geofísicos constituíram uma forte pressão seletiva na adaptação evolutiva das espécies e por isto são responsáveis pela organização temporal da matéria viva como a conhecemos, desde o movimento periódico diário das folhas de tamarindo observado por Andróstenes de Thasos em 325 a.C., até ritmos biológicos na atividade de abelhas, crustáceos, roedores e primatas (MARQUES; MENNA-BARRETO, 2003).

Ritmo biológico pode ser definido como um processo que varia periodicamente no tempo, ou seja, é a manifestação de um fenômeno que se repete com o mesmo período, possuindo algumas propriedades: período é o intervalo de tempo em que um ciclo se completa; fase refere-se a um momento determinado de um ciclo, que pode ser uma metade do ciclo, por exemplo a fotofase (fase de claro), ou a escotofase (fase de escuro) do ciclo claro/escuro; a amplitude de um ritmo é a diferença entre os valores máximo ou mínimo e médio (mesor) do ritmo (Figura 1) (MARQUES; MENNA-BARRETO, 2003).

Figura 1- Representação das propriedades de um ritmo.



Fonte: ALVES, 2013.

Ritmos biológicos estão presentes em diversos tipos celulares e diferentes organismos. Dependendo do período de oscilação, os ritmos biológicos podem ser classificados em ultradianos, quando são menores que 20 horas; infradianos, que são maiores que 28 horas; e em ritmos circadianos, que possuem períodos de aproximadamente 24 horas (± 4 horas).

São exemplos de ritmos ultradianos o fluxo iônico em membranas e o ritmo dos batimentos cardíacos (60 - 100 batimentos por minuto). Os ciclos infradianos podem ser exemplificados através do ciclo menstrual, normalmente com duração de 28 dias e ciclos circanuais, com período de ocorrência em torno de 365,24 dias. Os ritmos circanuais, são classificados como sazonais quando referem-se às estações do ano (BRENNAN et al., 1982). Portanto, as adaptações dos organismos a variações diárias de temperatura, fase de luz, disponibilidade de alimento ao longo de estações são expressas nos ciclos sazonais. De fato, a vida da maioria das plantas e animais é organizada com base em um calendário sazonal. Variações neste âmbito são identificadas em diversos aspectos, entre eles padrão reprodutivo, níveis de pressão arterial, perfil de ingestão alimentar, níveis de colesterol e perfil cognitivo (BRENNAN et al., 1982; FOSTER; ROENNEBERG, 2008; GORDON et al., 1987; MEYER et al., 2016).

Os ritmos circadianos são os mais estudados e estão presentes em diversas características, fisiológicas ou comportamentais, representadas por modificações da expressão gênica, variação nos níveis hormonais como melatonina e cortisol, comportamento reprodutivo, ciclo celular, pressão sanguínea, performance cognitiva, temperatura corporal, comportamento alimentar, ciclo vigília e sono em humanos, atividade e repouso em roedores, entre diversos outros (HASTINGS; REDDY; MAYWOOD, 2003; ALBRECHT, 2012; DIBNER; SCHIBLER; ALBRECHT, 2010; MARQUES; MENNA-BARRETO, 2003).

Os ritmos circadianos/diários são observáveis em diversas classes de organismos desde unicelulares, como as cianobactérias, fungos, como o *Neurospora crassa*, invertebrados, como *Drosophila melanogaster*, e em mamíferos, perpassando diversas ordens e classes, como roedores (*Rattus Novergicus*, *Mus musculus*, *Octon degus*) e primatas (*Callithrix jacchus*, *Homo sapiens*) (SILVA; ALBUQUERQUE; ARAUJO, 2005). Cada classe de organismo possui diferentes mecanismos de coordenação e adaptação temporal destes ritmos, que mantêm similaridades evolutivas conservadas (ARELLANES-LICEA et al, 2014; PANDA, HOGENESCH, KAY, 2002; ZYLKA et al., 1998).

Os ritmos biológicos possuem diversas características, dentre elas a endogenicidade, ou seja, a persistência de um ritmo mesmo na ausência de pistas ambientais (livre curso). Quando um organismo está em livre curso, seu período torna-se ligeiramente diferente daquele exibido em condições naturais no ambiente. Este período é representado pela letra grega T (Tau), e é característico de cada espécie (ALBRECHT et al, 2012). Embora endógenos, os ritmos biológicos mantêm estreita relação com os ritmos ambientais, em resposta aos eventos cíclicos presentes no meio, como variações diárias de fotoperíodo (ASCHOFF, 1965; PITTENDRIGH, C. S, 1960). Estes fatores cíclicos que promovem a sincronização dos ritmos biológicos são denominados de Zeitgebers, termo alemão que significa ‘doador de tempo’, ou seja, agente sincronizador. São exemplos de Zeitgebers os ciclos ambientais de claro/escuro, ciclos de disponibilidade de alimentos, ciclos de atividade social, dentre outros (ASCHOFF, J. 1960). Cada um destes fatores possui forte papel enquanto agentes sincronizadores.

A persistência da ritmicidade circadiana em ambientes mantidos constantes, bem como a adaptação dos ritmos a fatores externos ambientais evidenciam a existência de um sistema temporizador que mantém os diferentes ritmos biológicos (MOORE, R.Y, 1997). Desta forma, diz-se que um ritmo é verdadeiramente circadiano quando ele persiste em condições constantes e, quando estão sincronizados a fatores externos ambientais, são então considerados ritmos diários.

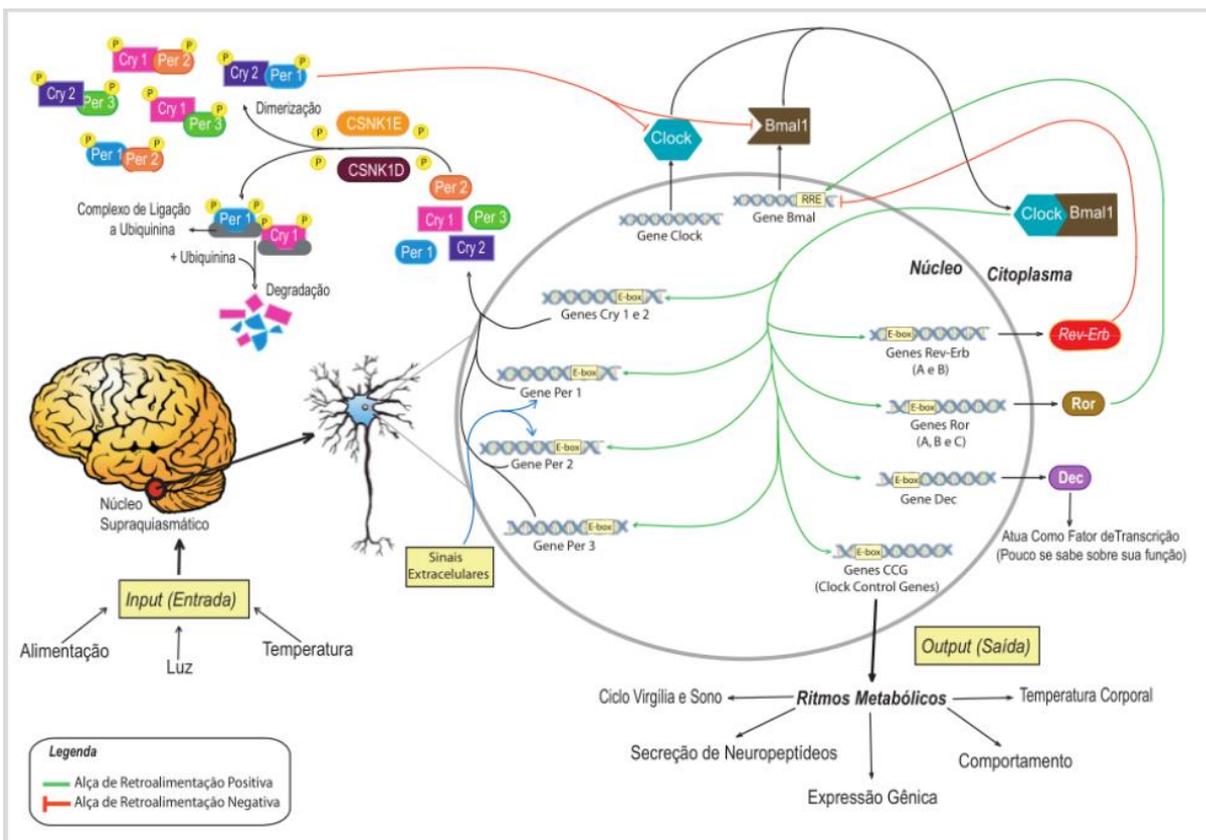
Para compreender a manutenção dos ritmos biológicos em mamíferos é imprescindível conhecer o sistema temporizador que gera e mantém esta ritmicidade. É conhecido e amplamente aceito que, em mamíferos, os NSQs constituem o marca-passo central da ritmicidade circadiana, e regula todo o sistema temporizador. São compostos por um par de conglomerados de cerca de 20.000 neurônios, sendo cada um dos núcleos com 10.000 células neurais e uma grande quantidade de células gliais, localizados no hipotálamo ventral anterior, dorsal ao terço caudal do quiasma óptico, rostral às comissuras supra-ópticas e ventrolateral ao III ventrículo. Podem ser divididos, anatomicamente e funcionalmente, em duas subdivisões distintas: A subdivisão ventrolateral também denominada de Core e a região dorsomedial, também denominada de Shell (MARQUES; MENNA-BARRETO, 2003; COLWELL, 2011).

Estes núcleos regem a ritmicidade circadiana em mamíferos, sincronizando todo o restante de um organismo às condições ambientais em diferentes níveis, desde o fisiológico ao comportamental. Os NSQs integram a informação de maneira sistêmica e esta atividade é fundamental para sobrevivência do sistema biológico no que se refere à adaptação do organismo

ao ambiente e a sua sobrevivência enquanto espécie no que tange ao aspecto reprodutivo (BUIJS et al., 2006).

A nível molecular, os ritmos biológicos são mantidos por uma maquinaria composta, fundamentalmente, por alças de retroalimentação transcricionais-traducionais (REPPERT; WEAVER, 2002). O cerne deste processo consiste em genes centrais da regulação do sistema temporizador circadiano e pode ser representado por uma via cíclica, onde as proteínas CLOCK e BMAL1 atuam como reguladores positivos, ativando a transcrição dos genes Per (1, 2 e 3) e Cry (1 e 2). As proteínas PER e CRY são fosforiladas, formam heterodímeros e atuam inibindo CLOCK-BMAL1 no núcleo celular, ou seja, reprimindo a sua própria transcrição (GUILDING; PIGGINS, 2007) (Figura 2).

Figura 2 - Representação esquemática simplificada do mecanismo molecular do sistema temporizador circadiano de mamíferos. Composto por alças de retroalimentação positivas e negativas.



Fonte: FIGUEREDO, D.S, 2016 (Não publicado).

Além destes genes descritos, outros merecem destaque, como os genes das caseínas quinases (CKIs), que codificam enzimas envolvidas na fosforilação cíclica de proteínas centrais da maquinaria molecular circadiana (LOWREY; TAKAHASHI, 2004). Além disto, a

maquinaria circadiana é responsável pela regulação global do transcriptoma, através de modificações do estado da cromatina e do recrutamento cíclico da RNA polimerase (AGUILAR-ARNAL; SASSONE-CORSI, 2014). De fato, estudos recentes tem demonstrado através de análises em larga escala, que grande porcentagem do transcriptoma varia circadianamente em diferentes tecidos (ZHANG et al., 2014). Outros mecanismos pós-transcricionais também participam da regulação molecular dos ritmos circadianos, como a regulação dos níveis de transcritos por microRNAs (BECKWITH; YANOVSKY, 2014).

Os genes que compõe a maquinaria molecular não são expressos exclusivamente nos NSQs, mas também apresentam expressão rítmica em diversos tecidos como fígado, rins, sangue periférico, e em diferentes áreas do encéfalo como neocórtex, córtex cerebelar, bulbo olfatório, amígdala, habênula, e uma variedade de núcleos do hipotálamo (GUILDING; PIGGINS, 2007; RATH; ROVSING; MØLLER, 2014). Entretanto, as fases de expressão destes genes variam entre os órgãos, com um atraso de 3 a 9 horas em relação ao NSQ(YAMAZAKI, 2000). Vale ressaltar que os NSQs coordenam as fases de diferentes processos, como eventos moleculares nos osciladores periféricos(RATH; ROVSING; MØLLER, 2014). Assim, os NSQs tem sua atividade ajustada aos Zeitgebers, gerando uma ordem temporal interna pela sincronização dos demais osciladores.

2.2 Mecanismos de Sincronização

Colin Pittendrigh e Jurgen Aschoff foram pioneiros na pesquisa de como processos biológicos promovem ou auxiliam na adequação do sistema de temporização circadiano ao ambiente. Estes autores definiram os conceitos fundamentais das relações temporais entre os organismos e seu ambiente. Os experimentos realizados por Pittendrigh determinaram as bases do que atualmente é conhecido como sincronização, envolvendo os aspectos circadianos e sazonais (SAHAR; SASSONE-CORSI, 2013; MARQUES; MENNA-BARRETO, 2003, pg. 62; PITTENDRIGH, 1993).

Sincronização é a manutenção de relação de fase estável entre ciclos, podendo ocorrer através de arrastamento ou mascaramento. O arrastamento é o ajuste temporal de um ritmo por um outro ritmo. Ocorre quando o organismo está ajustado ao ciclo ambiental, como por exemplo, o ajuste da atividade e repouso em resposta ao ciclo de claro e escuro. Quando um ritmo está sincronizado por arrastamento, ele possui uma relação de fase estável com o ciclo ambiental ou ciclo arrastador. Já o mascaramento é a modificação da resposta de um ritmo,

aumentando ou diminuindo sua amplitude. O mascaramento pode ser promovido por um agente externo ou do próprio sistema biológico (MARQUES; MENNA-BARRETO, 2003, pg. 362).

Em mamíferos, o processo de adaptação temporal, mediado pelo sistema temporizador, também denominado de relógio biológico, é determinado por mecanismos de sincronização, que permitem aos organismos a capacidade de antecipação aos eventos ambientais, como preparação para a disponibilidade de alimento, perfil de atividade e repouso em resposta à presença do predador no ambiente, preparação para reprodução, hibernação, entre outros aspectos (BUIJS et al., 2016). Além da antecipação, a adaptação temporal consiste na harmonização das fases dos ritmos com os ciclos ambientais (MARQUES; MENNA-BARRETO, 2003, pg. 60).

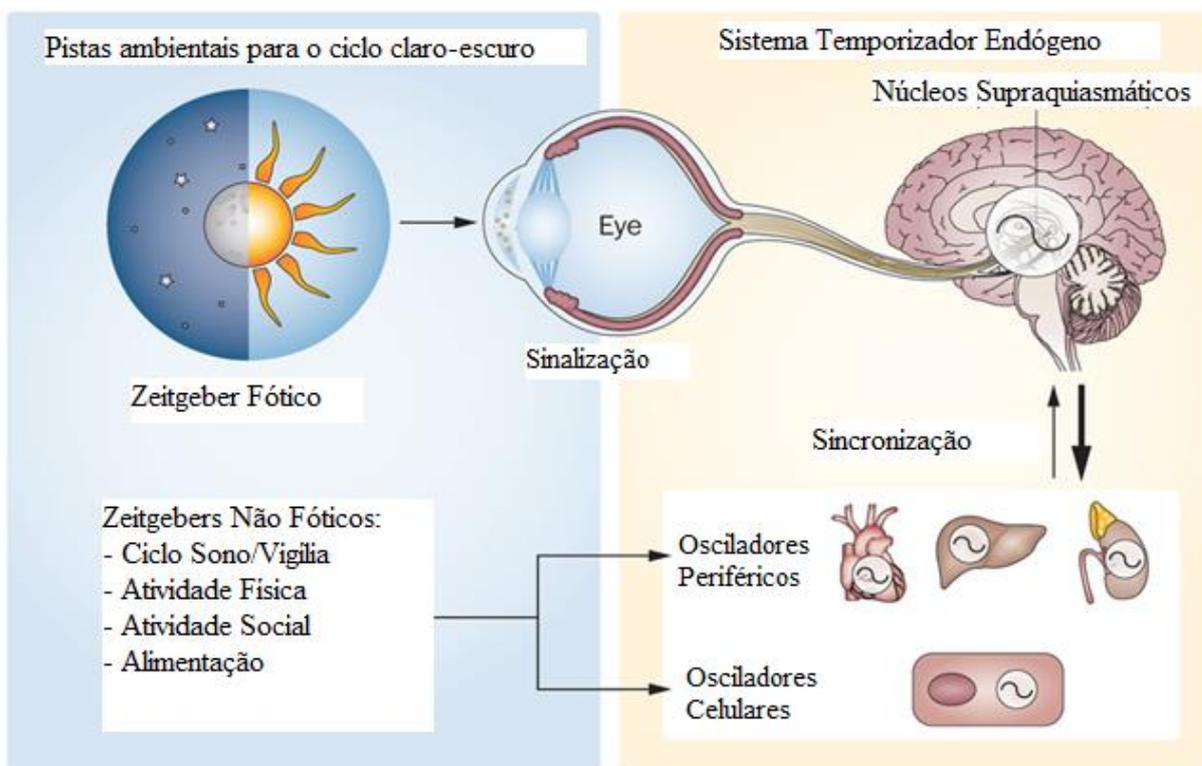
Para que o sistema temporizador atue de maneira eficiente na sincronização do organismo ao ambiente, é importante que ele esteja hierarquicamente organizado para que possa ser sincronizado por diferentes *Zeitgebers*. A sincronização não fótica por ciclos sociais parece depender de diferentes regiões do cérebro de roedores como, por exemplo, folheto intergeniculado do tálamo e dos bulbos olfatórios (GOEL; LEE; PIEPER, 1998; LEWANDOWSKI; USAREK, 2002). A oferta alimentar cíclica também desempenha um papel temporizador, gerando uma espécie de “memória temporal”, de forma que em roedores noturnos, há uma antecipação ao momento da oferta alimentar cíclica, com aumento da atividade locomotora e elevação de temperatura corpórea (BOULOS; TERMAN, 1980).

Por sua vez, a sincronização fótica é a principal via correlata com os ciclos geofísicos de claro/ escuro e demonstra como a luz é capaz de sincronizar o organismo. Através de uma arquitetura hierárquica e especializada do relógio biológico central, a informação luminosa, é detectada primariamente pelas células ganglionares presentes na retina e então transmitida através dos axônios do trato retino-hipotalâmico aos NSQs. Esta informação elétrica é convertida em sinal químico que irá alterar o padrão de manifestação de diversos fenótipos, de forma que a observação do ajuste de fase é perceptível no comportamento de atividade e repouso, em níveis hormonais e na expressão gênica, por exemplo (ALBRECHT, 2012; GUO et al., 2006) (Figura 3).

Para compreender o funcionamento dos NSQs como estrutura central do sistema temporizador circadiano, é importante considerar que cada neurônio que o compõe atua como um oscilador independente, que gera variação circadiana em sua atividade elétrica. O

acoplamento destas células resulta na organização temporal de todo o organismo, que sincroniza os relógios periféricos presentes em diversas células, tecidos e órgãos, como fígado, glândula adrenal, pâncreas, adipócitos, entre outros, a fim de que os tecidos estejam numa relação estável de fases (DIBNER; SCHIBLER; ALBRECHT, 2010; WELSH, D. K et al, 1995) (Figura 3).

Figura 3 - Integração hierárquica da organização do sistema multioscilar envolvendo o sistema temporizador endógeno e as vias de sincronização através dos NSQs, além da presença de osciladores periféricos sincronizados por outras vias, como alimentação.



Nature Reviews | Rheumatology

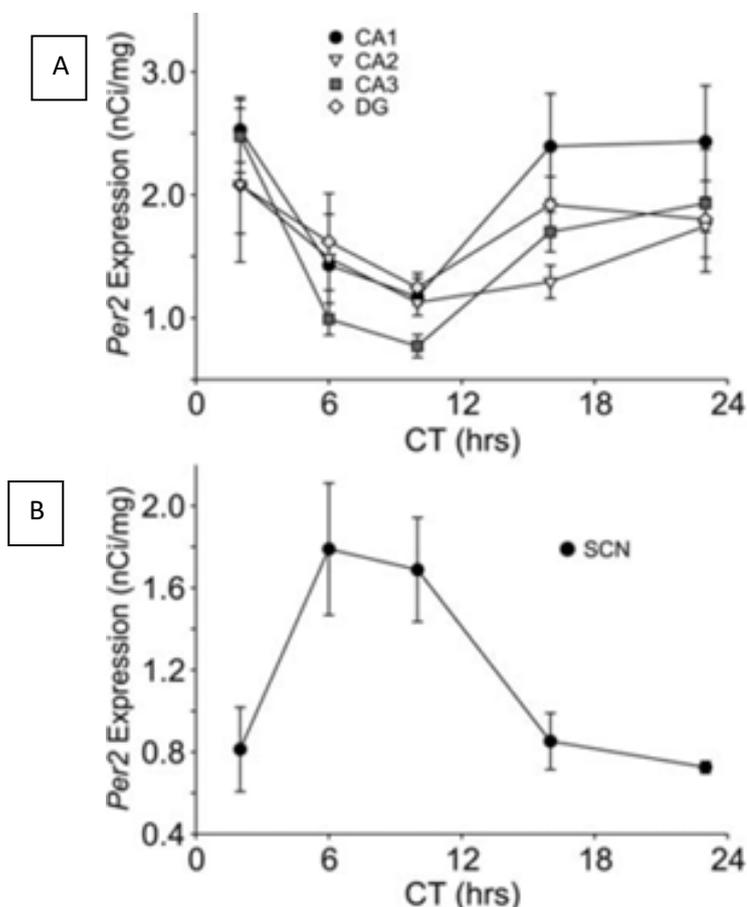
Fonte: Adaptado de BUTTGEREIT et al., 2015.

Diferentes regiões do encéfalo apresentam padrão rítmico de atividade elétrica, dentre elas destacam-se: bulbo olfatório, núcleo caudado (parte do estriado) e acúmbens, área pré-óptica, núcleo paraventricular do hipotálamo, habênula, córtex visual, rafe, entre outros (GUILDING; PIGGINS, 2007). Em cada área, a expressão rítmica pode apresentar uma fase própria, mesmo sendo sincronizadas pelos NSQs por projeções diretas ou por outras vias.

Em ratos, por exemplo, os níveis de *Per2* foram quantificados em hipocampo e NSQs e mostram uma diferença entre a fase de expressão (Figura 4) (WANG et al., 2009). Esta

diferença pode ser, inclusive, dentro de uma mesma área, em diferente sub-regiões, variando a amplitude ou a fase.

Figura 4 - Expressão dos transcritos de *Per2* nas sub-regiões que formam o hipocampo (CA1, 2, 3 e Giro Denteado) (A) e em NSQs (B) . O RNAm está em antifase comparando as duas estruturas.



Fonte: WANG et al., 2009

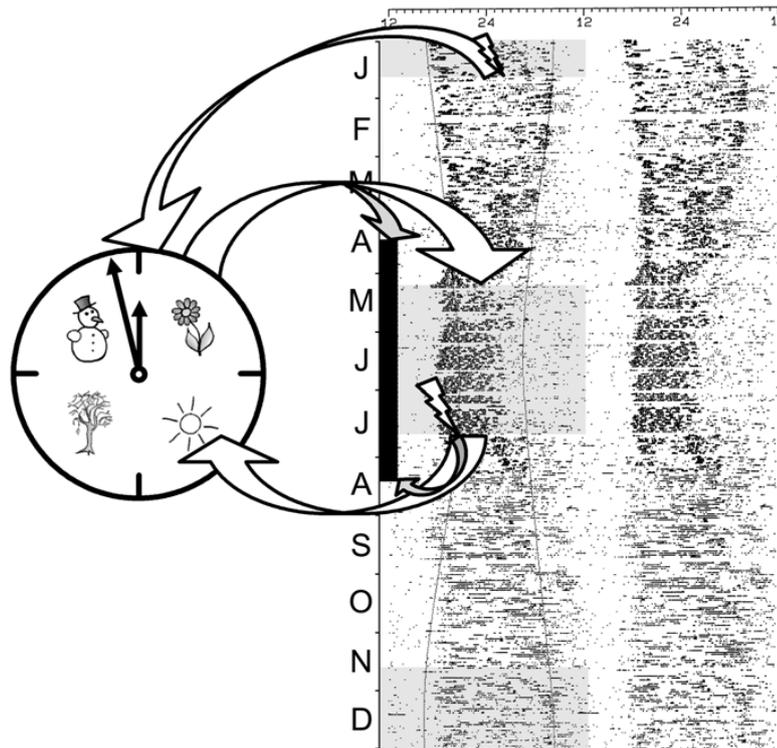
2.3 Sincronização à variação sazonal de fotoperíodo

Fotoperíodo pode ser definido como o número de horas da fotofase em um ciclo claro/escuro (NUMATA, H; HELM, 2014). O fotoperíodo é a principal via ambiental utilizada pelos organismos para determinar o comprimento do dia ao longo do ano e coordenar adaptações sazonais (PYTER; READER; NELSON, 2005). O verão, por exemplo, é característico pela presença de dias longos e noites curtas (fotoperíodo longo), diferente do inverno, onde há dias curtos e noites longas (fotoperíodos curtos).

É importante estabelecer a distinção entre respostas fotoperiódicas e respostas circadianas. Apesar de estes dois fenômenos normalmente utilizarem os mesmos mecanismos

para estabelecer e informar ao restante do organismo sobre o comprimento do dia, estes distinguem-se da seguinte forma: os ritmos circadianos, como já caracterizados, possuem período de oscilação em torno de 24 horas, já o fotoperiodismo está intrinsecamente relacionado a períodos anuais ou sazonais. O fotoperiodismo utiliza o ciclo anual do comprimento dos dias, com diferentes fotoperíodos, para ajustes fisiológicos e comportamentais às variações sazonais (GOLDMAN, 2001). Assim, não é correto rotular um organismo como fotoperiódico apenas por que ele se arrasta às condições luminosas às quais for submetido, ou seja, sincronizado. Na figura 5 é possível observar o efeito de diferentes fotoperíodos ao longo de um ano no perfil de atividade total de hamsters. Nestes animais, a fase reprodutiva é iniciada quando estes estão em fotoperíodo curto, possuindo assim um fotoperiodismo (NUMATA, H; HELM, 2014).

Figura 5 - Actogramas de atividade total de Hamsters mantidos em fotoperíodo natural durante um ano inteiro. As linhas curvas representam o nascer e o por do sol. A barra em preto refere-se à época reprodutiva da espécie.



Fonte: NUMATA, H; HELM, 2014.

Pesquisas indicam que o fotoperíodo modula os ritmos diários através dos NSQs, que geram sinais do comprimento do dia em resposta a estimulação recebida via trato retino hipotalâmico (HOFMAN; SWAAB, 2002; BRONSON, 2004). Recentemente, tem sido mostrado que os NSQs apresentam perfil rítmico sazonal nos níveis de neurotransmissores e na morfologia, de forma que as células que compõe os NSQs percebem o comprimento do dia e

guiam as mudanças sazonais ajustando outras vias e outras estruturas para adaptação as mudanças sazonais (COOMANS; RAMKISOENSING; MEIJER, 2015).

Diversas evidências apontam para a melatonina como um importante mediador de regulação deste calendário sazonal, através da regulação fótica da glândula pineal pelos NSQs (BRONSON, 2004), que atua comunicando a informação fotoperiódica a vários órgãos em todo o corpo (REFINETI, 2006).

Entretanto, ainda não há um consenso sobre qual estrutura é sede do relógio biológico sazonal. Sabe-se que diferentes estruturas do cérebro recebem projeções diretas do trato retino-hipotalâmico, como por exemplo a área pré-óptica medial, os núcleos paraventricular, periventricular e dorsomedial, além da área hipotalâmica anterior (REUSS; FUCHS, 2000), sugerindo que estas estruturas poderiam ser moduladas diretamente pelo fotoperíodo.

Alterações sazonais possuem importante impacto na população humana e foram identificadas em diferentes níveis. Dosagens de colesterol na população norte americana(EUA), avaliados através de uma amostra de 1446 voluntários com níveis séricos de hipercolesterol, mostram níveis mais altos durante a metade do verão e mais baixos durante a primavera (GORDON et al., 1987). Outro estudo mostrou que a pressão arterial é mais alta durante o inverno do que no verão (BRENNAN et al., 1982).

Diversas doenças têm sido diretamente associadas à sazonalidade, como doenças cardiovasculares (PELL; COBBE, 1999), autoimunes (IHKUNI et al., 2007) e infecciosas (PASCUAL; DOBSON, 2005). Alguns distúrbios psiquiátricos também apresentam perfil sazonal, como o Transtorno Afetivo Sazonal (*Seasonal Affective Disorder – SAD*) (EAGLES; SHAND, 2015; MCCLUNG, 2007; PATTEN et al., 2016), que recebe este nome por manifestar-se preponderantemente durante o inverno. Dois programas nacionais no Canadá entre 1996 e 2013, identificaram que 70% dos casos de depressão ocorreram entre os meses dezembro, janeiro e fevereiro, equivalentes ao inverno, comparativamente aos meses de junho, julho e agosto (PATTEN et al., 2016). Além disto, 70% da de uma amostra da população finlandesa apresenta variação sazonal no tempo de duração de sono, atividade social, humor e 40% apresenta variação sazonal no peso corporal e apetite (BASNET et al., 2016).

Incidência dos casos de mania, associados ao transtorno bipolar, avaliados por admissão hospitalar, apresenta maior pico durante a primavera e menor durante o verão (CASSIDY; CARROLL, 2002). Em uma amostra da população brasileira, em Belo Horizonte, foi observado

que a maioria dos casos de internação por mania ocorre durante o final do inverno e início da primavera (VOLPE et al., 2010). Além disso, existem várias evidências epidemiológicas indicando maiores taxas de tentativa de suicídio e suicídio completo durante a primavera, embora outras estações tenham sido também associadas (CHRISTODOULOU et al., 2012). Recentemente, em uma revisão sistemática e metanálise, demonstramos que, em diferentes populações, as tentativas de suicídio são mais elevadas durante a primavera, independente de sexo e método utilizado, sugerindo um forte componente ambiental modulador do comportamento suicida (COIMBRA et al., 2016). Um estudo na Finlândia demonstrou uma relação entre a sazonalidade do suicídio e o comprimento dos dias ao longo das estações, de forma que o pico da mortalidade por suicídio foi detectado entre os dias 15 de maio e 25 de julho, período em torno do solstício de verão (HILTUNEN et al., 2011).

As variações no tempo de exposição à luz solar em latitudes crescentes tem sugerido uma explicação para a sazonalidade na mortalidade por suicídio. Em um estudo realizado no Chile em quatro latitudes, foi identificada elevação significativa da mortalidade por suicídio durante a primavera, entretanto quando as regiões foram analisadas separadamente, observou-se que na zona de baixa latitude não houve diferença significativa nos dados de suicídio, endossando a hipótese do impacto que o fotoperíodo possui para estes casos (HEERLEIN; VALERIA; MEDINA, 2006). No Brasil, o perfil epidemiológico de comportamento suicida também tem sido relatado com pico durante a primavera, em diferentes latitudes (BENEDITO-SILVA; PIRES; CALIL, 2007).

A estação de nascimento também foi descrita como um fator de risco para sazonalidade do suicídio e outros transtornos psiquiátricos, como esquizofrenia, transtorno bipolar e desordem depressiva recorrente (DISANTO et al., 2012; ROCK; GREENBERG; HALLMAYER, 2006), o que sugere um efeito de variações sazonais ambientais presentes durante o desenvolvimento inicial humano.

Estes exemplos enfatizam a importância dos estudos acerca do efeito do fotoperíodo na adaptação sazonal do organismo, que, em alguns casos, manifesta-se em diversas patologias.

2.4 Efeito da mudança de fotoperíodo na função cerebral

Diversos trabalhos demonstram o efeito da variação sazonal de fotoperíodo na função cerebral. Algumas áreas do encéfalo têm sua fisiologia, morfologia e expressão gênica reguladas em resposta a variação sazonal de fotoperíodo. Esta modulação tem sido bem descrita

em espécies de aves, como em *Serinus canarius*, que apresentam alterações em núcleos cerebrais envolvidos com o controle do canto. Esta alteração parece estar envolvida com o perfil reprodutivo da espécie (TRAMONTIN; BRENOWITZ, 1999).

Estudos revisados por Ferguson e Maier (2013) com roedores tem demonstrado que variação nos regimes de fotoperíodo tem efeito sobre o nível de atividade locomotora em algumas linhagens de camundongos (C57BL/6, CBA/J, *Swiss*) e na aprendizagem e retenção de memória do tipo associativa. Os níveis de ansiedade, avaliados pelo teste de labirinto em cruz elevado, e o comportamento depressivo avaliado por nado forçado em ratos também apresentam resposta a variação fotoperiódica (FERGUSON; MAIER, 2013).

Mudanças decorrentes da variação de fotoperíodo têm sido descritas na alteração de volume de algumas estruturas cerebrais e neurogênese de algumas espécies de roedores adultos, como *Clethrionomys glareolus*, *Sorex araneus*, *Sorex minutus*, *Peromyscus leucopus* (BARTKOWSKA et al., 2008; IASKIN, 2011; PYTER; READER; NELSON, 2005),

Recentes estudos tem demonstrado redução na proliferação celular em zona subventricular de ovelhas submetidas a fotoperíodo longo (verão), comparado com o fotoperíodo curto (inverno) em zona subventricular, além do padrão de migração de neuroblastos no hipotálamo em fotoperíodo longo (BATAILLER et al., 2015; MIGAUD et al., 2011).

Em outras áreas, como núcleos da rafe, foi observado que camundongos sob fotoperíodo longo (16:08) apresentam elevação na taxa de disparo em neurônios serotoninérgicos, comparados a animais submetidos à fotoperíodo curto (08:16)(GREEN et al., 2015). Este efeito do fotoperíodo em funções cerebrais envolvidas com produção de serotonina, neurotransmissor precursor do neurohormônio melatonina, indica um potencial efeito do fotoperíodo em comportamentos afetivos dependentes desta monoamina.

Recentemente, Dulcis et al., (2013) demonstraram que o fotoperíodo regula o número de neurônios dopaminérgicos em núcleos do hipotálamo de ratos wistar. Foi observado que o número de neurônios reativos a tirosina hidroxilase reduz quando os animais são expostos a fotoperíodos longos (19:05) e aumenta quando submetidos a fotoperíodos curtos (05:19) em área lateral pré-optica e nos núcleos para e periventriculares (DULCIS et al., 2013).

Em amígdala basolateral e área infra límbica, envolvida com o processamento de emoções de *Peromyscus leucopus* expostos por dez semanas a um fotoperíodo curto, observou-se um aumento na densidade de botões dendríticos, não afetando a morfologia de neurônios piramidais da região infra límbica do *mPFC* medial, envolvido diretamente com tomada de decisão e controle motor (WALTON et al., 2014). Em outro estudo que avaliou o volume hipocampal e a morfologia dendrítica em *Peromyscus leucopus*, conhecido como camundongo de patas brancas, foi observado um decréscimo da massa desta região, uma redução na densidade de botões dendríticos em animais mantidos sob fotoperíodo curto (08:16) (PYTER; READER; NELSON, 2005).

O hipocampo, que é uma das estruturas mais plásticas do cérebro adulto e está intrinsecamente envolvido com comportamentos emocionais, função cognitiva, processamento de memórias e aprendizado, sofre interferência da mudança de fotoperíodo. A arquitetura neural própria desta estrutura apresenta aumento da neurogênese em *Peromyscus leucopus* submetidos a 10 semanas de fotoperíodo curto (08:16) (WALTON et al., 2014).

Em humanos, a atividade cerebral, avaliada por ressonância magnética funcional, em diferentes regiões do encéfalo envolvidas com performance cognitiva, varia ao longo das estações (MEYER et al., 2016), incluindo córtex frontal. Em um estudo transversal, a avaliação de volume hipocampal, também avaliado por ressonância magnética, foi maior durante o fotoperíodo longo (verão) em diferentes etnias (MILLER et al., 2015).

Estes estudos indicam que o fotoperíodo pode modular a função cerebral. Entretanto, ainda não está claro como este processo ocorre, quais moléculas estão envolvidas e quais estruturas cerebrais podem ser afetadas.

2.5 Neuroplasticidade como via potencial de regulação das adaptações fotoperiódicas

A neuroplasticidade é característica marcante e constante na função cerebral, resultando em resposta adaptativa contínua ao longo da vida de mamíferos. Algumas evidências apontam para a modulação fotoperiódica na neuroplasticidade do cérebro de mamíferos. Entretanto, ainda existem lacunas sobre quais mecanismos levam a estas mudanças morfológicas e comportamentais em resposta a variação fotoperiódica.

Genes centrais da maquinaria molecular circadiana são associados a processos que envolvem neuroplasticidade, como por exemplo o papel de *Per1* na aprendizagem e consolidação de memória associativa de longo prazo em camundongos (RAWASHDEH et al., 2014). A maquinaria molecular circadiana ainda participa da regulação da neurogênese hipocampal em camundongos, de forma que *PER2* e *BMAL* são responsáveis pelo controle do tempo do ciclo celular na zona subgranular (BOUCHARD-CANNON et al., 2013).

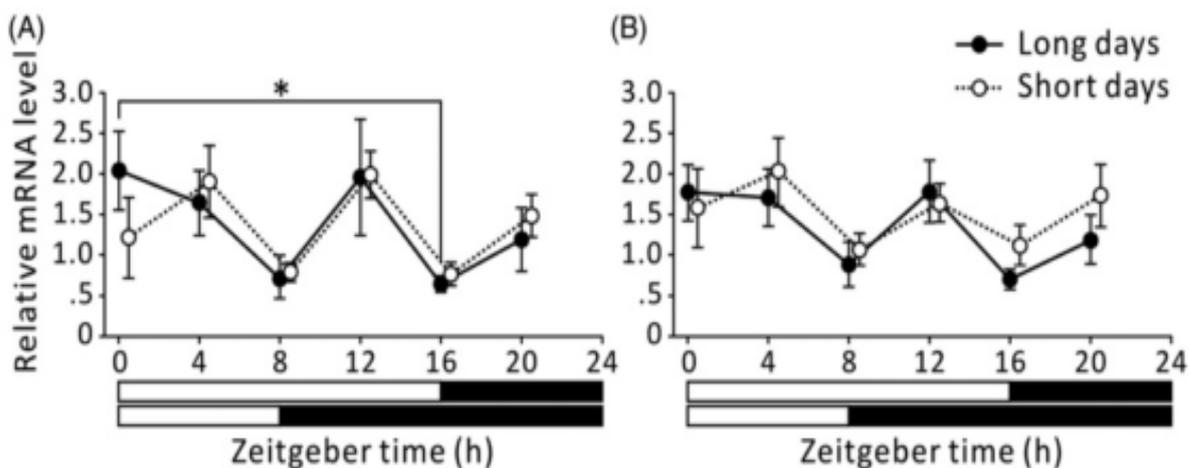
O processo de sincronização do sistema temporizador à variações fotoperiódicas sazonais, consiste em um ajuste diário da fase de luz ao sistema temporizador circadiano. A expressão de genes centrais da maquinaria molecular circadiana (*Per1*, *2 e 3*, *Cry 1 e 2*, *Bmal1* e *Clock*), possui diferentes respostas em NSQs de hamsters submetidos a diferentes fotoperíodos. Quando os animais foram submetidos a fotoperíodos curtos, foi detectado um encurtamento de fase e redução de amplitude no pico de expressão dos genes *Pers* e *Crys* em relação aos animais submetidos a fotoperíodo longo. Além disto, ainda foram observados um avanço de fase em *Per1*, *Per3* e *Cry1*, indicando um mecanismo molecular que apresenta respostas a variações fotoperiódicas (TOURNIER et al., 2003). *Per2*, é um gene central no sistema de temporização circadiano, que é amplamente expresso em inúmeros tecidos periféricos e áreas corticais e subcorticais envolvidas no controle motor, função cognitiva e tomada de decisão.

Além dos genes circadianos, *Bdnf*, que, como outros fatores de crescimento do sistema nervoso, está intrinsecamente envolvido com crescimento, diferenciação e sobrevivência de neurônios, poderia participar da resposta fotoperiódica. *Bdnf* está envolvido em potenciação de longa duração e depressão de longa duração. Em NSQ, este gene apresenta variação circadiana nos níveis de transcrito e proteína (LIANG; ALLEN; EARNEST, 2000). Esta variação também tem sido demonstrada em outras regiões do sistema nervoso central, como hipocampo e córtex frontal (DOLCI et al., 2003). A expressão de *Bdnf* e seu receptor *Trkb* (*Tropomyosin receptor kinase B*) é mais elevada no início da fase de claro do que no início da fase de escuro em hipocampo de hamsters submetidos a fotoperíodo longo (IKENO; WEIL; NELSON, 2013) (Figura 6).

Bdnf está localizado no cromossomo 11p13 (GRATACÒS et al., 2007) e polimorfismos neste gene tem sido associados a desordens psiquiátricas, como Alzheimer e esquizofrenia, incluindo desordens dependentes de substâncias psicoativas (CHANG et al., 2014). Em análise pós morte de indivíduos que cometeram suicídio, os níveis de *Bdnf* em hipocampo e em *mPFC*

foram reduzidos em comparação a indivíduos que morreram por outras causas (BANERJEE et al., 2013). Além disto, os níveis das neurotrofinas *Bdnf* e *NT-3* apresentaram correlação negativa com o risco para suicídio, ou seja em pacientes que tentaram suicídio a dosagem destas proteínas foi reduzida quando comparadas a de indivíduos controle (PRIYA et al., 2016). Outro estudo, entretanto, não encontrou associação entre os níveis séricos de *Bdnf* em pacientes que tentaram suicídio e indivíduos controle (EISEN et al., 2016). Na Holanda, um estudo realizado com 2.851 pessoas demonstrou que a dosagem sérica de *Bdnf* apresenta variação sazonal, de forma que a concentração de *Bdnf* é crescente durante a primavera ao verão e descrece do outono ao inverno (MOLENDIJK et al., 2012).

Figura 6 - Expressão de *Bdnf* e *Trkb* em hipocampo, sob fotoperíodo curto e longo ao longo de um ciclo diário. Em A perfil de expressão de *Bdnf* e B perfil de expressão de *Trkb*.



Fonte: IKENO; WEIL; NELSON, 2013.

As mudanças de fotoperíodo que ocorrem na natureza são contínuas e graduais, sendo mais acentuadas em latitudes mais distantes da linha equatorial. Entretanto, os protocolos realizados em laboratório com roedores utilizam regimes de fotoperíodo constantes, ou seja, que mantêm os animais sincronizados ao fotoperíodo curto ou longo por alguns dias. Embora reproduzam condições de fotoperíodo distintas, estes protocolos não mimetizam, de fato, as variações sazonais ambientais às quais os organismos são submetidos constantemente. Recentemente, um estudo demonstrou o efeito da alternância gradual de fotoperíodo em ratos nos níveis de cortisol e melatonina, demonstrando que uma transição gradual de um fotoperíodo a outro poderia melhor simular as variações ambientais, permitindo uma melhor compreensão da adaptabilidade dos organismos às estações (QUILES et al., 2016).

2.6 Regiões do cérebro associadas ao comportamento suicida possivelmente moduladas pelo fotoperíodo

Estudos epidemiológicos têm revelado que em ambientes com maior variação sazonal apresenta casos de tentativa e concretização do ato suicida com maior incidência durante a primavera, em diferentes populações (COIMBRA et al., 2016; HEERLEIN; VALERIA; MEDINA, 2006), de forma que quanto mais distante da linha do equador, mais significativa é a sazonalidade e a taxa de suicídio. Além disto, a estação de nascimento tem sido observada enquanto fator de risco para o desenvolvimento de alguns transtornos psiquiátricos associados como esquizofrenia e transtorno bipolar, além da ideação suicida (DISANTO et al., 2012; ROCK; GREENBERG; HALLMAYER, 2006).

A busca por identificar áreas cerebrais envolvidas no comportamento suicida, tem revelado alterações em áreas específicas, demonstrando que o *mPFC* e o estriado parecem ter um papel importante. O *mPFC*, localizado anteriormente aos lobos frontais, está diretamente envolvido com o gerenciamento das funções executivas e da memória de trabalho. Tem um papel significativo no estado de alerta e emoções. Também contribui para tarefas específicas, como a recompensa comportamental, atenção, aprendizagem e memórias específicas (MORAES, 2009). Um grande número de distúrbios neurológicos e psiquiátricos, em diferentes faixas etárias, envolve, primária ou secundariamente, alterações desta região cortical ou de outras áreas cerebrais altamente relacionadas ao *mPFC*. Esquizofrenia e depressão são exemplos de distúrbios psiquiátricos que demonstram comprometimento desta região (MINZENBERG et al., 2015).

Em pacientes que cometeram suicídio, foi observada redução nos níveis de algumas neurotrofinas e alterações na circuitaria por meio de análise pós-morte (BANERJEE et al., 2013; PASKA et al., 2013; MINZENBERG et al., 2015). Uma de suas subdivisões é o córtex orbito-frontal, envolvido diretamente em processos emocionais e cognitivos, além de tomada de decisão, controle do impulso e valorização de ações e estímulos (SALZMAN, FUSI, 2010). Vários estudos têm dado atenção a relação entre anormalidades no córtex orbito-frontal e deficiências na tomada de decisão no comportamento suicida (JOLLANT et al., 2008, 2010; MONKUL et al., 2007). A redução dos níveis do receptor de serotonina (5-HT_{2A}) em *mPFC* de pacientes com recente tentativa de suicídio também foi observada (DESMYTER; HEERINGEN; AUDENAERT, 2011). Além disto, foi descrito por Karatsoreos et al. (2011) a atrofia de neurônios piramidais em *mPFC* e o comprometimento de habilidade para

reconhecimento de novos ambientes em camundongos submetidos a dessincronização sistêmica em fotoperíodo 10:10 (KARATSOREOS et al., 2011).

Diferentes estudos tem associado ativação do mPFC a episódios de depressão, todavia, não há um consenso entre os estudos se há aumento ou redução desta ativação. Grimm et al. (2009) e Yoshimura et al. (2010) relatam um aumento significativo da ativação de regiões corticais mediais, incluindo o mPFC, já os achados de Johnson et al. (2009) mostram uma redução na atividade (GRIMM et al., 2009; JOHNSON et al., 2009; YOSHIMURA et al., 2010). Em modelo animal para estudos envolvendo desordem depressiva maior, em animais submetidos a protocolos de estresse crônico, é observado um decréscimo na amplitude de *Per2* nesta estrutura (JIANG et al., 2011).

O estriado é necessário para o controle motor voluntário e é relacionado a processos cognitivos e de recompensa (BAEZ-MENDOZA; SCHULTZ, 2013). Esta estrutura apresenta alteração na massa cinzenta envolvendo depressão e suicídio (LAI, 2013). Além disto, anormalidades do metabolismo da serotonina ou do transportador de serotonina no putâmen, estrutura que compõe o estriado foram observadas em indivíduos que tentaram suicídio (MEYER et al., 2004; OQUENDO et al., 2003). Marchand e colaboradores identificaram por estudos de ressonância magnética que a rede estriatal está associada com a severidade da depressão e ideação suicida (MARCHAND et al., 2012).

Num estudo estrutural do sistema límbico, Dombrovski e colaboradores observaram que indivíduos que tentaram suicídio tem uma redução na massa cinzenta do putâmen comparado a indivíduos depressivos não-suicidas e controles. Isto sugere que a lesão estriatal pode contribuir para o comportamento suicida através do aumento da impulsividade (DOMBROVSKI et al., 2012). Em outros estudos, também foi observada a associação entre comportamento impulsivo e anormalidades no estriado e no mPFC (HOUSDEN et al., 2010; VOON et al., 2010). Segundo Zhang et al., 2014, as anormalidades no putâmen podem levar a decisões imediatas deficientes do estímulo de recompensa, ou seja, sem refletir sobre consequências, e assim promover atos suicidas impulsivos em um estado depressivo.

O impacto de variações contínuas de fotoperíodo no cérebro ainda é desconhecido, mas pode envolver neuroplasticidade e alterações no ritmo circadiano. Assim, novos estudos são necessários para investigar o efeito de variações no fotoperíodo no remodelamento cerebral em condições de sincronização estáveis ou transitórias. Os resultados deste estudo podem ajudar a

compreender os mecanismos envolvidos com os fenômenos epidemiológicos sazonais observados em pacientes com transtornos psiquiátricos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar o potencial efeito do fotoperíodo sobre a expressão de genes envolvidos com a neuroplasticidade e com o sistema temporizador circadiano, em mPFC e estriado de camundongos da linhagem C57BL/6.

3.2 Objetivos específicos

- Comparar os níveis de RNAm de *Per2* em mPFC em duas fases do ritmo, em animais submetidos à diferentes regimes de fotoperíodo;
- Comparar os níveis de RNAm de *Per2* em estriado em duas fases do ritmo, em animais submetidos à diferentes regimes de fotoperíodo;
- Comparar os níveis de RNAm de *Bdnf* em mPFC em duas fases do ritmo, em animais submetidos à diferentes regimes de fotoperíodo;
- Comparar os níveis de RNAm de *Bdnf* em estriado em duas fases do ritmo, em animais submetidos à diferentes regimes de fotoperíodo;
- Comparar os níveis de *Per2* ao longo de um ciclo diário em 6 ZTs em dois regimes 12:12 e TCL;
- Comparar os níveis de *Bdnf* ao longo de um ciclo diário em 6 ZTs, em dois regimes 12:12 e TCL;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Manutenção dos animais e protocolos de fotoperíodo

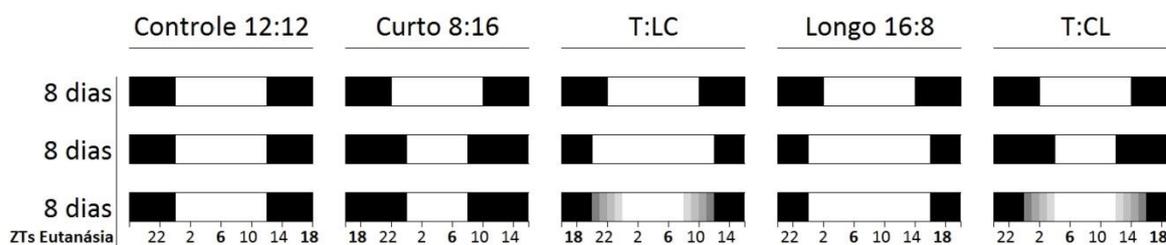
Os experimentos foram realizados conforme as exigências previstas na lei Arouca (Lei nº 11.794) de 08 de outubro de 2008, com protocolo aprovado pelo comitê de ética no uso Animal (CEUA) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) com o número 56/2015 (Apêndices A e B).

Foram utilizados inicialmente 40 camundongos (*Mus musculus*) da linhagem C57BL/6, machos, com idade entre 8-12 semanas. Os animais foram organizados em grupos de 4 animais por gaiola (41 x 34 x 16 cm/Sogorb, Brasil) com livre acesso a água e ração (Presence, Brasil). Todas as gaiolas foram alojadas em ambiente com isolamento acústico, de luz externa, com controle de temperatura (22°C), dotado de sistema de exaustão e controle do fotoperíodo, sendo utilizados 100 lux para a fase de claro.

Foram formados 5 grupos experimentais para avaliar o efeito do fotoperíodo, cada um com 2 gaiolas contendo quatro animais. O primeiro grupo (12:12), no qual os animais ficaram durante 8 dias em ciclos de 12 horas de claro e 12 horas de escuro. O grupo 2 (08:16) foi caracterizado por 8 dias em 12 horas de claro por 12 horas de escuro seguido de 8 dias em 08 horas de claro por 16 horas de escuro. O terceiro grupo (16:08) foi formado por 8 dias de 12 horas de claro por 12 horas de escuro seguido de 16 horas de claro por 08 horas de escuro também por 8 dias. O grupo 4 (TCL – Transição Curto ao Longo) foi submetido ao mesmo protocolo que o grupo 2, entretanto ao final do 8º dia do regime de 08 horas de claro por 16 de escuro estes animais foram submetidos a um protocolo de transição de fotoperíodo durante 8 dias. Esta transição consistiu em um aumento gradual de fotoperíodo, sendo a cada dia acrescido uma hora de luz (30 minutos no início da fase de claro e 30 minutos no final). Ao final deste regime, a duração do fotoperíodo consistiu em 16 horas de claro por 08 horas de escuro no dia da eutanásia. O quinto grupo (TLC – Transição Longo ao Curto) foi submetido à mesma rotina do grupo 3, seguida de um protocolo de transição, que consistiu em reduzir diariamente o fotoperíodo em uma hora a cada dia (30 minutos no início e o no final da fase de claro). Ao final deste regime, o fotoperíodo consistiu em 08 horas de claro por 16 horas de escuro no dia da eutanásia. Ao final de cada regime, cada grupo foi eutanasiado em dois pontos de um ciclo de claro/escuro (ZT06 e ZT18) (Figura 7).

Após este protocolo inicial, anteriormente descrito de 5 grupos e coleta em dois ZTs, foram utilizados mais 48 animais, divididos em dois grupos com 24 animais em cada. No primeiro grupo os animais foram submetidos a um regime de 12:12 (Claro: Escuro) desde o nascimento até a eutanásia. Os animais do segundo grupo foram submetidos ao mesmo protocolo do grupo 4, como pode ser observado na representação esquemática da figura 7B. Ao final de cada regime os animais foram eutanasiados de forma seriada, 4 animais a cada 4 horas, nos seguintes ZTs: 02, 06, 10, 14, 18 e 22.

Figura 7 - Esquema do modelo experimental, onde as barras brancas representam a duração da fase de claro e as pretas a duração da fase de escuro, para os grupos de diferentes regimes de fotoperíodo. No esquema são mostrados os momentos da coleta seriada. Números em negrito representam os dois ZTs estabelecidos para análise inicial em dois pontos. Regime de luz para os 5 grupos, com coleta em dois ZTs (ZT06 e ZT18).



Fonte: Autora, 2017.

4.1.1 Procedimento cirúrgico

No último dia de cada regime, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, conforme legislação vigente. Cada cérebro foi dissecado a fresco para isolamento do mPFC e do estriado. O isolamento das estruturas foi realizado manualmente com o auxílio de pinças e bisturis, da seguinte forma: com auxílio de bisturi foi removido o bulbo olfatório e no corte seguinte foi possível observar o mPFC. Após a remoção do mPFC, com o dorso do bisturi as camadas do córtex eram expostas, permitindo a visualização dos corpos estriados para remoção. Após a dissecação, as amostras foram homogeneizadas em 350 uL de trizol, com o auxílio de seringas de 5 mL e em seguida armazenadas em freezer -80°C (Indrel, mod. IULT 335D, Brasil) para posteriormente seguirem para extração de RNA total, a dissecação foi adaptada do protocolo de Sabine Spijker (2011) (SPIJKER, 2011).

4.2 Extração de RNA total

A obtenção do RNA total se deu através de extrações com Trizol, seguindo o protocolo de extração para tecido biológico com Trizol (Invitrogen – Life Technologies) para mPFC. E

com kit Direct-zol RNA Miniprep (ZymoResearch-USA, cod. R2050) para as amostras de estriado, para os 5 grupos com coleta em dois ZTs (06 e 18). As extrações seguiram as orientações recomendadas pelos protocolos dos fabricantes.

Para extração com trizol, inicialmente as amostras foram pesadas e homogeneizadas em 350 μ L de trizol, com auxílio de uma seringa. A concentração de cada amostra foi calculada e todas foram normalizadas baseado-se nas amostras de menor concentração. As amostras foram incubadas durante 5 minutos em temperatura ambiente para dissociação de nucleoproteínas. Em seguida foram centrifugadas a 12.000 \times g durante 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação foi observado um pellet de restos celulares, que foi removido, utilizando todo o sobrenadante para prosseguir com a extração. Nesta etapa foi padronizado o mesmo volume de sobrenadante para todas as amostras (600 μ L). Em seguida, foram adicionados 200 μ L de clorofórmio e os tubos foram agitados a mão por 15 segundos em temperatura ambiente. As amostras foram incubadas durante 5 minutos também à temperatura ambiente e posteriormente foram centrifugadas a 12.000 \times g durante 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação foram observadas três fases distintas, sendo a superior (incolor) – fase aquosa com RNA (~60% do volume total), uma fase intermediária (aspecto esbranquiçado contendo DNA) e uma fase inferior (vermelha) que é a fase orgânica contendo proteína. A fase superior contendo RNA foi transferida para um novo tubo, sempre evitando contaminar com as demais fases. O volume transferido foi padronizado para todas as amostras (250 μ L). A fase orgânica foi congelada a -80°C. Às amostras contendo RNA, foram adicionados 0,25 μ L de Glicogênio (20 μ g/ μ L). Em seguida, foram adicionados 500 μ L de Isopropanol (100%) e homogeneizando e invertendo-o 5 vezes. O RNA foi visualizado antes da centrifugação em forma de pellet gelatinoso.

As amostras foram então incubadas durante 10 minutos a temperatura ambiente e posteriormente centrifugadas a 12.000 \times g durante 10 minutos a 4°C. O isopropanol foi descartado invertendo os tubos individualmente, sempre com cautela para evitar perder o pellet de RNA. Em seguida foram adicionados 1mL de Etanol 75% (diluído em água livre de nucleasse – Amresco/USA-2015) e as amostras foram homogeneizadas por vórtex durante 5 segundos, e posteriormente centrifugadas a 7500 \times g (5 minutos/4°C). Com cuidado para não perder o pellet, o sobrenadante foi descartado e o pellet de RNA foi mantido a temperatura ambiente para secagem durante 10 minutos. O pellet foi então ressuspenso em 40 μ L de água livre de RNase (Amresco/USA- 2015) e as amostras foram armazenadas em freezer -80°C (Indrel, mod. IULT 335D, Brasil).

Para extração utilizando o kit para extração de RNA Direct-zol RNA miniprep kit (ZYMO Research/USA), as amostras foram também homogeneizadas em trizol (Invitrogen – Life Technologies), normalizadas pela concentração de tecido e submetidas a extração com colunas específicas para extração de RNA total de acordo com o manual do fabricante, sendo RNA total eluído em um volume final de 50 μ L.

Durante a extração das amostras de mPFC, três amostras foram perdidas durante o procedimento. Desta forma no ZT06, grupo 12:12 houve a perda de uma e no mesmo ZT, grupo TLC houve a perda de duas amostras.

4.3 Quantificação por espectrofotometria

Para a quantificação do RNA, foi utilizado o aparelho de espectrofotômetro (BioPhotometerplus, Eppendorf, USA). O RNA total foi diluído usando 55 μ L de água livre de RNase (Amresco, USA) e 5 μ L de RNA total, sendo considerados 38 μ g de RNA/ μ L para o valor de absorvância igual a 1 em comprimento de onda de 260nm. Além disso, a razão da absorvância em 260nm/280nm (≥ 1.8) foi utilizada para avaliar o grau de pureza das amostras. Como descrito na literatura, a razão 260nm/280nm pode apresentar valores abaixo de 1.8 em decorrência da diluição do RNA em água, em vez de tampão T.E. A absorvância da água usada para as diluições das amostras que foram quantificadas, foi desconsiderada antes de cada procedimento. Os dados resultantes da quantificação estão disponíveis na tabela 1 (anexo 1 e 2).

4.4 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada utilizando o kit miRScript II RT Kit (Qiagen – USA), para as amostras de estriado. Para as amostras de mPFC foi utilizado o kit Revertaid H Minus – First Strand (Fermentas –USA), considerando as amostras coletadas dos 5 grupos em dois ZTs. Para as amostras coletadas em seis pontos foi utilizando o mesmo kit.

Para síntese de cDNA utilizando o kit miRScript II RT Kit (Qiagen – USA), foram seguidas as instruções do fabricante, padronizado o volume de cada um dos reagentes: 2 μ L do 5x miScript Hiflex Buffer, 1 μ L de 10x nucleics mix e 1 μ L da miScript Reverse Transcriptase Mix. Para cada tecido, o volume de RNA foi determinado com base no limiar mínimo e máximo estabelecido pelo kit (usar entre 10pg e 1 μ g), observando os valores da quantificação por

espectrofotometria de cada tecido, determinou-se: 3µL de RNA total para as amostras de estriado.

Para o kit Revertaid H Minus – First Strand (Fermentas – USA), o limiar permitido pelo kit está entre 10ng e 5µg, para isto foram utilizados 11µL de RNA total de cada amostra de mPFC. Os demais reagentes também foram otimizados: 4µL de 5x reaction buffer; 1µL de Ribolock RNase inhibitor (20u/µL); 2µL de dNTP (10mM); 1µL de Revertaid H Minus Reverse Transcriptase e 1µL de primer oligodT.

Para cada uma das reações de síntese de cDNA, o volume final de RNA transcrito reversamente foi diluído 10X e esta alíquota foi então utilizada para as reações de qPCR.

4.5 qPCR

As reações de PCR em Tempo Real foram realizadas no equipamento StepOne Plus (Life Tech, USA) através do método de quantificação relativa para determinar os níveis de RNAm de *Per2*. Para cada iniciador utilizado foi realizado o teste de eficiência da reação, utilizando 5 diluições diferentes, com fator 1:2 em cada diluição, considerando a diluição anterior.

O iniciador para *Bdnf* foi selecionado através do *Primer Bank* (<https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>) e para *Per2* foi desenhado através do software *Oligo explorer* (Gene Link, USA). Na tabela 1 é estão descritas as sequências dos iniciadores e os valores recomendáveis de eficiência da reação estão entre 80 e 110% é considerada boa. Os gráficos do teste de eficiência são observados na figura 8.

Foi utilizado o sistema *SyBr Select* da *Applied Biosystem*, seguindo as instruções do fabricante: 5 µL de *Sybr Select* (Life Tech, USA), 0,35 µL de iniciadores específicos, 2,25 µL de água livre de nucleasse (Amresco, USA) e 2,5 µL de cDNA. As reações foram realizadas em duplicatas para cada amostra.

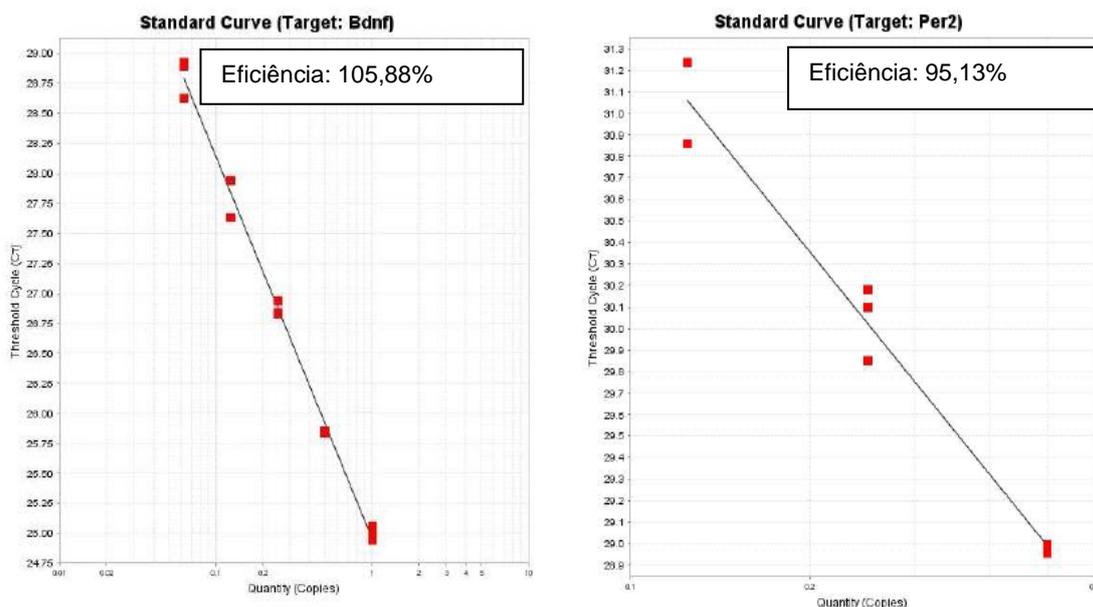
Os parâmetros de ciclagem foram no modo ‘fast’, seguindo as instruções do fabricante: para desnaturação inicial 50°C durante 2 minutos e 95°C durante 2 minutos. Seguindo de 40 ciclos de 95°C por 3 segundos (desnaturação) e 60°C por 30 segundos (anelamento e extensão).

Tabela 1- Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de qPCR, tamanho do amplicon resultante e resultado do teste de eficiência da reação.

Gene	Sequência 5'->3'	Amplicon	Eficiência
<i>Per2</i>	Fw – CATATCTTCTACCGTCTCTAGCTCG	71pb	95,13%
	Rv – GCTACAGCAGCACCATCGTG		
<i>Bdnf</i>	Fw – TCATACTTCGGTTGCATGAAGG	137pb	105,88%
	Rv – AGACCTCTCGAACCTGCCC		

Fonte: Autora, 2017.

Figura 8 - Teste de eficiência dos iniciadores de *Per2* e *Bdnf*, utilizando 5 diluições, fator 1:2.



Fonte: Autora, 2017.

4.6 Análise de dados

A análise dos dados de expressão gênica foi feita utilizando a média do *Cycle Threshold* (CT) das duplicatas experimentais, considerando um desvio de réplica menor que 0,5. O dado da média do CT foi então convertido para 2^{-CT} . A normalização foi realizada no início da extração, através da concentração de cada amostra, por tecido, utilizando a amostra menos concentrada como referência para normalização das demais. Para calcular o *fold change*, o ZT02, foi utilizado como amostra calibradora, para os 6 pontos. E o ZT06 como calibrador para

o cálculo do *fold* dos dois ZTs (06 e 18). O software *GraphPad Prism* (Versão 5.0, 2007), foi utilizado para identificar diferença entre os ZTs. Para comparar os ZTs de cada grupo, foi utilizado o teste *t de student*. Para análise entre os 5 grupos de um mesmo ZT, foi utilizada ANOVA de uma via com medidas repetidas, utilizando como pós teste a análise de bonferroni. Para as análises do perfil diário foi utilizado o teste cosinor, através do software *Acrophase* e *Circwave*.

5 RESULTADOS

5.1 Análise da expressão relativa de *Per2* no cérebro

A quantificação dos níveis de *Per2* para os 5 grupo, em mPFC estão detalhadas na figura 09 e para estriado na figura 10. Os níveis de *Per2*, quantificados em mPFC são diferentes entre a fase clara (ZT06) e a fase escura (ZT18) apenas no grupo controle (12:12), sendo 5,25x mais expresso no ZT18 do que no ZT06 (Tabela 02).

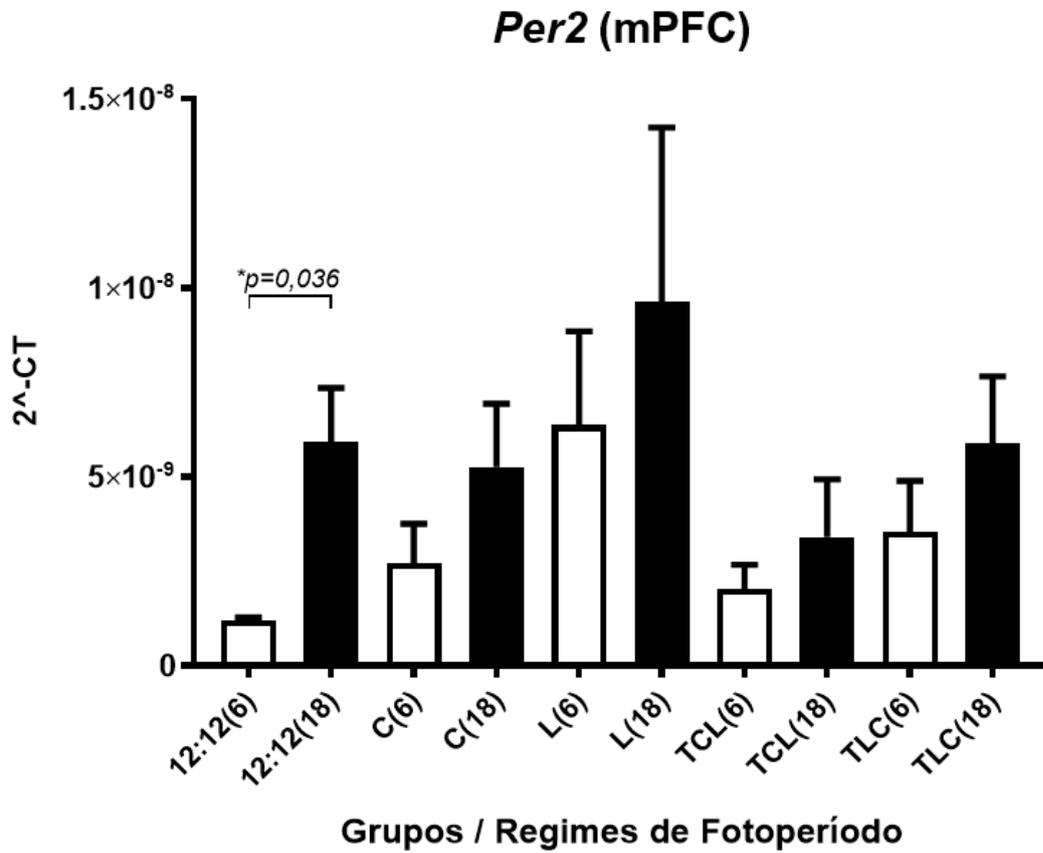
Em *estriado*, os níveis de *Per2* são mais elevados no ZT18 em relação ao ZT06 nos grupos 12:12, sendo 3,57 vezes mais expresso. No grupo 08:16, *Per2* está 5,60 vezes mais expresso no ZT18 também em relação ao ZT06, no grupo 16:08 está 4,12x mais, e no grupo TLC, é 2,68 vezes mais expresso. Quando são comparados os grupos de diferentes fotoperíodos em um mesmo ZT, observa-se que são diferentes entre si os grupos 12:12 e 16:08, no ZT06. A expressão de *Per2* é maior durante a fase de escuro (ZT18) em todos os grupos analisados nesta estrutura (Figura 09 e 10).

Tabela 2 - Diferença de expressão relativa (foldchange) dos níveis de expressão de RNAm dos genes *Per2* e *Bdnf* em mPFC e estriado, comparando os níveis de expressão do ZT18 em relação ao ZT06 (utilizado como calibrador para todas as amostras do ZT06). *= p<0,005 para o teste t.

Condições	<i>Per2</i>		<i>Bdnf</i>	
	Mpfc	Estriado	Mpfc	Estriado
12:12	5,2574 *	3,5798*	3,3879	5,4568*
08:16	2,7756	5,6028*	2,5446	3,2898*
16:08	1,3214	4,1267*	1,2101	3,5044*
T 08:16 -> 16:08	1,6405	0,5932	1,4459	0,7235
T 16:08 -> 08:16	1,6438	2,6808*	2,5362	1,8633*

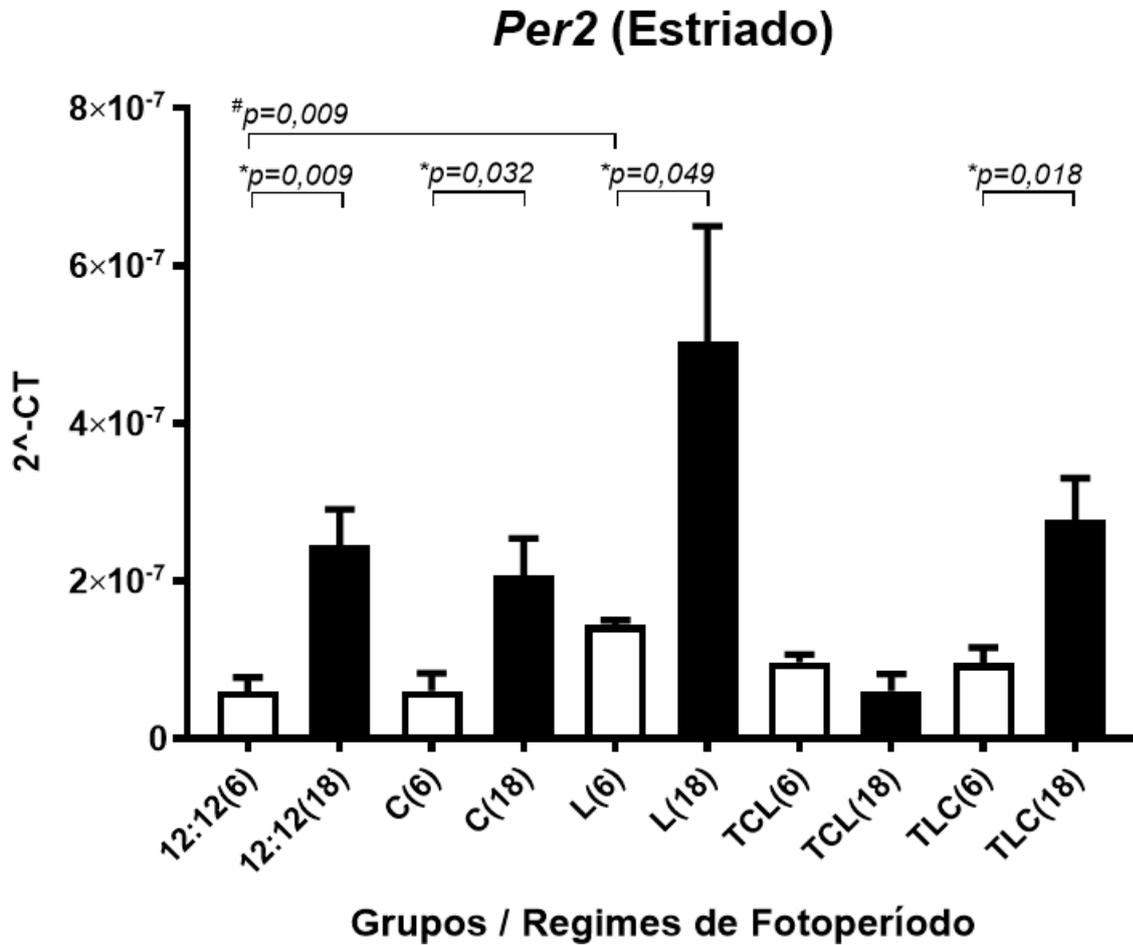
Fonte: Autora, 2017.

Figura 09 - Níveis de RNAm de *Per2* avaliados em mPFC. As barras em branco representam o grupo de animais do ZT06 e as barras em cinza representam o ZT18. A análise dos dados entre o ZT 06 e o ZT18 foi feita através de teste *t de student* e entre os diferentes regimes de fotoperíodo através de ANOVA de uma via, utilizando a média do *Cycle Threshold*.



Fonte: Autora, 2017.

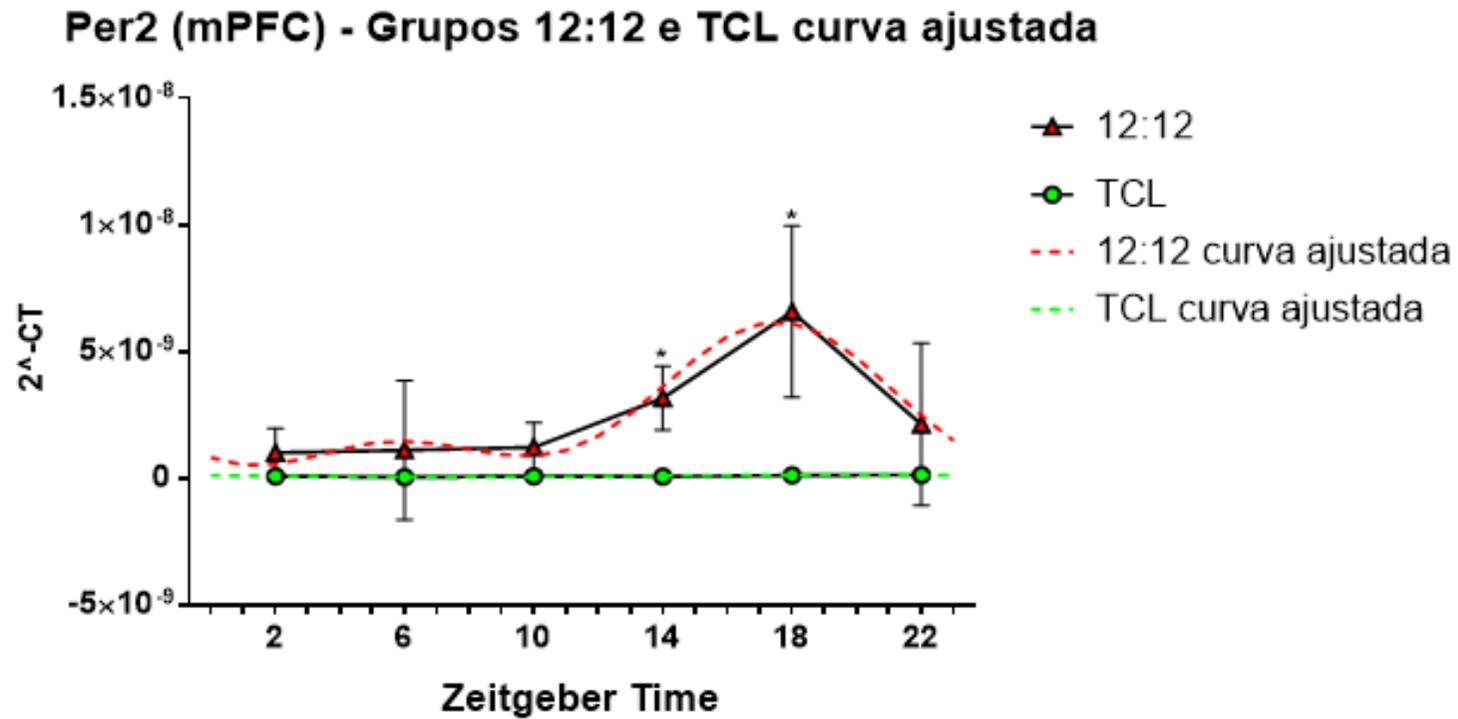
Figura 10 - Níveis de RNAm de *Per2* avaliados em estriado. As barras em branco representam o grupo de animais do ZT06 e as barras em cinza representam o ZT18. A análise dos dados entre o ZT 06 e o ZT18 foi feita através de teste *t de student* e entre os diferentes regimes de fotoperíodo através de ANOVA de uma via, utilizando a média do *Cycle Threshold*.



Fonte: Autora, 2017.

A análise do perfil diário de *Per2* em mPFC revelou no regime 12:12 e no regime TCL uma variação rítmica ao longo do ciclo de 24 horas, considerando a expressão entre os 6ZTs (Figura 11).

Figura 11 - Perfil da expressão diária de *Per2* em mPFC. Níveis de expressão de *Per2* em regime de 12:12 (C:E) e TCL. As análises são dos dados de 2 elevado a menos CT (*Cycle Threshold*) ajustados a curva cosseno.

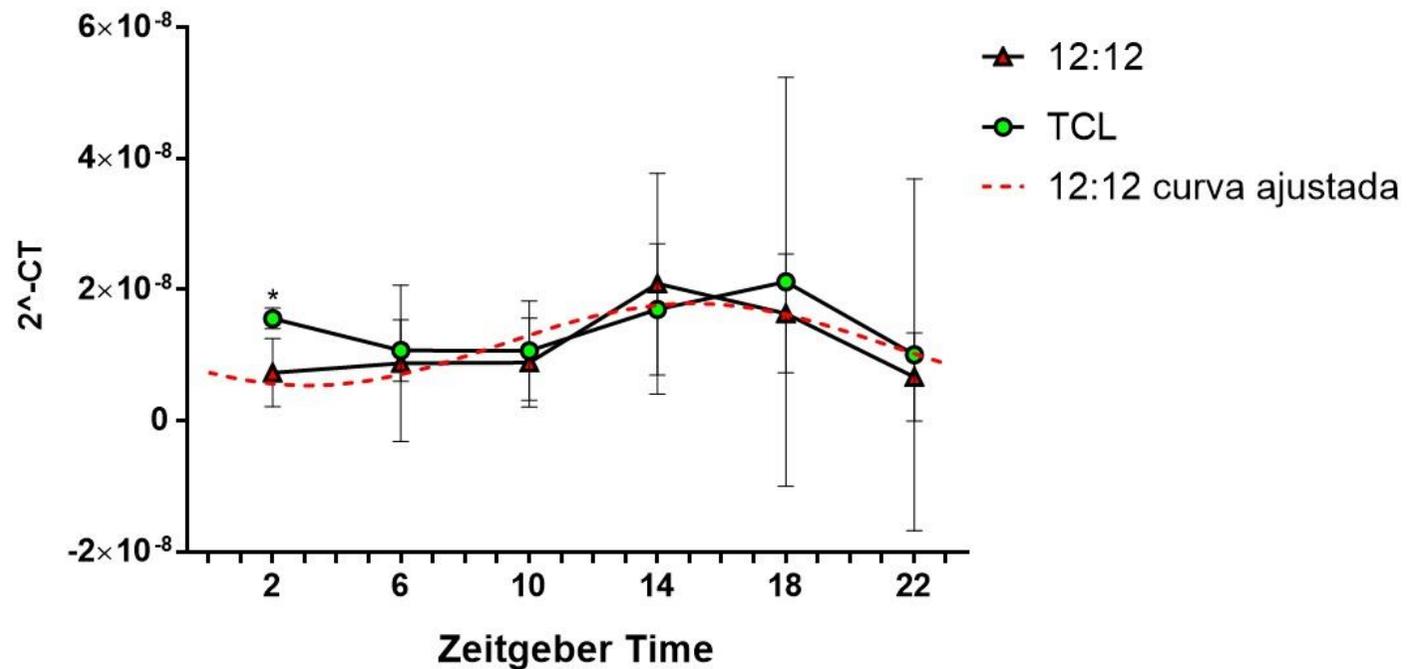


Fonte: Autora, 2017.

O mesmo resultado é observado para estriado (figura 12), no grupo 12:12 identificou-se a variação rítmica ao longo de um ciclo diário apenas no grupo 12:12 (Figura 12).

Figura 12 - Perfil da expressão diária de *Per2* em estriado. Níveis de expressão de *Per2* em regime de 12:12 (C:E) e no regime TCL. As análises são dos dados de 2 elevado a menos CT (*Cycle Threshold*) ajustados a curva cosseno.

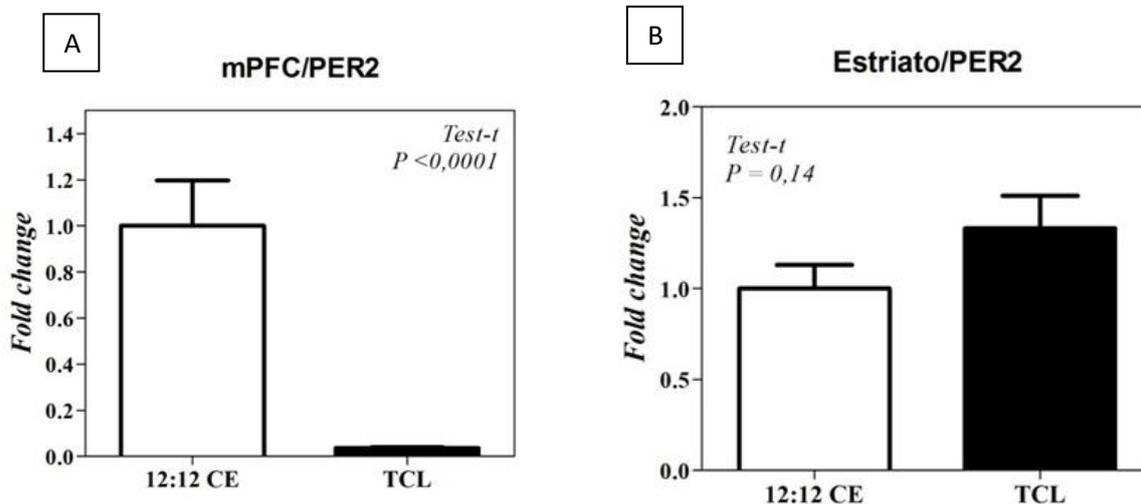
Per2 (Corpo Estriado) - Grupos 12:12 e TCL curva ajustada



Fonte: Autora, 2017.

Em estriado esta diferença não foi observada (Figura 13).

Figura 13 - Comparação dos níveis de expressão do grupo 12:12 com o grupo TCL. A: Diferença entre os níveis dos transcritos de *Per2* em mPFC. B: Diferença entre os níveis dos transcritos de *Per2* em estriado. Análise por Teste *t de student*.

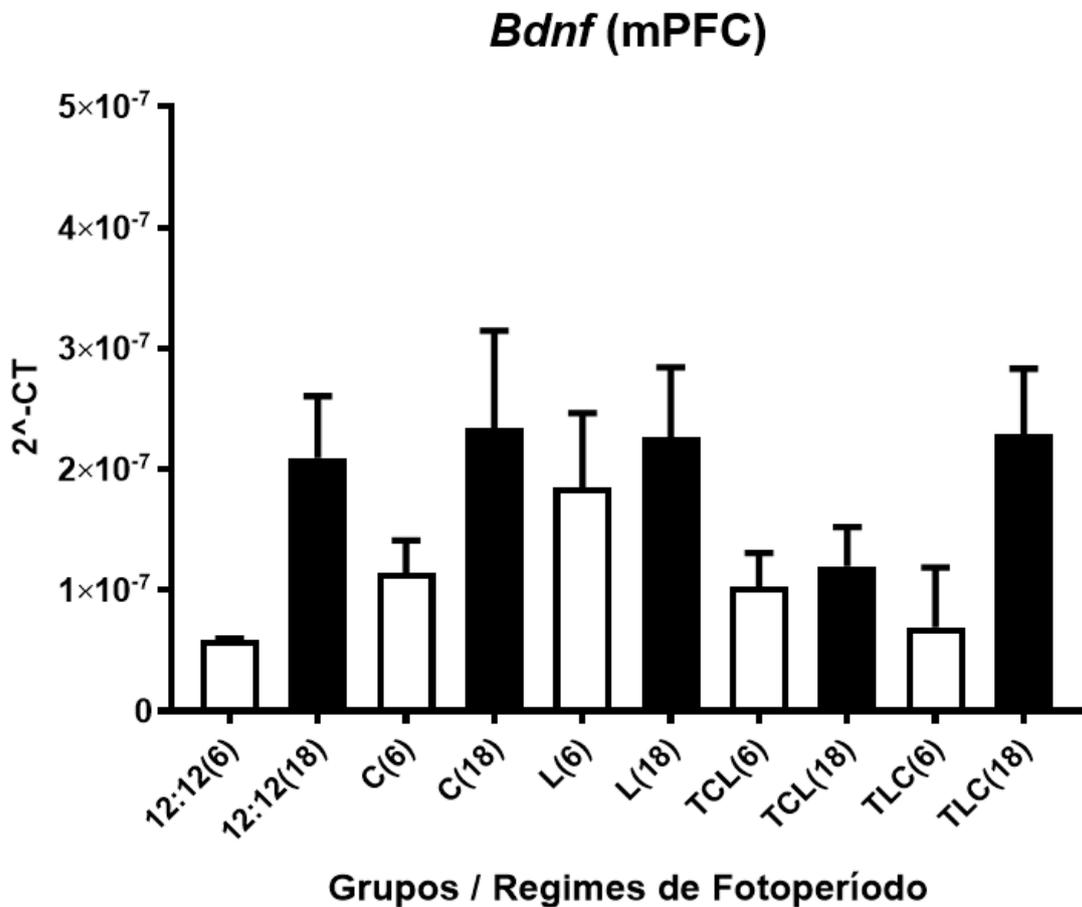


Fonte: Autora, 2017.

5.2 Análise da expressão relativa de *Bdnf* no cérebro

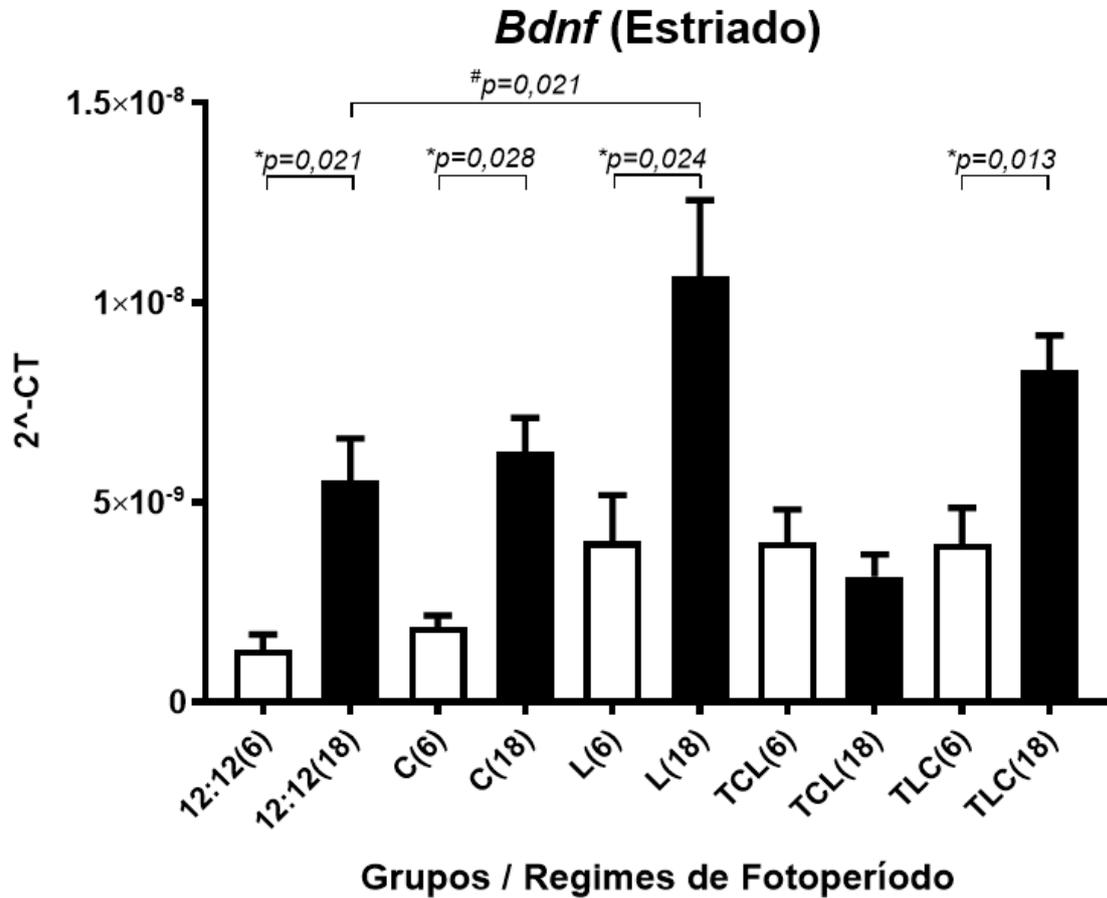
Em mPFC, os níveis de *Bdnf* não são significativamente diferentes entre os ZTs 06 e 18. (Figura 14) em nenhum dos grupos. Em estriado, os grupos 12:12, 08:16, 16:08 e TLC apresentam o nível de expressão de *Bdnf* mais elevado no ZT18 do que no ZT06 (Figura 15). O grupo TCL não apresenta diferença em nenhum dos tecidos. Na tabela 02, encontra-se os níveis de expressão do ZT18 em relação ao ZT06.

Figura 14 - Níveis de RNAm de *Bdnf* avaliados em mPFC e em *estriado*. As barras em branco representam o grupo de animais do ZT06 e as barras em preto representam o ZT18. A análise dos dados entre o ZT 06 e o ZT18 foi feita através de teste *t de student* e entre os grupos através de ANOVA de uma via.



Fonte: Autora, 2017.

Figura 15 - Níveis de RNAm de *Bdnf* avaliados em mPFC e em *estriado*. As barras em branco representam o grupo de animais do ZT06 e as barras em preto representam o ZT18. A análise dos dados entre o ZT 06 e o ZT18 foi feita através de teste *t de student* e entre os grupos através de ANOVA de uma via.

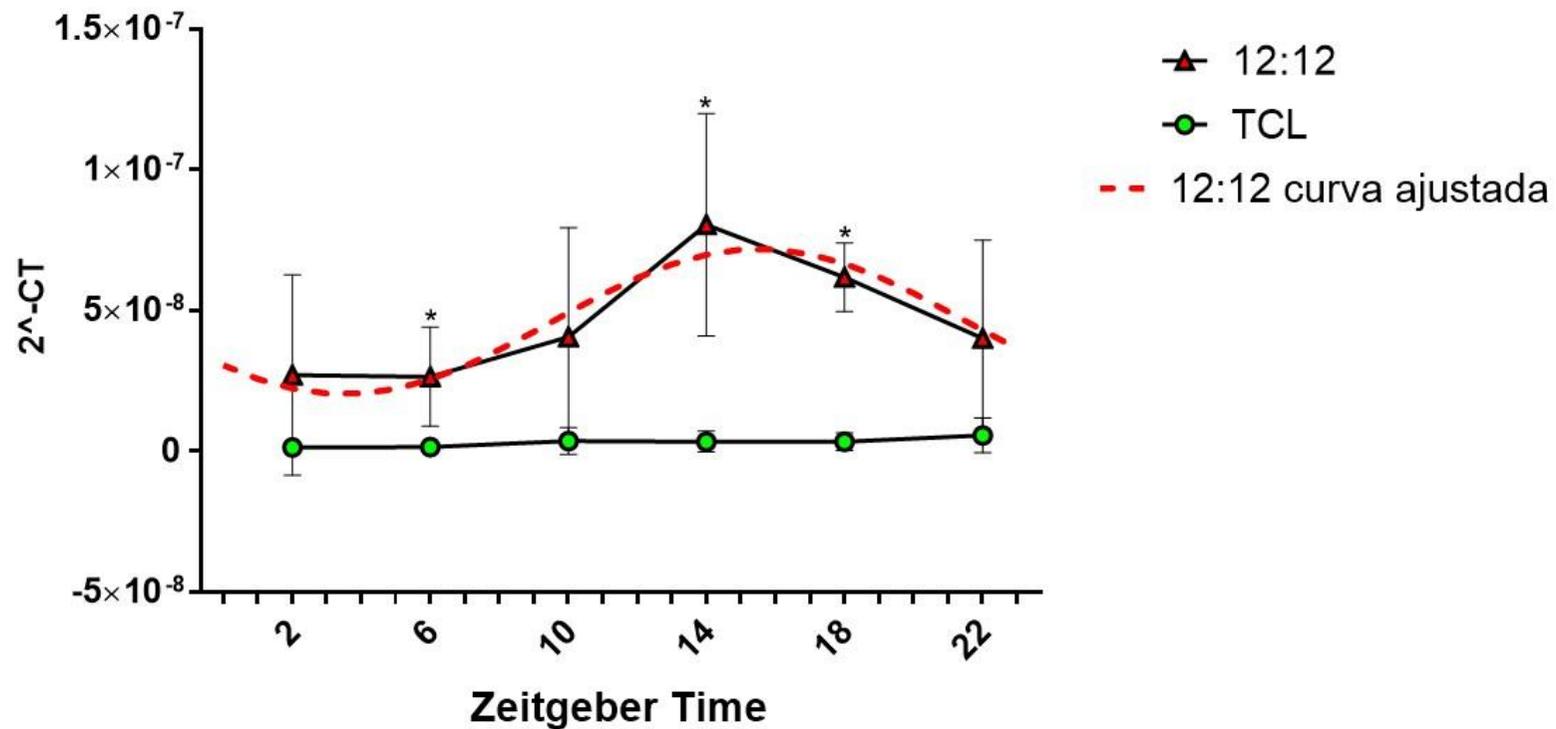


Fonte: Autora, 2017.

Análise do perfil diário de *Bdnf* em mPFC mostra variação nos níveis do transcrito apenas no regime 12:12, ao longo de um ciclo de 24 horas. O grupo TCL não apresenta variação diária nos níveis de *Bdnf* (Figura 16).

Figura 16 - Perfil da expressão diária de *Bdnf* em mPFC. Níveis de expressão em regime de 12:12 (C:E) e no regime TCL. As análises são dos dados de 2 elevado a menos CT (*Cycle Threshold*) ajustados a curva cosseno.

Bdnf (mPFC) - Grupos 12:12 e TCL com curva ajustada

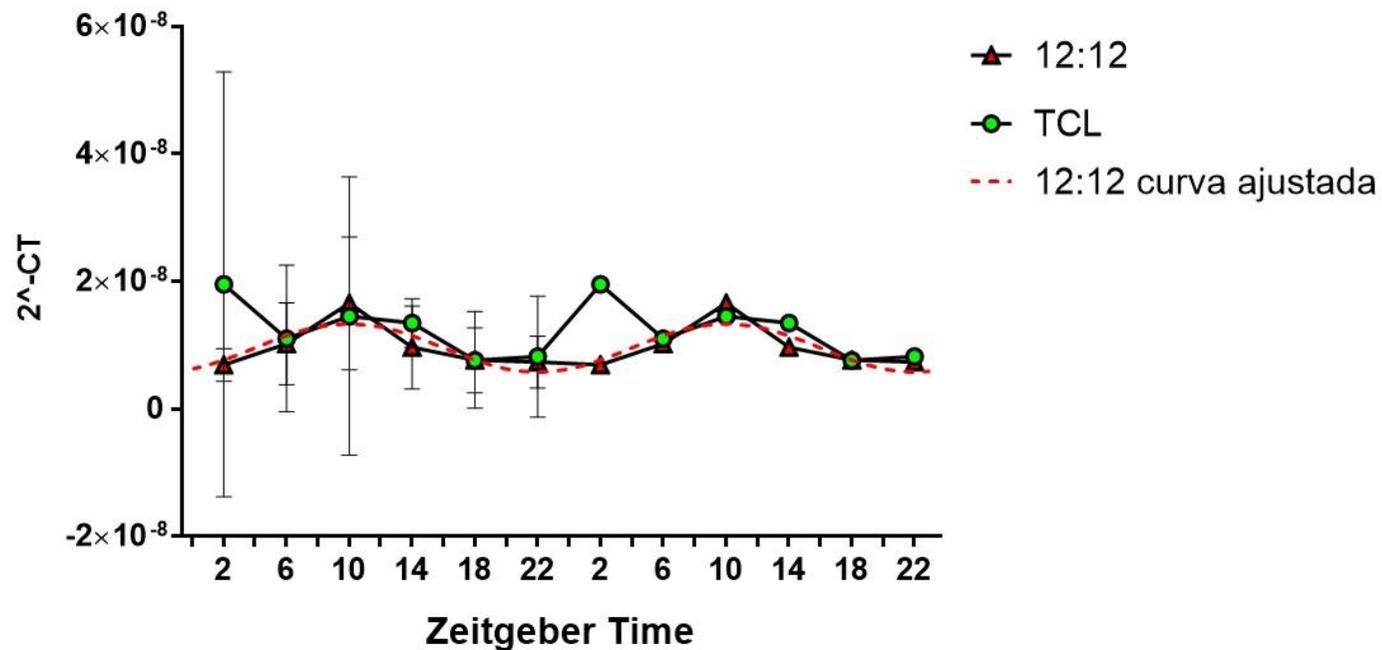


Fonte: Autora, 2017.

Ao analisar os níveis de *Bdnf* ao longo de um ciclo diário em estriado, observa-se o mesmo resultado encontrado para mPFC. Apenas no regime 12:12 é identificada variação significativa (Figura 17).

Figura 17 - Perfil da expressão diária de *Bdnf* em estriado. Níveis de expressão em regime de 12:12 (C:E) e no regime TCL. As análises são dos dados de 2 elevado a menos CT (*Cycle Threshold*) ajustados a curva cosseno.

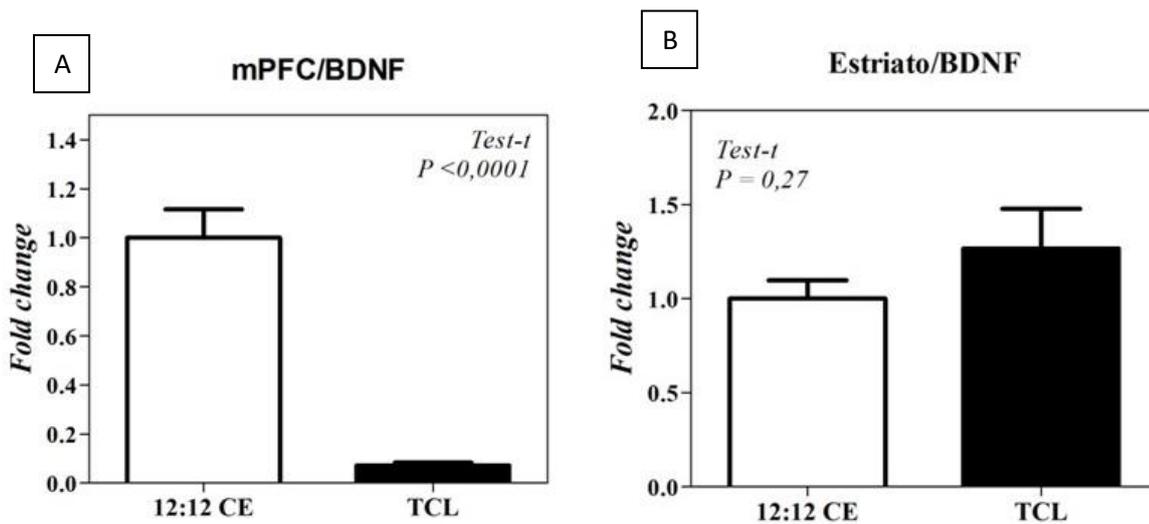
Bdnf (Corpo Estriado) - Grupos 12:12 e TCL curva ajustada



Fonte: Autora, 2017.

Comparando os níveis de expressão de *Bdnf* entre os dois regimes de fotoperíodo, observa-se um efeito igual ao encontrado para *Per2*. Para mPFC observou-se que os níveis de *Bdnf* apresentam-se reduzidos no grupo TCL, quando comparado ao grupo 12:12 (Figura 18A). Efeito que não foi observado para estriado (Figura 18B).

Figura 18 - Comparação dos níveis de expressão do grupo 12:12 com o grupo TCL. A: Diferença entre os níveis dos transcritos de *Bdnf* em mPFC. B: Diferença entre os níveis dos transcritos de *Bdnf* em estriado. Análise por Teste *t de student*.



Fonte: Autora, 2017.

6 DISCUSSÃO

Várias evidências demonstram que o fotoperíodo pode modular o comportamento e a atividade cerebral por mecanismos de neuroplasticidade. Entretanto, estes mecanismos e a magnitude da interferência de variações do fotoperíodo na atividade cerebral ainda são desconhecidos. Neste trabalho, investigamos o efeito de variações fotoperiódicas na expressão de um gene envolvido na neuroplasticidade (*Bdnf*) e um gene central do sistema temporizador circadiano (*Per2*), em estruturas cerebrais associadas com tomada de decisão, controle executivo e cognição (mPFC, estriado), de camundongos da linhagem C57BL/6. Estes processos mentais são alterados em transtornos psiquiátricos que apresentam variação sazonal, como transtornos do humor.

As condições naturais de variações fotoperiódicas (estações) mudam ininterruptamente. Assim, os modelos que utilizam uma condição estável de fotoperíodo, mesmo que em fotoperíodos curtos ou longos, não mimetizam as variações contínuas presentes em um ambiente natural e podem mascarar este efeito. Em condições estáveis de fotoperíodo, o organismo está arrastado a este ritmo, de forma que já está sincronizado, ou seja, os seus osciladores estão em um ajuste de fase estável ao ritmo ambiental. Quando o organismo está em um ambiente de transição contínua de fotoperíodo, do curto ao longo, por exemplo, ele também responde continuamente numa tentativa de adaptação temporal.

Além dos protocolos convencionais de fotoperíodo longo (16:08) e curto (08:16), realizamos dois protocolos que simulam transições graduais de fotoperíodo. O protocolo TLC simula a transição do fotoperíodo longo ao curto, com redução de uma hora, 30 minutos no início e 30 minutos no final da fase de claro, a cada dia, durante 8 dias, semelhante ao que ocorre no outono. O protocolo TCL demonstra a transição de fotoperíodo curto ao longo, similarmente ao que acontece entre o solstício de inverno e o solstício de verão, englobando a primavera, com incremento gradual de uma hora de luz. A análise de diferentes variáveis nestas condições pode ajudar a elucidar como os organismos respondem a esta sazonalidade de ritmos ambientais mais próximo do que ocorre no ambiente natural.

Recentemente, Quiles et al., (2016) utilizaram um protocolo semelhante em seu estudo, realizando uma transição gradual, com incremento ou redução de 30 minutos de luz por dia ao longo de 18 dias, em ratos wistar. Os autores observaram que o ritmo de atividade e temperatura mantém o mesmo perfil de acordo com o fotoperíodo para os grupos mantidos em um mesmo

regime. Nos grupos de transição, a acrofase da temperatura é arrastada para o início da escotofase quando os animais estão em fotoperíodo longo e para o meio da escotofase quando em fotoperíodo curto. Os níveis de corticosterona são significativamente diferentes entre os grupos que passaram por transição de fotoperíodo do longo ao curto e do curto ao longo, com decréscimo de concentração no grupo de transição do curto ao longo. As dosagens de melatonina foram correlatas positivamente no grupo de transição do longo ao curto, ou seja, ao passo que o fotoperíodo diminui também reduz a concentração de melatonina, de forma que este regime de transição gradual parece modular a resposta deste neurohormônio. Entretanto, neste estudo, a transição de fotoperíodo foi realizada de forma unilateral, acrescentando ou reduzindo o tempo de luz apenas no início da fase de claro, o que não reproduz a variação fotoperiódica que ocorre naturalmente e pode interferir no arrastamento fótico, induzindo a sincronização para o ajuste do início da fase de atividade.

Em nosso estudo, observamos que os níveis de *Per2* em mPFC e em *estriado* são diferentes entre as fases de claro e escuro no fotoperíodo 12:12, indicando uma variação temporal dos níveis deste gene, comprovada ao observar o perfil cíclico deste gene no regime 12:12. Em *estriado* também houve diferença significativa entre os ZTs 06 e 18 nos grupos 08:16, 16:08 sugerindo uma variação temporal. O grupo de transição gradual de fotoperíodo do curto ao longo (TCL) não apresentou diferença entre os ZTs, e também não apresentou variação ao longo do ciclo de 24 horas, ao analisar os 6 ZTs. Desta forma, podemos demonstrar que a expressão de *Per2* nestas estruturas está arritmica. A redução nos níveis dos transcritos ocorre de maneira similar ao observado em NSQ de hamsters (TOURNIER et al., 2003), com redução da amplitude quando submetidos a fotoperíodo curto (14:10). Todavia neste estudo a variação gradual parece desempenhar um efeito maior nos níveis rítmicos de *Per2*.

Os estudos envolvendo *Per2*, um importante gene central do sistema temporizador circadiano, demonstram diferentes respostas a mudanças de fotoperíodo. Os dados de Yasuo et al.(2003) mostram que em NSQs, pineal e hipotálamo médio basal de aves (*Coturnix coturnix japônica*), os níveis de diferentes genes circadianos sob fotoperíodo longo (16:08) e fotoperíodo curto (08:16) apresentam diferença de fase ou amplitude. Dentre os genes circadianos analisados, *Per2* continua rítmico nos três tecidos e em ambos os fotoperíodos. Entretanto, em NSQ, apresenta redução no pico da amplitude em fotoperíodo curto, quando comparados ao fotoperíodo longo, em um ciclo de 24 horas. Em outro estudo de Tournier et al., (2003), com hamsters submetidos a fotoperíodo longo (14:10) e fotoperíodo curto (10:14), os níveis dos

genes *Per* ainda apresentavam-se rítmicos, entretanto, o pico de expressão foi encurtado, quando em fotoperíodo curto.

É de fundamental importância compreender como o cérebro se adapta às mudanças sazonais de fotoperíodo. Considerando a neuroplasticidade como uma importante via de remodelamento cerebral, foi analisada a expressão de *Bdnf*, um dos principais genes envolvidos com o este processo e expresso em todo o encéfalo. Já é conhecido que os níveis de *Bdnf* e seu receptor *Trkb* variam ritmicamente em NSQs, *mPFC*, córtex visual, hipocampo e cerebelo de camundongos, tanto em RNAm, quanto em proteína, com elevação dos transcritos na noite subjetiva (DOLCI et al., 2003). Além disto, *Bdnf* parece atuar na regulação fótica nos NSQs (LIANG; ALLEN; EARNEST, 2000).

Observamos que, em *mPFC*, os níveis de *Bdnf* não diferem entre os ZTs 06 e 18 em nenhum dos 5 grupos. Este achado pode ser decorrente de ser uma análise em apenas dois momentos de um ciclo de 24 horas e coincidentemente os níveis dos genes nestes dois pontos estarem com mesmo nível de expressão. Já para estriado observa-se que os níveis são significativamente diferentes nos grupos 12:12, 08:16, 16:08 e TLC. Este dado indica uma variação rítmica na expressão deste gene nestas regiões. A análise de expressão de *Bdnf* ao longo do ciclo diário no grupo 12:12, mostra que para as duas regiões (*mPFC* e estriado), os níveis deste transcrito variam ritmicamente. Já no grupo de transição gradual de fotoperíodo do curto ao longo (TCL), em *mPFC* e estriado, não foi observada diferença entre os ZTs (06 e 18), nem ao longo do ciclo diário de 24 horas (6 ZTs), o que sugere que esta mudança fotoperiódica gradual afetou a ritmicidade da expressão de *Bdnf*, gerando a extinção deste ritmo. Esta ausência do perfil cíclico de *Bdnf* no grupo TCL pode ser decorrente da redução nos níveis dos transcritos. Em *mPFC*, de fato, há uma redução significativa dos níveis de *Bdnf* no regime TCL, em relação ao 12:12.

Estudos recentes tem demonstrado que a produção de *Bdnf* é significativamente reduzida em hipocampo e *mPFC* de pacientes que cometeram suicídio (BANERJEE et al., 2013). Além disto, no polimorfismo Val66Met (rs6265), o alelo Met tem sido associado a redução da atividade de *BDNF* e a um risco aumentado para suicídio (PASKA; ZUPANC; PREGELJ, 2013)

Ainda não há um modelo animal padrão para estudos de variação sazonal. Diversos modelos tem sido empregados, desde hamsters siberianos, camundongos (C57BL/6, swiss, C3H), ratos wistar, camundongo de patas brancas (*Peromyscus leucopus*), entre outros. Cada modelo possui suas particularidades, constituindo limitações e ganhos para cada pesquisa. O uso do camundongo C57BL/6 para este estudo é vantajoso por sua facilidade de sincronização aos ritmos ambientais, por ser um dos principais modelos genéticos no estudo de ritmos circadianos e por apresentar respostas comportamentais fotoperiódicas associadas a distúrbios psiquiátricos (BIASSI-ADAMAH; HUDSON; DUBOCOVICH.M.L., 2015). Todavia, esta linhagem possui deficiência na síntese de melatonina, que se apresenta em níveis basais, o que pode ser uma limitação para estudos sazonais (ADAMAH-BIASSI et al., 2013). Além disto, é uma espécie de hábitos noturnos, o que deve ser levado em consideração na comparação com espécies diurnas como a nossa.

A melatonina tem sido alvo de diversos estudos, sugerindo que pode ser responsável pela sincronização sazonal. Camundongos da linhagem C57BL/6 são deficientes na síntese de melatonina, apresentando níveis basais. Uma hipótese possível para a ausência de variação rítmica nos transcritos de *Per2* e *Bdnf* em mPFC e estriado, é que a deficiência nos níveis de melatonina leve a um prejuízo na adaptação a estes regimes de fotoperíodo.

Ainda não há relatos na literatura que apontem para modulação do fotoperíodo nos níveis de *Per2* em mPFC e estriado, nem em transições graduais de fotoperíodo que mimetizem as variações ambientais. Assim, os dados apresentados são originais e apontam para um efeito do fotoperíodo, particularmente mais acentuado no protocolo de transição gradual de fotoperíodo curto ao longo no ritmo circadiano molecular nestas estruturas.

Outros estudos nesta linhagem e em outros modelos são necessários para elucidar como o fotoperíodo pode afetar a morfologia e a eletrofisiologia do cérebro e o comportamento em mamíferos. Este trabalho contribui para a elucidação de como o cérebro se adapta sazonalmente, além disto, estudos posteriores baseados nestas evidências podem compreender como o fotoperíodo pode contribuir para o desencadeamento de distúrbios psiquiátricos, como transtorno afetivo sazonal, transtorno bipolar, depressão e suicídio.

7 CONCLUSÕES

Neste estudo apresentamos as primeiras evidências da modulação de diferentes regimes de fotoperíodo na expressão de genes que atuam no processo de neuroplasticidade (*Bdnf*) e na regulação do sistema temporizador circadiano (*Per2*), em estruturas cerebrais que se mostram alteradas em pacientes vítimas de suicídio.

Os nossos resultados mostram que o regime de transição gradual do curto ao longo modula a expressão de *Per2* e *Bdnf* em mPFC, possivelmente pela redução dos níveis destes transcritos.

A variação gradual no tempo de exposição à luz também modula a variação rítmica dos transcritos para *Per2* e *Bdnf* em estriado, levando a ausência da ritmicidade diária na expressão destes genes.

Tendo em vista que este estudo mostra evidências da modulação dos níveis de importantes transcritos para a neuroplasticidade e para o sistema temporizador circadiano, podemos sugerir que esta alteração seja resultante da inadaptação gradual e diária no tempo de exposição a luz.

REFERÊNCIAS

- ASCHOFF, J. Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. **Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.**, 25:11-28.
- ADAMAH-BIASSI, E. B. et al. Automated video analysis system reveals distinct diurnal behaviors in C57BL/6 and C3H/HeN mice. **Behavioural Brain Research**, v. 243, n. 1, p. 306–312, 2013.
- AGUILAR-ARNAL, L.; SASSONE-CORSI, P. Chromatin landscape and circadian dynamics: Spatial and temporal organization of clock transcription. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 2014, n. 22, p. 1–8, 2014.
- ALBRECHT, U. Timing to perfection: the biology of central and peripheral circadian clocks. **Neuron**, v. 74, n. 2, p. 246–60, 26 abr. 2012.
- ALVES, B. T. R. Trabalho por turnos na indústria: alterações do ciclo sono-vigília e impacto no cotidiano, individual e social, dos trabalhadores. 2013.
- AR, S.; SASSONE-CORSI, P. **Circadian Clocks**. [s.l.: s.n.]. v. 217
- BAEZ-MENDOZA, R.; SCHULTZ, W. The role of the striatum in social behavior. **Frontiers in Neuroscience**, v. 7, n. 7 DEC, p. 1–14, 2013.
- BANERJEE, R. et al. Decreased mRNA and protein expression of *BDNF*, *NGF*, and their receptors in the hippocampus from suicide: An analysis in human postmortem brain. **Clinical Medicine Insights: Pathology**, n. 6, p. 1–11, 2013.
- BARTKOWSKA, K. et al. Generation recruitment and death of brain cells throughout the life cycle of *Sorex* shrews (Lipotyphla). **European Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 7, p. 1710–1721, 2008.
- BASNET, S. et al. Seasonal variations in mood and behavior associate with common chronic diseases and symptoms in a population-based study. **Psychiatry Research**, v. 238, p. 181–188, 2016.
- BATAILLER, M. et al. Sensitivity to the photoperiod and potential migratory features of neuroblasts in the adult sheep hypothalamus. **Brain Structure and Function**, 2015.
- BECKWITH, E. J.; YANOVSKY, M. J. Circadian regulation of gene expression: at the crossroads of transcriptional and post-transcriptional regulatory networks. **Current opinion in genetics & development**, v. 27C, p. 35–42, 2014.
- BENEDITO-SILVA, A. A.; PIRES, M. L.; CALIL, H. M. Seasonal variation of suicide in Brazil. **Chronobiol Int**, v. 24, n. 4, p. 727–737, 2007.
- BIASSI-ADAMAH, E. B.; HUDSON, R. L.; DUBOCOVICH, M. L. Genetic Deletion of MT1 Melatonin Receptors Alters Spontaneous Behavioral Rhythms in Male and Female C57BL/6 Mice. v. 6, n. 2, p. 356–372, 2015.
- BOUCHARD-CANNON, P. et al. The Circadian Molecular Clock Regulates Adult Hippocampal Neurogenesis by Controlling the Timing of Cell-Cycle Entry and Exit. **Cell**

Reports, v. 5, n. 4, p. 961–973, 2013.

BOULOS, Z.; TERMAN, M. Food availability and daily biological rhythms. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 4, n. 2, p. 119–131, 1980.

BRENNAN, P. J. et al. Seasonal variation in arterial blood pressure. **British medical journal (Clinical research ed.)**, v. 285, n. 6346, p. 919–923, 1982.

BRONSON, F. H. Are Humans Seasonally Photoperiodic? **Journal of Biological Rhythms**, v. 19, n. 3, p. 180–192, 2004.

BUIJS, F. N. et al. The Circadian System: A Regulatory Feedback Network of Periphery and Brain. **Physiology (Bethesda, Md.)**, v. 31, n. 3, p. 170–81, 2016.

BUIJS, R. M. et al. Chapter 20: Organization of circadian functions: interaction with the body. **Progress in Brain Research**, v. 153, n. 6, p. 341–360, 2006.

BUTTGEREIT, F. et al. Clocking in: chronobiology in rheumatoid arthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 11, n. 6, p. 1–8, 2015.

CASSIDY, F.; CARROLL, B. J. Seasonal variation of mixed and pure episodes of bipolar disorder. **Journal of Affective Disorders**, v. 68, n. 1, p. 25–31, 2002.

CHANG, L. et al. Elevation of peripheral *BDNF* promoter methylation links to the risk of Alzheimer's disease. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, 2014.

CHRISTODOULOU, C. et al. Suicide and seasonality. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, v. 125, n. 2, p. 127–146, 2012.

COIMBRA, D. G. et al. Do suicide attempts occur more frequently in the spring too? A systematic review and rhythmic analysis. **Journal of affective disorders**, v. 196, p. 125–37, 15 maio 2016.

COOMANS, C. P.; RAMKISOENSING, A.; MEIJER, J. H. The suprachiasmatic nuclei as a seasonal clock. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 37, p. 29–42, 2015.

DESMYTER, S.; HEERINGEN, C. VAN; AUDENAERT, K. Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry Structural and functional neuroimaging studies of the suicidal brain. **Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 35, n. 4, p. 796–808, 2011.

DISANTO, G. et al. Seasonal distribution of psychiatric births in england. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. 7–10, 2012.

DOLCI, C. et al. Circadian variations in expression of the *trkB* receptor in adult rat hippocampus. **Brain Research**, v. 994, n. 1, p. 67–72, 2003.

DULCIS, D. et al. Neurotransmitter switching in the adult brain regulates behavior. **Science (New York, N.Y.)**, v. 340, n. 6131, p. 449–53, 2013.

EAGLES, J.; SHAND, A. TAKE-HOME NOTES : Seasonal affective disorder (SAD): Part 1 – history , epidemiology , aetiology and diagnosis. p. 1–2, 2015.

EISEN, R. B. et al. Exploring the Association between Serum *BDNF* and Attempted Suicide. **Scientific Reports**, v. 6, n. April, p. 25229, 2016.

- FERGUSON, S. A.; MAIER, K. L. A review of seasonal/circannual effects of laboratory rodent behavior. **Physiology and Behavior**, v. 119, p. 130–136, 2013.
- FOSTER, R. G.; ROENNEBERG, T. Human Responses to the Geophysical Daily, Annual and Lunar Cycles. **Current Biology**, v. 18, n. 17, p. 784–794, 2008.
- GOEL, N.; LEE, T. M.; PIEPER, D. R. Removal of the olfactory bulbs delays photic reentrainment of circadian activity rhythms and modifies the reproductive axis in male *Octodon degus*. **Brain Research**, v. 792, n. 2, p. 229–236, 1998.
- GOLDMAN, B. D. Mammalian photoperiodic system: formal properties and neuroendocrine mechanisms of photoperiodic time measurement. **Journal of biological rhythms**, v. 16, n. 4, p. 283–301, 2001.
- GORDON, D. J. et al. Seasonal cholesterol cycles: the Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial placebo group. **Circulation**, v. 76, n. 6, p. 1224–1231, 1987.
- GRATACÒS, M. et al. Brain-derived neurotrophic factor Val66Met and psychiatric disorders: meta-analysis of case-control studies confirm association to substance-related disorders, eating disorders, and schizophrenia. **Biological psychiatry**, v. 61, n. 7, p. 911–22, 1 abr. 2007.
- GREEN, N. H. et al. Photoperiod programs dorsal raphe serotonergic neurons and affective behaviors. **Current Biology**, v. 25, n. 10, p. 1389–1394, 2015.
- GRIMM, S. et al. Increased self-focus in major depressive disorder is related to neural abnormalities in subcortical-cortical midline structures. **Human Brain Mapping**, v. 30, n. 8, p. 2617–2627, 2009.
- GUILDING, C.; PIGGINS, H. D. Challenging the omnipotence of the suprachiasmatic timekeeper: Are circadian oscillators present throughout the mammalian brain? **European Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 11, p. 3195–3216, 2007.
- GUO, H. et al. Suprachiasmatic Regulation of Circadian Rhythms of Gene Expression in Hamster Peripheral Organs : Effects of Transplanting the Pacemaker. v. 26, n. 24, p. 6406–6412, 2006.
- HEERLEIN, A.; VALERIA, C.; MEDINA, B. Seasonal variation in suicidal deaths in Chile: Its relationship to latitude. **Psychopathology**, v. 39, n. 2, p. 75–79, 2006.
- HILTUNEN, L. et al. Relationship between daylength and suicide in Finland. **Journal of Circadian Rhythms**, v. 9, n. 1, p. 10, 2011.
- HOFMAN, M. A.; SWAAB, D. F. A brain for all seasons: Cellular and molecular mechanisms of photoperiodic plasticity. **Progress in Brain Research**, v. 138, p. 255–280, 2002.
- IASKIN, V. A. [Seasonal changes in hippocampus size and spatial behaviour in mammals and birds]. **Zhurnal obshche?? biologii**, v. 72, n. 1, p. 27–39, 2011.
- IHKUNI, N. et al. What's in season for rheumatoid arthritis patients? Seasonal fluctuations in disease activity. **Rheumatology (Oxford, England)**, v. 46, n. 5, p. 846–848, 2007.
- IKENO, T.; WEIL, Z. M.; NELSON, R. J. morphology of siberian hamsters. v. 30, n. 9, p.

1089–1100, 2013.

JIANG, W. G. et al. Chronic unpredictable stress induces a reversible change of *PER2* rhythm in the suprachiasmatic nucleus. **Brain Research**, v. 1399, p. 25–32, 2011.

JOHNSON, M. K. et al. Medial cortex activity, self-reflection and depression. **Social Cognitive and Affective Neuroscience**, v. 4, n. 4, p. 313–327, 2009.

KARATSOREOS, I. N. et al. Disruption of circadian clocks has ramifications for metabolism, brain, and behavior. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 4, p. 1657–1662, 2011.

LAI, C.-H. Gray matter volume in major depressive disorder: a meta-analysis of voxel-based morphometry studies. **Psychiatry research**, v. 211, n. 1, p. 37–46, 2013.

LEWANDOWSKI, M. H.; USAREK, A. Effects of intergeniculate leaflet lesions on circadian rhythms in the mouse. **Behavioural Brain Research**, v. 128, n. 1, p. 13–17, 2002.

LIANG, F. Q.; ALLEN, G.; EARNEST, D. Role of brain-derived neurotrophic factor in the circadian regulation of the suprachiasmatic pacemaker by light. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 20, n. 8, p. 2978–2987, 2000.

LOWREY, P. L.; TAKAHASHI, J. S. MAMMALIAN CIRCADIAN BIOLOGY: Elucidating Genome-Wide Levels of Temporal Organization. **Annu. Rev. Genomics Hum. Genet**, v. 5, p. 407–41, 2004.

MARTIN-FAIREY, C. A.; NUNEZ, A. A. Circadian modulation of memory and plasticity gene products in a diurnal species. **Brain Research**, v. 1581, p. 30–39, 2014.

MCCLUNG, C. A. Circadian genes, rhythms and the biology of mood disorders. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 114, n. 2, p. 222–232, 2007.

MEYER, C. et al. Seasonality in human cognitive brain responses. p. 1–6, 2016.

MEYER, J. H. et al. Brain Serotonin Transporter Binding Potential Measured With Carbon 11-Labeled DASB Positron Emission Tomography. **Arch Gen Psychiatry**, v. 61, n. 12, p. 1271–1279, 2004.

MIGAUD, M. et al. Seasonal changes in cell proliferation in the adult sheep brain and pars tuberalis. **Journal of biological rhythms**, v. 26, n. 6, p. 486–496, 2011.

MILLER, M. A. et al. Photoperiod Is Associated With Hippocampal Volume in a Large Community Sample. v. i, p. 534–543, 2015.

MOLENDIJK, M. L. et al. Serum *BDNF* Concentrations Show Strong Seasonal Variation and Correlations with the Amount of Ambient Sunlight. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, p. 1–7, 2012.

MORAES, L. R. B. **Estudo do envolvimento do *mPFC* medial de ratos nas respostas comportamentais observadas no modelo do lambar punido de Vogel: uma possível via receptores NMDA/ óxido nítrico e endocanabinoides**, 1 ago. 2009. Disponível em: <http://www.bv.fapesp.br/pt/auxilios/25446/estudo-do-envolvimento-do-cortex-pre-frontal-medial-de-ratos-nas-respostas-comportamentais-observada/#.VyI_S2Uc5oc.mendeley>. Acesso em: 28 abr. 2016

- NUMATA, H; HELM, B. **Annual , Lunar , and Tidal Clocks: Patterns and Mechanisms of Nature's Enigmatic Rhythms.** [s.l: s.n.].
- PASCUAL, M.; DOBSON, A. Seasonal patterns of infectious diseases. **PLoS Medicine**, v. 2, n. 1, p. 0018–0020, 2005.
- PASKA, A. V.; ZUPANC, T.; PREGELJ, P. The role of brain-derived neurotrophic factor in the pathophysiology of suicidal behavior. **Psychiatria Danubina**, v. 25, n. SUPPL.2, p. 341–344, 2013.
- PATTEN, S. B. et al. Seasonal variation in major depressive episode prevalence in Canada. **Epidemiology and psychiatric sciences**, p. 1–8, 2016.
- PELL, J. P.; COBBE, S. M. Seasonal variations in coronary heart disease. **Qjm-Monthly Journal of the Association of Physicians**, v. 92, n. 12, p. 689–696, 1999.
- PRIYA, P. K. et al. Association of neurotrophins, inflammation and stress with suicide risk in young adults. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 457, p. 41–45, 2016.
- PYTER, L. M.; READER, B. F.; NELSON, R. J. Short Photoperiods Impair Spatial Learning and Alter Hippocampal Dendritic Morphology in Adult Male White-Footed Mice (*Peromyscus leucopus*). v. 25, n. 18, p. 4521–4526, 2005.
- QUILES, C. L. et al. Biological adaptability under seasonal variation of light/dark cycles. **Chronobiology International**, v. 528, n. May, p. 1–8, 2016.
- RATH, M. F.; ROVSING, L.; MØLLER, M. Circadian oscillators in the mouse brain : molecular clock components in the neocortex and cerebellar cortex. p. 743–755, 2014.
- RAWASHDEH, O. et al. PERIOD1 Coordinates Hippocampal Rhythms and Memory Processing With Daytime. v. 723, n. February, p. 712–723, 2014.
- REPPERT, S. M.; WEAVER, D. R. Coordination of circadian timing in mammals. **Nature**, v. 418, n. 6901, p. 935–41, 2002.
- REUSS, S.; FUCHS, E. Anterograde tracing of retinal afferents to the tree shrew hypothalamus and raphe. **Brain Research**, v. 874, n. 1, p. 66–74, 2000.
- ROCK, D.; GREENBERG, D.; HALLMAYER, J. Season-of-birth as a risk factor for the seasonality of suicidal behaviour. **European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience**, v. 256, n. 2, p. 98–105, 2006.
- SILVA, M. M. A.; ALBUQUERQUE, A. M.; ARAUJO, J. F. Light-dark cycle synchronization of circadian rhythm in blind primates. **Journal of circadian rhythms**, v. 3, p. 10, 2005.
- SPIJKER, S. Chapter 2 Dissection of Rodent Brain Regions. v. 57, p. 13–26, [s.d.].
- TOURNIER, B. B. et al. Photoperiod differentially regulates clock genes' expression in the suprachiasmatic nucleus of Syrian hamster. **Neuroscience**, v. 118, n. 2, p. 317–322, 2003.
- TRAMONTIN, A. D.; BRENOWITZ, E. A. Seasonal plasticity in the adult brain. p. 251–258, 1999.

VOLPE, F. M. et al. Further evidence of seasonality of mania in the tropics. **Journal of Affective Disorders**, v. 124, n. 1–2, p. 178–182, 2010.

WALTON, J. C. et al. Photoperiodic regulation of hippocampal neurogenesis in adult male white-footed mice (*Peromyscus leucopus*). **European Journal of Neuroscience**, v. 40, n. April, p. 2674–2679, 2014.

WANG, L. M.-C. et al. Expression of the circadian clock gene *Period2* in the hippocampus: possible implications for synaptic plasticity and learned behaviour. **ASN neuro**, v. 1, n. 3, p. 139–152, 2009.

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

YASUO, S. et al. Circadian clock genes and photoperiodism: Comprehensive analysis of clock gene expression in the mediobasal hypothalamus, the suprachiasmatic nucleus, and the pineal gland of Japanese quail under various light schedules. **Endocrinology**, v. 144, n. 9, p. 3742–3748, 2003.

YOSHIMURA, S. et al. Rostral anterior cingulate cortex activity mediates the relationship between the depressive symptoms and the medial prefrontal cortex activity. **Journal of Affective Disorders**, v. 122, n. 1–2, p. 76–85, 2010.

ZHANG, R. et al. A circadian gene expression atlas in mammals: implications for biology and medicine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 45, p. 16219–24, 2014.

ZYLKA, M. J. et al. Three period homologs in mammals: Differential light responses in the suprachiasmatic circadian clock and oscillating transcripts outside of brain. **Neuron**, v. 20, n. 6, p. 1103–1110, 1998.

ANEXO 1

Tabela 1 - Dados de quantificação por espectrofotometria de ácido ribonucleico das amostras utilizados para quantificação relativa por qPCR para os 5 grupos e 2 ZTs de coleta.

Tecido/grupo	Animal	Concentração ng/uL	260/280	260/230	230	260	280	340
Estriado/ZT06G1	1	90	2,130	2,530	0,078	0,198	0,093	0,000
	2	105	2,150	1,860	0,123	0,229	0,107	0,000
	3	121	2,140	2,430	0,109	0,265	0,124	0,000
	4	124	2,250	2,160	0,126	0,273	0,121	0,000
Estriado/ZT06G2	1	84	2,450	2,470	0,750	0,184	0,075	0,000
	2	83	2,550	2,200	0,830	0,182	0,071	0,000
	3	109	2,270	2,570	0,093	0,238	0,105	0,000
	4	122	2,150	2,320	0,110	0,267	0,124	0,000
Estriado/ZT06G3	1	108	2,370	2,460	0,096	0,236	0,100	0,000
	2	91	2,500	2,730	0,073	0,199	0,800	0,000
	3	117	2,170	2,370	0,108	0,257	0,118	0,006
	4	121	2,220	2,460	0,108	0,266	0,120	0,007
Estriado/ZT06G4	1	92	2,180	2,460	0,082	0,201	0,092	0,003
	2	105	2,120	2,680	0,086	0,23	0,108	0,001
	3	114	2,120	2,560	0,098	0,251	0,118	0,008
	4	120	2,220	2,610	0,101	0,263	0,118	0,005
Estriado/ZT06G5	1	112	2,410	2,750	0,089	0,245	0,102	0,005
	2	132	2,160	2,270	0,128	0,290	0,135	0,005
	3	38	5,180	2,500	0,034	0,084	0,016	0,004
	4	83	2,530	2,790	0,065	0,183	0,072	0,007
Estriado/ZT18G1	1	90	2,240	2,520	0,078	0,197	0,088	0,011
	2	85	2,300	2,580	0,072	0,186	0,081	0,015
	3	68	2,630	2,180	0,068	0,148	0,056	0,013
	4	150	2,200	1,060	0,310	0,329	0,149	0,011
Estriado/ZT18G2	1	93	2,440	1,390	0,147	0,205	0,084	0,011
	2	80	2,470	1,960	0,089	0,176	0,071	0,015
	3	94	2,350	2,530	0,081	0,206	0,088	0,008
	4	97	2,320	1,530	0,139	0,213	0,092	0,013
Estriado/ZT18G3	1	106	2,300	2,550	0,091	0,232	0,101	0,009
	2	112	2,240	2,760	0,089	0,245	0,110	0,010
	3	107	2,270	2,920	0,080	0,235	0,104	0,011

	4	140	2,220	2,480	0,124	0,307	0,138	0,011
Estriado/ZT18G4	1	39	3,630	1,150	0,074	0,085	0,023	0,019
	2	35	4,580	1,940	0,040	0,077	0,017	0,020
	3	46	1,790	1,450	0,069	0,101	0,056	0,004
	4	107	1,860	0,410	0,567	0,234	0,126	0,004
Estriado/ZT18G5	1	68	2,030	1,110	0,135	0,150	0,074	0,004
	2	114	1,990	1,540	0,162	0,249	0,125	0,002
	3	83	1,890	1,990	0,092	0,182	0,096	0,005
	4	118	1,860	1,970	0,131	0,259	0,140	0,000
mPFC/ZT06G1	1	-	-	-	-	-	-	-
	2	106	1.77	0.12	1.871	0.233	0.132	0.006
	3	59	1.77	0.09	1.476	0.129	0.073	0.004
	4	46	1.78	0.13	0.770	0.102	0.057	0.000
mPFC/ZT06G2	1	64	1.88	0.06	2.195	0.141	0.075	0.000
	2	94	1.82	0.13	1.605	0.206	0.113	0.005
	3	90	1.82	0.09	2.217	0.197	0.008	0.006
	4	63	1.84	0.07	2.055	0.138	0.075	0.004
mPFC/ZT06G3	1	121	1.76	-----	++++	0.265	0.151	0.007
	2	84	1.92	0.08	2.393	0.184	0.096	0.002
	3	120	1.82	0.14	1.938	0.262	0.144	0.008
	4	142	1.85	0.13	2.393	0.311	0.169	0.006
mPFC/ZT06G4	1	33	1.94	0.03	2.284	0.073	0.038	0.007
	2	115	1.83	0.12	2.124	0.252	0.138	0.011
	3	91	1.87	0.14	1.463	0.200	0.107	0.001
	4	40	1.92	0.08	1.030	0.087	0.045	0.009
mPFC/ZT06G5	1	94	1.86	-----	++++	0.207	0.111	0.001
	2	103	1.80	0.13	1.675	0.226	0.125	0.015
	3	80	2.24	0.14	1.215	0.175	0.078	0.003
	4	-	-	-	-	-	-	-
mPFC/ZT18G1	1	60	1.94	0.06	2.238	0.132	0.068	0.005
	2	92	1.89	0.13	1.525	0.201	0.107	0.001
	3	39	2.01	0.04	1.989	0.084	0.042	0.007
	4	90	1.91	-----	++++	0.197	0.103	0.008
mPFC/ZT18G2	1	91	1.92	0.08	2.442	0.200	0.104	0.008
	2	119	1.89	0.13	2.040	0.261	0.139	0.008
	3	92	1.86	0.12	1.678	0.202	0.109	0.006

	4	84	1.90	0.12	1.493	0.185	0.098	0.002
mPFC/ZT18G3	1	59	1.87	0.12	1.051	0.130	0.069	0.008
	2	133	1.86	0.23	1.245	0.291	0.156	0.007
	3	58	1.94	-----	++++	0.126	0.065	0.009
	4	77	1.97	-----	++++	0.169	0.086	0.003
mPFC/ZT18G4	1	49	1.95	0.07	1.567	0.107	0.055	0.007
	2	50	2.08	-----	++++	0.110	0.053	0.003
	3	76	1.91	0.12	1.387	0.167	0.088	0.005
	4	33	2.13	-----	++++	0.073	0.034	0.007
mPFC/ZT18G5	1	78	1.81	0.15	1.119	0.172	0.095	0.013
	2	67	1.86	0.07	1.994	0.147	0.079	0.009
	3	65	1.80	0.18	0.796	0.142	0.079	0.008
	4	101	1.76	0.24	0.920	0.222	0.126	0.008

ANEXO 2

Tabela 2 - Dados da quantificação por espectrofotometria de ácidos ribonucleicos utilizados na quantificação relativa por qPCR.

Amostra	Concentração ng/uL	260/280	260/230	230,00	260,000	280,000	340,000
mPFC 12:12 ZT02.1	23,0	1,87	0,29	0,176	0,051	0,027	-0,001
mPFC 12:12 ZT02.2	42,0	1,83	0,91	0,100	0,091	0,050	-0,002
mPFC 12:12 ZT02.3	65,0	1,76	0,71	0,200	0,143	0,082	-0,001
mPFC 12:12 ZT02.4	54,0	1,68	1,40	0,084	0,117	0,070	0,000
mPFC 12:12 ZT06.1	138,0	1,72	1,27	0,237	0,303	0,175	0,000
mPFC 12:12 ZT06.2	150,0	1,73	0,37	0,877	0,328	0,190	0,000
mPFC 12:12 ZT06.3	182,0	1,64	0,37	1,069	0,399	0,243	0,020
mPFC 12:12 ZT06.4	147,0	1,74	0,27	1,172	0,322	0,185	0,000
mPFC 12:12 ZT10.1	43,0	1,81	0,95	0,100	0,095	0,053	0,000
mPFC 12:12 ZT10.2	132,0	1,71	1,16	0,249	0,289	0,169	0,000
mPFC 12:12 ZT10.3	98,0	1,75	0,96	0,224	0,216	0,123	0,000
mPFC 12:12 ZT10.4	99,0	1,67	1,77	0,123	0,217	0,130	-0,001
mPFC 12:12 ZT14.1	137,0	1,73	0,97	0,309	0,301	0,174	0,001
mPFC 12:12 ZT14.2	124,0	1,61	1,98	0,137	0,272	0,169	0,000
mPFC 12:12 ZT14.3	150,0	1,63	1,39	0,236	0,328	0,202	0,007
mPFC 12:12 ZT14.4	207,0	1,65	1,65	0,275	0,454	0,275	0,001
mPFC 12:12 ZT18.1	128,0	1,74	0,58	0,486	0,281	0,162	0,000
mPFC 12:12 ZT18.2	139,0	1,71	0,46	0,669	0,305	0,179	0,000
mPFC 12:12 ZT18.3	173,0	1,74	0,35	1,101	0,380	0,218	0,000
mPFC 12:12 ZT18.4	136,0	1,71	1,40	0,213	0,298	0,174	0,000
mPFC 12:12 ZT22.1	93,0	1,68	1,21	0,167	0,203	0,121	0,000
mPFC 12:12 ZT22.2	88,0	1,72	1,06	0,183	0,193	0,112	0,000

mPFC 12:12 ZT22.3	97,0	1,76	0,63	0,338	0,212	0,121	0,000
mPFC 12:12 ZT22.4	104,0	1,74	1,61	0,142	0,229	0,132	0,000
Estriado 12:12 ZT02.1	106,0	1,890	0,150	1,549	0,231	0,123	0,000
Estriado 12:12 ZT02.2	222,0	1,840	0,420	1,172	0,487	0,265	0,003
Estriado 12:12 ZT02.3	257,0	1,810	0,670	0,840	0,564	0,311	0,000
Estriado 12:12 ZT02.4	267,0	1,880	0,270	2,143	0,586	0,312	0,000
Estriado 12:12 ZT06.1	312,0	1,840	0,410	1,664	0,684	0,371	0,001
Estriado 12:12 ZT06.2	302,0	1,870	0,350	1,894	0,663	0,354	0,000
Estriado 12:12 ZT06.3	306,0	1,800	0,320	2,129	0,672	0,372	0,000
Estriado 12:12 ZT06.4	270,0	1,840	0,470	1,268	0,593	0,323	0,000
Estriado 12:12 ZT10.1	323,0	1,860	0,330	2,151	0,708	0,381	0,000
Estriado 12:12 ZT10.2	335,0	1,920	4 traços	+++++	0,735	0,382	0,000
Estriado 12:12 ZT10.3	357,0	1,860	0,410	1,925	0,782	0,421	0,000
Estriado 12:12 ZT10.4	388,0	1,800	0,860	0,992	0,851	0,474	0,000
Estriado 12:12 ZT14.1	345,0	1,790	0,530	1,431	0,756	0,421	0,000
Estriado 12:12 ZT14.2	425,0	1,850	---	++++	0,933	0,503	0,000
Estriado 12:12 ZT14.3	271,0	1,900	0,240	2,509	0,594	0,312	0,000
Estriado 12:12 ZT14.4	329,0	1,900	---	+++	0,722	0,379	0,000
Estriado 12:12 ZT18.1	259,0	1,870	0,250	2,240	0,569	0,303	0,000
Estriado 12:12 ZT18.2	210,0	1,960	0,180	2,545	0,460	0,235	0,000
Estriado 12:12 ZT18.3	278,0	1,890	----	++++	0,610	0,323	0,001
Estriado 12:12 ZT18.4	254,0	1,860	0,280	2,010	0,557	0,300	0,000
Estriado 12:12 ZT22.1	322,0	1,910	0,300	2,339	0,706	0,370	0,000
Estriado 12:12 ZT22.2	243,0	1,860	0,260	2,044	0,532	0,286	0,000
Estriado 12:12 ZT22.4	252,0	1,810	0,520	1,057	0,554	0,307	0,000
mPFC TCL ZT02.1	76,000	1,760	0,190	0,900	0,167	0,095	0,000
mPFC TCL ZT02.2	152,000	1,740	0,180	1,877	0,333	0,192	0,006

mPFC TCL ZT02.3	29,000	1,640	0,190	0,325	0,063	0,039	0,002
mPFC TCL ZT02.4	52,000	1,700	0,240	0,480	0,110	0,067	0,002
mPFC TCL ZT06.1	66,000	1,760	0,120	1,159	0,144	0,082	0,001
mPFC TCL ZT06.2	61,000	1,770	0,120	1,111	0,135	0,076	0,001
mPFC TCL ZT06.3	47,000	1,740	0,150	0,700	0,104	0,060	0,001
mPFC TCL ZT06.4	88,000	1,850	0,090	2,110	0,193	0,104	0,011
mPFC TCL ZT10.1	62,000	1,680	0,290	0,466	0,137	0,081	0,000
mPFC TCL ZT10.2	51,000	1,750	0,180	0,632	0,112	0,064	0,000
mPFC TCL ZT10.3	47,000	1,790	0,010	1,012	0,103	0,058	0,000
mPFC TCL ZT10.4	171,000	1,760	0,180	2,032	0,375	0,213	0,010
mPFC TCL ZT14.1	119,000	1,830	0,100	2,514	0,261	0,143	0,005
mPFC TCL ZT14.2	101,000	1,800	0,150	1,441	0,221	0,123	0,002
mPFC TCL ZT14.3	59,000	1,750	0,090	1,360	0,120	0,070	0,000
mPFC TCL ZT14.4	89,000	1,700	0,180	1,111	0,196	0,115	0,003
mPFC TCL ZT18.1	65,000	1,770	0,100	1,494	0,140	0,081	0,000
mPFC TCL ZT18.2	104,000	1,720	0,170	1,361	0,227	0,132	0,002
mPFC TCL ZT18.3	158,000	1,630	0,160	2,205	0,347	0,212	0,050
mPFC TCL ZT18.4	141,000	1,540	0,250	1,240	0,309	0,200	0,064
mPFC TCL ZT22.1	125,000	1,330	0,290	0,960	0,274	0,205	0,119
mPFC TCL ZT22.2	246,000	1,650	----	++++	0,539	0,327	0,071
mPFC TCL ZT22.3	254,000	1,580	0,310	1,790	0,557	0,353	0,070
mPFC TCL ZT22.4	147,000	1,530	0,240	1.35	0.323	0,211	0,070
Estriado TCL ZT02.1	228,000	1,840	0.53	0,939	0,501	0,273	0,003
Estriado TCL ZT02.2	270,0	1,770	0,770	0,777	0,592	0,335	0,011
Estriado TCL ZT02.3	347,000	1,850	0,440	1,726	0,761	0,412	0,009
Estriado TCL ZT02.4	272,000	1,840	0,670	0,888	0,597	0,325	0,006
Estriado TCL ZT06.1	319,000	1,870	0,380	1,827	0,700	0,373	0,004

Estriado TCL ZT06.2	291,000	1,920	0,510	1,256	0,639	0,333	0,014
Estriado TCL ZT06.3	218,000	1,820	0,210	2,322	0,477	0,262	0,002
Estriado TCL ZT06.4	248,000	1,810	0,610	0,900	0,544	0,300	0,001
Estriado TCL ZT10.1	348,000	1,880	0,370	2,080	0,736	0,406	0,010
Estriado TCL ZT10.2	277,000	1,820	0,620	0,985	0,608	0,334	0,002
Estriado TCL ZT10.3	230,000	1,850	0,220	2,282	0,505	0,272	0,006
Estriado TCL ZT10.4	272,000	1,820	0,590	1,010	0,596	0,328	0,000
Estriado TCL ZT14.1	305,000	1,890	0,460	1,461	0,669	0,353	0,000
Estriado TCL ZT14.2	317,000	1,890	0,600	1,159	0,696	0,368	0,000
Estriado TCL ZT14.3	317,000	1,780	0,860	0,812	0,695	0,390	0,000
Estriado TCL ZT14.4	316,000	1,790	0,500	1,388	0,694	0,389	0,004
Estriado TCL ZT18.1	232,000	1,780	0,500	1,009	0,508	0,286	0,000
Estriado TCL ZT18.2	337,000	1,850	0,360	2,044	0,740	0,399	0,000
Estriado TCL ZT18.3	288,000	1,790	0,370	1,720	0,632	0,353	0,004
Estriado TCL ZT18.4	340,000	1,750	0,720	1,041	0,745	0,426	0,013
Estriado TCL ZT22.1	337,000	1,820	0,330	2,248	0,738	0,406	0,005
Estriado TCL ZT22.2	390,000	1,750	0,840	1,021	0,855	0,489	0,012
Estriado TCL ZT22.3	227,000	1,910	0,200	2,488	0,499	0,261	0,008
Estriado TCL ZT22.4	431,000	1,820	0,410	2,318	0,944	0,518	0,007

Fonte: Autora

APÊNDICE A



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Estudo da interação entre a proteína de matriz extracelular decorina e o processo de aprendizado e memória modulado pelo ritmo circadiano”, **Protocolo nº 56/2015**, sob a responsabilidade de *Tiago Gomes de Andrade*, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alagoas (CEUA/UFAL), em reunião de 16.10.2015.

Vigência do Projeto	10.12.2015 a 30.03.2017
Espécie/linhagem	Camundongo isogênico/C57BL/6
Nº de animais	200
Peso/idade	8-12 semanas
Sexo	Machos
Origem/Local de manutenção	Biotério Central da UFAL/Laboratório de comportamento animal da Universidade Federal de Alagoas - Campus Arapiraca

Maceió, 21 de outubro de 2015.


Prof.ª Dr.ª Silvana Ayres Martins
Coordenadora CEUA/UFAL

Prof.ª Dr.ª Silvana Ayres Martins
Coordenadora da Comissão de
Ética no uso de Animais
SIAPE 1120858



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



DECLARAÇÃO

Declaramos, para os devidos fins, que em atendimento à solicitação do Prof. Dr. Tiago Gomes de Andrade, do Campus Arapiraca da Universidade Federal de Alagoas – UFAL, a Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFAL, em reunião ordinária realizada em 15.01.2016, autorizou a mudança de título do **Protocolo nº 56/2015**, para “Estudo da interação entre ritmos circadianos e neuroplasticidade em mamíferos modulados por variações genéticas e ambientais”. Uma vez que o pesquisador responsável ventila a possibilidade de reutilização de materiais biológicos provenientes do referido protocolo em outros projetos de pesquisa, ressaltamos que este procedimento deverá ser comunicado previamente à CEUA.

Maceió, 21 de janeiro de 2016.

Profa. Dra. Silvana Ayres Martins
Coordenadora da CEUA/UFAL

Profa. Dra. Silvana Ayres Martins
Coordenadora da Comissão de
Ética no uso de Animais
SIAPE 1120858