



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**DESSINCRONIZAÇÃO FORÇADA DA ATIVIDADE/REPOUSO
DURANTE O PERÍODO GESTACIONAL DE RATAS WISTAR: QUAIS
AS CONSEQUÊNCIAS SOBRE OS PARÂMETROS
CARDIOMETABÓLICOS OBSERVADAS NA PROLE?**

ISABELA CRISTINA MAIONI XAVIER

GOIÂNIA-GO

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES**

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

☒ Dissertação ☐ Tese

2. Nome completo do autor

Isabela Crisna Maioni Xavier

3. Título do trabalho

Dessincronização forçada da atividade/repouso durante o período gestacional de ratas Wistar: quais as consequências sobre os parâmetros cardiometabólicos observadas na prole?

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser

preenchido pelo orientador) Concorda com a liberação total do

documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante: **a)** consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a); **b)** novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.

1 of 2 10/01/2022 13:36 SEI/UFG - 2042061 - Termo de Ciência e de Autorização (TECA)
https://sei.ufg.br/sei/controlador.php?acao=documento_imprimir_web&...



Documento assinado eletronicamente por **Daniel Alves Rosa, Professor do Magistério Superior**, em 10/01/2022, às 09:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **ISABELA CRISTINA MAIONI XAVIER, Discente**, em 10/01/2022, às 10:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2042061** e o código CRC **F12FAF59**.

ISABELA CRISTINA MAIONI XAVIER

**DESSINCRONIZAÇÃO FORÇADA DA ATIVIDADE/REPOUSO
DURANTE O PERÍODO GESTACIONAL DE RATAS WISTAR: QUAIS
AS CONSEQUÊNCIAS SOBRE OS PARÂMETROS
CARDIOMETABÓLICOS OBSERVADAS NA PROLE?**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Farmacologia e Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Daniel Alves Rosa

GOIÂNIA-GO

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de
Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Xavier, Isabela Cristina Maioni

Dessincronização forçada da atividade/repouso durante o período gestacional de ratas Wistar: quais as consequências sobre os parâmetros cardiometabólicos observadas na prole? [manuscrito] / Isabela Cristina Maioni Xavier. 2021.

LXVIII, 68 f.

Orientador: Prof. Daniel Alves Rosa.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Goiânia, 2021.

Inclui siglas, abreviaturas, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. dessincronização circadiana. 2. distúrbios cardiometabólicos. 3. gestação. 4. programação fetal. 5. relógio circadiano. I. Rosa, Daniel Alves, orient. II. Título.

CDU 612.1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata nº 524 da sessão de Defesa de Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, que confere a **Isabela Cristina Maioni Xavier** o título de Mestra em Ciências Biológicas, na área de concentração em Farmacologia e Fisiologia.

Aos vinte e sete dias do mês de abril de 2021, a partir das 09:15 horas, por videoconferência, realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação intitulada “Dessincronização forçada da atividade/repouso durante o período gestacional de ratas Wistar: quais as consequências sobre os parâmetros cardiometabólicos observadas na prole?”. Os trabalhos foram instalados pelo Orientador, Professor Doutor Daniel Alves Rosa (ICB - UFG) com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professor Doutor John Fontenele Araujo, membro titular externo; Professora Doutora Elizabeth Pereira Mendes (ICB - UFG), membro titular externo. Durante a arguição os membros da banca **não fizeram** sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Dissertação, tendo sido a candidata **aprovada** pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo Professor Doutor Daniel Alves Rosa, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos vinte e sete dias do mês de abril de 2021,

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Daniel Alves Rosa, Professor do Magistério Superior**, em 27/04/2021, às 12:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Elizabeth Pereira Mendes, Professor do Magistério Superior**, em 27/04/2021, às 12:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Henrique De Castro, Coordenador de Pós graduação**, em 03/05/2021, às 10:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_ace_sso_externo=0, informando o código verificador **2025236** e o código CRC **C6FC9D76**.

1 of 2 10/01/2022 09:03 SEI/UFG - 2025236 - Ata de Defesa de Dissertação
https://sei.ufg.br/sei/controlador.php?acao=documento_imprimir_web&...

Referência: Processo nº 23070.020800/2021-51

SEI nº 2025236

2 of 2 10/01/2022 09:03

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, de extrema importância no incentivo e fonte de inspiração.

Ao meu orientador, professores colaboradores e colegas de laboratório pelos ensinamentos e apoio.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois sem Ele as portas não teriam sido abertas e a coragem e força para enfrentar os obstáculos não teriam sido possíveis.

Aos meus pais que nunca mediram esforços para me ver alcançar meus objetivos e que sempre me incentivaram e me apoiaram.

As minhas irmãs, minha inspiração, a quem sempre pude recorrer frente às dificuldades, agradeço por tanto me motivar.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Daniel Alves Rosa, por sempre compreender minhas dificuldades e me incentivar a contorná-las com sabedoria. Por incentivar o aprendizado de forma crítica, agradeço por ser um professor exemplo ao meu futuro profissional.

Aos meus colegas de laboratório, por me guiarem pelo caminho, por vezes me fazendo tomar escolhas mais sábias através de conselhos valiosos. Obrigada pelo tempo dedicado a colaborar com meu aprendizado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pelo apoio financeiro nesta pesquisa.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	VI
LISTA DE FIGURAS	VI
LISTA DE TABELAS	VII
RESUMO	VIII
ABSTRACT	X
IMPACTO E RELEVÂNCIA DA PESQUISA PARA SOCIEDADE	XII
1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	25
2.1 OBJETIVO GERAL	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3 MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	26
3.2 PROTOCOLO DE DESSINCRONIZAÇÃO FORÇADA DO RITMO ATIVIDADE/REPOUSO CIRCADIANO	27
3.3 PROLE	28
3.4 TESTE INTRAPERITONEAL DE TOLERÂNCIA À INSULINA (ipTTI) E TESTE ORAL DE TOLERÂNCIA À GLICOSE (oTTG)	29
3.5 TESTE DE INGESTÃO DE LEITE	30
3.6 PLETISMOGRAFIA DE CAUDA	30
3.7 COLETA DE TECIDOS	31
3.8 ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS E MORFOMÉTRICAS	32
3.9 IMUNOHISTOQUÍMICA	33
3.10.1 Níveis de peroxidação lipídica (LPO)	33
3.10.2 Níveis de proteína carbonilada (CP)	34
3.10.3 Atividade de Superóxido Dismutase (SOD)	34
3.10.4 Atividade da catalase (CAT)	34
3.10.5 Determinação do conteúdo de proteína	35

	3.10 MEDIDA DE ÁGUA E VOLUME URINÁRIO EM 24H	35
	3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
4	RESULTADOS	37
	4.1 MÃES	37
	4.1.1 Ritmo circadiano da atividade locomotora das mães CTR e DSC	37
	4.1.2 Massa corporal e ingestão semanal de ração e água	39
	4.1.3 Período de gestação, tamanho e massa corporal dos filhotes ao nascimento.....	41
	4.1.4 oTTG e ipTTI	42
	4.1.5 Órgãos.....	43
	4.2 PROLE	44
	4.2.1 Massa corporal e ingestão equivalente semanal de ração e água	44
	4.2.2 Ingestão de leite	46
	4.2.3 oTTG e ipTTI	47
	4.2.4 PAS e FC	48
	4.2.5 Órgãos coletados dos filhotes pCTR e pDSC	48
	4.2.6 Análises Histológicas e Morfométricas	49
	4.2.6.1 Coração	49
	4.2.6.2 Rim	51
	4.2.7 Função Renal	52
	4.2.8 Imunohistoquímica tecido cardíaco	53
	4.2.9 Testes Bioquímicos Tecido Cardíaco.....	55
5	DISCUSSÃO.....	56
6	CONCLUSÃO.....	64
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AVP	Arginina-Vasopressina
cm	centímetros
CAT	Catalase
CP	Proteína Carbonilada
CT	Circadian Time: período circadiano (tradução literal)
CTR	Grupo Controle
DD	Escuro constante
dL	decilitro
DMH	Núcleo Dorsomedial do Hipotálamo
DOHaD	Developmental Programming of Human Health and Disease: Hipótese da Origem do Desenvolvimento da Saúde e da Doença (tradução literal)
DSC	Grupo Dessincronizado
GABA	ácido γ -aminobutírico
FC	Frequência Cardíaca
g	gramas
GH	Hormônio de Crescimento
ipTTI	Teste intraperitoneal de Tolerância à Insulina
ivTTG	Teste intravenoso de Tolerância à Glicose
kitt	constante de decaimento da glicose sanguínea
LD	claro/escuro
LEC	<i>“Light-Entrained Component”</i> : Componente Arrastado pela Luz
LPO	Níveis de Peroxidação Lipídica
mg	miligramas
mL	mililitros
n	número de animais
NAQ	Núcleo Arqueado
NLEC	<i>“Non-Light-Entrained Component”</i> : Componente Não Arrastado Pela Luz
NPP	Núcleo Pedúnculo Pontino
NSO	Núcleo Supraóptico
NSQ	Núcleo Supraquiasmático
oTTG	Teste oral de Tolerância à Glicose
PA	Pressão Arterial

PAP Pressão Arterial Pulsátil
PAS Pressão Arterial Sistólica
pCTR Prole de Grupo Controle
pDSC Prole de Grupo Dessincronizado
PN Pós-Nascimento
PVN Núcleo Paraventricular
SAA Sistema Ativador Ascendente
SAP Software de Acionamento Programado
SNC Sistema Nervoso Central
SOD Superóxido Dismutase
SOL Sono de Ondas Lentas
SP Sono Paradoxal
TAB Tecido Adiposo Branco
TAM Tecido Adiposo Marrom
TRH Trato Retino-Hipotalâmico
T22 ciclo claro/escuro simétrico de 22h (11h de claro/ 11h de escuro)
T24 ciclo claro/escuro simétrico de 24h (12h de claro/ 12h de escuro)
UFG Universidade Federal de Goiás
VLPO Núcleo Pré-Óptico Ventrolateral
ZT Zeitgeber: doador de tempo/pista temporal (tradução literal)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Foto representativa da disposição dos animais no contêiner específico para o protocolo de dessincronização. A mesma disposição é para ambos os grupos. Em cima com a luz acesa e embaixo com a luz apagada (sob iluminação de luz vermelha).	26
Figura 2. Esquema representativo em linha de tempo da sequência experimental das mães	27
Figura 3. Esquema representativo em linha de tempo da sequência experimental dos filhotes.....	29
Figura 4. Actograma e periodograma de uma rata CTR e de uma DSC	38
Figura 5. Atividade locomotora total e nas fases clara e escura das ratas CTR e DSC	39
Figura 6. Massa absoluta e ganho de massa das ratas CTR e das ratas DSC.....	40
Figura 7. Ingestão de ração e de água das ratas CTR e das DSC.....	41
Figura 8. Período gestacional, número de filhotes por ninhada e massa ao nascer	42
Figura 9. oTTG e ipTTI das mães CTR e DSC.....	43
Figura 10. Evolução da massa e ganho de massa corporal dos filhotes pCTR e pDSC	45
Figura 11. Ingestão de ração e água equivalentes dos filhotes pCTR e pDSC	46
Figura 12. Ingestão de leite dos filhotes pCTR e pDSC	46
Figura 13. oTTG e ipTTI dos filhotes pCTR e pDSC	47
Figura 14. PAS e FC dos filhotes pCTR e pDSC.....	48
Figura 15. Massa e Análises Histológicas e Morfométricas: Coração dos grupos pCTR e pDSC.....	50
Figura 16. Massa e Análises Histológicas e Morfométricas: Rim dos grupos pCTR e pDSC.....	52
Figura 17. Função Renal dos grupos pCTR e pDSC em 24h.....	53
Figura 18. Comparação entre os percentuais de positividade e negatividade de PCNA em tecido cardíaco dos grupos pCTR e pDSC.....	54
Figura 19. Dosagens de LPO, CP, SOD e CAT em tecido cardíaco dos grupos pCTR e pDSC.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Órgãos coletados das ratas CTR e DSC	44
Tabela 2. Órgãos coletados dos filhotes pCTR e pDSC.....	49

RESUMO

A desorganização do sistema de temporização interno tem sido associada a diversos problemas de saúde. Nas mulheres trabalhadoras em turnos alternados há maior incidência de distúrbios metabólicos e problemas durante o período gestacional. Assim, procuramos determinar se a indução de uma dessincronização circadiana interna forçada durante a prenhes de ratas Wistar levaria a alterações reprodutivas ou distúrbios metabólicos nas mães após o período de lactação, bem como se haveria consequências cardiometabólicas em suas proles na fase adulta. Métodos: Ratas Wistar foram distribuídas aleatoriamente em grupo: controle (CTR), submetidas a ciclo claro/escuro (LD) 12h (T24); e dessincronizado (DSC) submetidas a um ciclo LD simétrico de 11h (T22) durante a prenhes. As respectivas proles (pCTR e pDSC) foram acompanhadas por 90 dias. Nas mães foi realizado o teste oral de tolerância a glicose (oTTG) e o teste intraperitoneal de tolerância à insulina (ipTTI) ao 22º dia, bem como nos filhotes ao 90º dia pós-natal. A ingestão de água e ração dos animais foi registrada semanalmente. Durante 8 semanas a pressão arterial sistólica (PAS) e frequência cardíaca (FC) da prole foi aferida por meio da pletismografia de cauda. Após 24h do teste de oTTG todos os animais foram eutanasiados para coleta de tecidos. Resultados: As ratas DSC exibiram uma maior porcentagem de atividade locomotora durante a fase clara e uma porcentagem menor na fase escura do ciclo LD que as CTR durante o período gestacional, sem observar diferença no total. Porém, não se observou alterações quanto ao ganho de peso corporal e ingestão relativa de ração e água entre os grupos. Quanto aos aspectos reprodutivos, não houve diferenças significativas entre os grupos nem na quantidade de filhotes por ninhada, nem no peso corporal ao nascimento. Tanto as mães quanto os filhotes DSC apresentaram uma menor constante de decaimento de glicose (Kitt) no teste de ipTTI. Sugerindo uma intolerância à glicose ou comprometimento da sensibilidade à insulina nas mães DSC após o período de desmame e nos filhos na fase adulta. As pDSC também apresentaram maior ganho de peso na 7ª e 8ª semana após o desmame. Após 90 dias vida as pDSC apresentaram maior peso do coração e do pâncreas e uma redução na massa renal quando comparados aos seus pares controles. Análises histológicas do tecido renal não apresentaram alterações, já a do cardíaco foi observada uma maior deposição de fibrose intersticial e perivascular. No entanto, não houve diferenças significativas nos níveis de PAS e FC entre pDSC e pCTR ao longo das 8

semanas. Esses resultados sugerem que a dessincronização interna forçada durante a prenhes não resultou em consequências reprodutivas negativas às mães, porém induziu uma menor sensibilidade à insulina após o período de amamentação; nos filhotes, promoveu maior ganho de massa corporal total, menor sensibilidade à insulina, atrofia renal e hipertrofia com remodelamento cardíaco na fase adulta sem alterar os níveis PAS e FC.

Palavras-chave: dessincronização circadiana; distúrbios cardiometabólicos; gestação; programação fetal; relógio circadiano.

ABSTRACT

The circadian system disruption has been associated with several health problems. In shifts work women there is a higher incidence of metabolic disorders and problems during the gestational period. Thus, we sought to determine whether the induction of forced internal circadian desynchronization during the pregnancy of Wistar rats would lead to reproductive changes or metabolic disorders in mothers after lactation period, as well as whether there would be cardiometabolic consequences in their adulthood offspring. Methods: Wistar rats were randomly assigned to a group: control (CTR), subjected to a light / dark (LD) 12h (T24) cycle; and desynchronized (DSC) subjected to a symmetrical LD cycle of 11h (T22) during pregnancy. The respective offspring (pCTR and pDSC) were followed for 90 days. In the mothers, the oral glucose tolerance test (oGTT) and the intraperitoneal insulin tolerance test (ipITT) were performed on the 22nd postnatal day, as well as in the puppies at 90 days. For 8 weeks, the systolic blood pressure (SBP) and heart rate (HR) in the offspring were verified through tail plethysmography. After 24 hours of the oGTT test, all animals were euthanized for tissue collection. Results: DSC rats exhibited a higher percentage of locomotor activity during the light phase and a lower percentage in the dark phase of the LD cycle than the CTR during the gestational period, without difference in total. There were no changes in body weight gain and relative intake food and water between groups. Regarding reproductive aspects, there were no significant differences between groups or in the number of pups per litter as for body weight at birth. After weaning, only DSC mothers had a lower glucose decay constant (Kitt) in the ipITT test. The pDSC showed higher weight gain in the 7th and 8th week after weaning. However, there were no significant differences in the epididymal, mesenteric, inguinal and retroperitoneal adipose tissue mass between groups. SBP and HR over 8 weeks also showed no significant differences between groups. After 90 days, the pDSC showed higher heart weight, pancreas and brown adipose tissue and a reduction in renal mass when compared to their control pairs. However, after lactation, DSC mothers showed a reduction in plasma glucose uptake, suggesting glucose intolerance or impaired insulin sensitivity. Although pDSC in adulthood showed higher gain in total body mass and changes in tissue weights that are important for the balance of cardiometabolic functions, it was not possible to detect significant changes in PAS and HR levels, nor in glycemic metabolism tests. Histological analysis of renal tissue did not show any

changes, whereas cardiac analysis showed a greater deposition of interstitial and perivascular fibrosis. These results suggest that forced internal desynchronization during pregnancy did not result in negative reproductive consequences for mothers; however, it was responsible for a cardiac tissue remodeling adult pDSC.

Keywords: Cardiometabolic disorders; circadian clock; chronodisruption; developmental programming; pregnancy.

IMPACTO E RELEVÂNCIA DA PESQUISA PARA SOCIEDADE

Atualmente sabemos que os mecanismos circadianos dos nossos relógios biológicos estão codificados em nosso DNA, e são fundamentalmente importantes para nos adaptarmos em um planeta com ciclo diurnos e noturnos de 24 horas bem definidos pela natureza. Os relógios biológicos também são importantes para a nossa saúde. De fato, sabe-se há décadas que existe uma variação diária em praticamente todos os nossos principais sistemas fisiológicos, tais como sistema cardíaco, sistema endócrino, sistema gastroentérico, sistema nervoso, entre outros. Além disso, estudos mais recentes no campo da cronobiologia também revelam uma importante interação entre o mecanismo de temporalização circadiano e o estilo de vida, demonstrando que há um maior risco de doenças cardiometabólicas em indivíduos que possuem uma rotina diária em dessincronia com o ciclo claro/escuro ambiental. Ou seja, adotam horário de alimentação, exercício e sono dessincronizados aos períodos de atividade e o repouso fisiológicos. Além disso, novos interesses têm surgido sobre o papel da hora do dia sobre a gravidez e no nascimento.

Grande parte da vida de uma mulher em serviço coincide com sua idade fértil sendo comum gestantes atuantes no mercado de trabalho. Por isso crescentes são as preocupações referentes dos fatores de riscos à saúde nos ambientes empregatícios. No que se refere o bem-estar materno e fetal, sabe-se que além da carga horária de trabalho, outros fatores como as horas dos plantões, a postura e o levantamento de carga pesada podem comprometer a gestação da trabalhadora. Diversos estudos têm atribuído a má nutrição, a exposição a drogas, trabalho em turnos alternados e demais estresses pré-natais sofrida pelas mães ao desenvolvimento de doenças na vida adulta dos filhos.

Dessa forma, foram identificadas alterações cardiometabólicas nas mães e na prole adulta de ratas que sofreram insulto luminoso durante a gestação, levando a um desajuste na sincronização circadiana.

1 INTRODUÇÃO

Desde os primórdios, seres vivos são submetidos a ritmos gerados a partir do movimento de rotação da Terra com duração aproximada de 24 horas, que permitiram adaptação e consequente seleção das espécies. Para que os seres vivos conseguissem manter um equilíbrio interno frente às variações ambientais periódicas, desenvolveu-se um meio de sobreviver e manter sua homeostase através de um rearranjo temporal de suas funções fisiológicas de modo a promover uma antecipação e simultaneidade entre os sistemas orgânicos, se completando para responder aos estímulos externos ou de forma independente (Buijs and Kalsbeek, 2001).

A relação da Terra com o Sistema Solar gera ciclos associados à claridade/escuridão, estações do ano, fases da lua, ritmos marítimos e diversos outros eventos que ocorrem na natureza. Desta forma, os seres vivos de todos os filos evoluíram em um nicho temporal que provocou adaptações das funções fisiológicas das espécies, ritmadas em uma periodicidade de atividade/repouso garantindo a sobrevivência (Tomotani and Oda, 2012).

Sabe-se que a alternância entre o dia e a noite, gerados como consequência do movimento de rotação da Terra, é o ciclo mais estudado e esclarecido atualmente, denominado ciclo claro/escuro (LD). Ritmo que apresenta uma íntima relação com diversas variáveis fisiológicas e psicológicas, fazendo com que os seres vivos antecipem e respondam às alterações dos ciclos ambientais como expressão de genes, disponibilidade de nutrientes, manutenção da temperatura corporal, regulação da frequência cardíaca (FC) e produção hormonal, assim como sono, humor e funções cognitivas (Bagci *et al.*, 2020; Buijs *et al.*, 2014).

Ao que se tem conhecimento, Andróstenes de Thasos em 325 a. C. foi o primeiro a estudar estes ritmos em seres vivos no movimento diário das folhas de tamarindo (*Tamarindus indicus*). 2 mil anos depois foram encontrados novos relatos no mesmo filo: sensitiva heliotrópica. Em 1729, Jean-Jacques de Mairan, ao isolar uma planta da espécie dormideira (*Mimosa pudica*) de pistas temporais constatou que, independentemente de permanecer sob privação de informações luminosas, suas folhas mantinham o ritmo de abrir e fechar. Esse importante astrônomo francês concluiu então que os seres vivos possuíam um controle próprio autônomo

independente do ambiente, sendo, mais tarde, denominado ritmo de livre-curso (Marques and Menna-Barreto, 2003).

Desde então, estudos investigando a ubiquidade dos ritmos, isto é, a presença destes em organismos de todos os filos e a descoberta de que não existe nenhuma função endógena que não seja modulada de acordo com um ritmo ambiental passaram a ser desenvolvidos, denominados estudos em cronobiologia e buscaram esclarecer a fisiologia em função do tempo e seu papel no processo de antecipação e de organização frente às alterações externas (Pittendrigh, 1960).

Conclui-se então, através dos anos de estudos que todos os organismos vivos apresentam um ritmo comportamental, fisiológico, hormonal, bioquímico e molecular podendo ser circadianos, que apresentam uma periodicidade em torno de um dia (com duração de mais ou menos 24 horas), sendo seu pico e decaimento influenciado pelas fases clara e escura; os que ocorrem em uma frequência menor, os infradianos, como o ciclo menstrual feminino; e os que ocorrem em uma frequência maior, os ultradianos, como o batimento cardíaco e o ciclo de atividade/repouso (Gachon *et al.*, 2004).

Verificou-se que os ritmos de livre-curso sofrem um arrastamento pelo ciclo claro/escuro e outros fatores externos como a temperatura, a atividade, a ingestão de alimentos, o tempo de sono e o estresse/excitação, isto é, uma adaptação temporal de forma a sincronizar o organismo frente às alterações ambientais. Tais sincronizadores são denominados *Zeitgebers* Time (ZT), onde ZT0 é definido como a hora em que a luz se acende, por exemplo (Dibner *et al.*, 2010).

Em mamíferos sob condições constantes, observou-se que órgãos e glândulas endócrinas apresentam seu próprio ritmo, sendo responsabilidade do Núcleo Supraquiasmático (NSQ) sua sincronização com o meio ambiente. As informações fóticas, os ZT mais predominantes, são recebidas via trato retino-hipotalâmico (TRH) por células ganglionares especializadas da retina que contém um pigmento sensível à melanopsina, as quais captam a informação luminosa do ambiente (fotossincronização) e encaminham ao “marcapasso central” (Dibner *et al.*, 2010; Buijs and Kalsbeek, 2001).

O NSQ foi descoberto indiretamente por interesse de pesquisadores, como Richter, que buscava localizar o sincronizador central. Através de lesões provocadas no hipotálamo anterior, observou uma perda de ritmicidade no organismo. Moore e colaboradores também tiveram importante colaboração, através do metabolismo de

monoaminas e sua influência na glândula pineal, foram estimulados a continuar investigando as vias visuais. Mesma curiosidade de Stephan e Zucker, porém no sentido de entender a influência das informações fóticas e o sistema de temporização interno frente as alterações neuroendócrinas. Mais tarde foi descoberta a independência do NSQ quando isolado in vivo, in vitro e transplantado, mostrando que o animal dono da estrutura lesada desenvolveu o ritmo de atividade-reposo do doador após transplantação, porém sem crescimento de fibras, demonstrando que neurotransmissores são essenciais na difusão das informações captadas pelo NSQ (Buijs and Kalsbeek, 2001; Ralph *et al.*, 1990; Weaver 1998;).

O NSQ é um grupo de aproximadamente 10.000 células, localizado na área supraóptica do hipotálamo, nos dois lados do terceiro ventrículo, dorsal e cranialmente ao quiasma óptico. As conexões neurais do NSQ se dão com outros núcleos do hipotálamo como o Núcleo Paraventricular (PVN), Núcleo Supraóptico (NSO), Núcleo Dorsomedial (DMH) e Área Pré-Óptica. Já as conexões hormonais estão associadas às inervações eferentes do PVN e NSO, atuando através do trato hipotálamo-hipofisário, com estimulação da neuro-hipófise. Bem como o Núcleo Arqueado (NAQ), através do trato túbero-infundibular, intervando o sistema porta-hipofisário, estimulando secreções na adeno-hipófise (Michel *et al.*, 2021).

No próprio núcleo são secretados peptídeos, como a Arginina-Vasopressina (AVP) na região dorsomedial, a qual apresenta forte ritmo e sincronização mesmo em escuro constante (DD). Esses e alguns neurotransmissores como GABA (ácido γ -aminobutírico) e glutamato demonstraram serem essenciais na difusão das informações de dia e noite captadas pelo NSQ. É importante ressaltar que AVP é excitatória enquanto GABA é inibitório. Deixando o duplo mecanismo de controle do NSQ: neurônios neuroendócrinos e autonômicos (Buijs and Kalsbeek, 2001).

Dessa forma, essas vias que partem do NSQ também podem regular diretamente de forma simpática ou parassimpática órgãos periféricos como pâncreas, adrenal e fígado, gerando ritmicidade na concentração plasmática de glicose, insulina e ácidos graxos, por exemplo (Machado and Haertel, 2014).

Neurônios endócrinos também sofrem interferência do NSQ. O sincronizador circadiano hormonal predominante é a melatonina e sua secreção na glândula pineal é controlada por inervação de fibras simpáticas pós-ganglionares (gânglio cervical superior) que deixam o plexo NSQ-PVN-superior. A norepinefrina, uma das

monoaminas liberadas pelos terminais simpáticos ativam a produção deste hormônio nos pinealócitos, restrita à noite, variando conforme sua duração desde que em completo escuro, ou seja, qualquer estímulo luminoso captado pelo TRH e encaminhado ao NSQ inibe sua secreção. Tais projeções do NSQ são semelhantes tanto em humanos quanto em ratos, animais noturnos. A diferença está na mudança da presença dos neurotransmissores nos terminais do NSQ (Amaral and Cipolla-Neto, 2018; Buijs and Kalsbeek, 2001).

Nos ratos, a formação do relógio central está associada a neurogênese, ocorrendo entre os 14º e 17º dias gestacionais; e à sinaptogênese, ou seja, à formação dos relógios periféricos e a sincronização das células com o NSQ e as pistas temporais, do 21º dia, último dia gestacional, ao 2º dia pós-natal, sendo mais bem elaborado até o 15º dia acompanhado pela formação e independência do TRH (Sládek *et al.*, 2004).

Dessa forma, são três as características principais do sistema circadiano: 1) um relógio central responsável por gerar respostas endógenas (NSQ); 2) capacidade de sincronizar aos sinais periódicos ambientais (ZT) e transmiti-los através de vias aferentes ao Sistema Nervoso Central (SNC) garantindo sua sincronização com fatores ambientais; 3) através das vias neurais eferentes e hormonais levar a informação às partes do corpo para sua organização (Buijs and Kalsbeek, 2001).

Essa organização temporal interna do organismo pode ser perturbada por fatores externos como alterações da exposição à luz durante a fase escura do dia, bem como viagens trans meridianas que provocam mudanças fisiológicas agudas, ou crônicas ao observar a exposição a trabalho por turnos (*shift work*), no qual o ritmo central do organismo não consegue acompanhar com mesma velocidade a mudança dos ciclos ambientais, gerando alterações nos componentes do sono, sendo eles o sono paradoxal (SP) responsável pela restauração cognitiva e da inserção do aprendizado na memória, e o de ondas lentas (SOL) o qual está associado a recuperação física. Esta desorganização circadiana dos ritmos endógenos é a grande responsável por distúrbios do sono entre outras alterações fisiológicas importantes (Mendez *et al.*, 2016).

A produção hormonal (ex: melatonina e cortisol), resposta imune, temperatura corporal, respiração, ciclo sono/vigília, metabolismo, função renal, variação da pressão arterial (PA) e outras variáveis associadas ao sistema cardiovascular são

exemplos de funções que apresentam ritmos circadianos sincronizados de acordo com o ciclo LD, sendo que a sua dessincronização através de alterações luminosas pode desencadear transtornos de humor, como ansiedade e depressão; distúrbios neuroendócrinos, como diminuição dos níveis de melatonina que, consequentemente, pode provocar interrupções nos eixos hormonais induzindo, por exemplo, a diminuição da tolerância à glicose; predisposição a obesidade; prejuízo à memória espacial; e problemas cardiovasculares como hipertrofia do coração e aumento da PA e FC, e assim, à longo prazo, pode gerar doenças crônicas como a síndrome metabólica, o diabetes e a hipertensão (Mendez *et al.*, 2016; Salazar *et al.*, 2018).

Para tanto uma exposição diária à luz em duração e intensidade apropriadas são necessárias para uma boa sincronização dos sistemas ao ambiente (Bagci *et al.*, 2020).

Dentre os modelos animais para dessincronização circadiana, destaca-se o protocolo de T22, do qual consiste na exposição a um ciclo claro-escuro simétrico de 22 horas (11h claro e 11h escuro). Para os animais que permanecem neste regime de iluminação observa-se uma dessincronização forçada do ritmo circadiano da atividade locomotora, sugerindo a expressão de componentes circadianos distintos, sendo um sincronizado com a pista luminosa (LEC-componente arrastado pela luz) enquanto outro em livre-curso (NLEC-componente não-arrastado pela luz). Este modelo, além de ser um método não invasivo que induz à dissociação do NSQ *in vivo*, os animais dessincronizados tendem a apresentar as principais características encontradas em humanos também dessincronizados por exigências sociais, tais como trabalho em turnos alternados (Campuzano *et al.*, 1998).

Estudos anteriores realizados em nosso laboratório utilizando o modelo de dessincronização T22 em ratos wistar machos, demonstraram alterações no padrão da atividade locomotora de ratos, assim como diferenças significativas na via da insulina, estresse oxidativo e sensibilidade barorreflexa (Oliveira *et al.*, 2019).

Em ciclos LD, manipulados em laboratório, com duração de 24h, os animais apresentam boa adaptação, já que se aproxima da realidade. Naqueles em que há variação da duração das fases é observada uma dessincronização dos ritmos biológicos, como por exemplo da atividade locomotora fora da fase habitual, que poderia ser associado ao padrão de atividade observado em trabalhadores noturnos (Varcoe *et al.*, 2013).

As alterações econômicas modificaram a relação do ser humano com o trabalho, devendo aquele buscar alternativas para aumentar seu rendimento financeiro como a de expandir sua carga horária. Fato este que tem tornado nossa sociedade ativa por um período maior de horas durante o dia, necessitando cada vez mais de profissionais se dedicando no cuidado ao próximo por um expediente mais longo ou por turnos alternados. Sem contar uma exposição mais prolongada a luz artificial durante a fase escura do dia, bem como a necessidade de se acordar cedo e dormir tarde. Essa dessincronização acaba provocando a ruptura dos ritmos circadianos levando a sintomas de fadiga, desorientação, alteração dos perfis hormonais e maior morbidade associada a diversos tipos de doenças crônicas denominadas cronopatologias, podendo ser classificadas a nível de desempenho psicológico e, mais claramente estudado e validado, neurofisiológico como câncer e distúrbios cardiovasculares e metabólicos, diabetes, entre outras (Mendez *et al.*, 2016).

Shift work é aquele trabalho no qual o indivíduo atua em janela que deveria ser de repouso ou permanece sob um período maior de claridade durante as 24 horas do dia, alterando seu padrão de atividade, alimentação e sono. Maior dificuldade com o trabalho em turnos é apresentada pelas mulheres, principalmente as casadas e com filhos, sendo que é grande o número deste sexo encontrado em trabalhos voltados para lazer, transporte, comunicação e, principalmente, hospitais e outros cuidados em saúde (Matheson, *et al.*, 2019).

Em estudo foram entrevistadas enfermeiras e técnicas de enfermagem plantonistas do turno da noite de uma Unidade de Pronto Atendimento na cidade de Passos, MG. Segundo as participantes, a opção pelo plantão noturno foi o fato de trabalharem em outra instituição e, portanto, única alternativa para conciliar os horários, sendo a questão financeira determinante. Neste caso, ao chegarem em casa e se depararem com os afazeres domésticos ou com o curto intervalo entre um emprego e outro, a recuperação da noite de sono fica para o período seguinte em que há folga do plantão. Seus relatos foram, além do cansaço, insônia, irritação, cefaleia, alta prevalência de hipertensão, entre outros (Pereira *et al.*, 2010).

Grande parte da vida de uma mulher em serviço coincide com sua idade fértil sendo comum gestantes atuantes no mercado de trabalho. Por isso crescentes são as preocupações referentes dos fatores de riscos à saúde nos ambientes

empregatícios. No que se refere o bem-estar materno e fetal, sabe-se que além da carga horária de trabalho, outros fatores como as horas dos plantões, a postura e o levantamento de carga pesada podem comprometer a gestação da trabalhadora. Estudo tem atribuído a má nutrição, a exposição a drogas, e demais estresses pré-natais em ratas promove um desenvolvimento fetal prejudicado bem como alterações a longo prazo (Gaspar et al., 1998).

O termo Programação Fetal é utilizado para descrever insultos ocorridos em fases críticas do desenvolvimento, aumentando a suscetibilidade a doenças na infância e na vida adulta, baseado na hipótese das Origens do Desenvolvimento da Saúde e da Doença (DOHaD), podendo ser eventos durante o pré-natal e o pós-natal, sendo divididos em fatores fetais ou maternos, submetido à insultos de nutrição, estresse, uso de substâncias, desordens psiquiátricas, alterações do ciclo LD, obesidade e doenças crônicas (Jones et al., 2017; Silveira et al., 2007).

Em ratos, mudanças significativas na nutrição materna durante a gestação e dos filhotes durante a lactação provocaram prejuízos metabólicos na vida adulta como obesidade e doenças crônicas associadas, principalmente se tratando de ingestão aumentada de alimentos calóricos. Contrariamente, privação energética também foi associada aos mesmos distúrbios citados. Mães obesas ou diagnosticadas com diabetes tipo 2 (DM2) durante a gestação têm incidência aumentada em gerar filhotes obesos. Interessantemente, tanto a má nutrição quanto a superalimentação estão associadas à obesidade e DM2, sendo muito estudadas e associadas à neurogênese hipotalâmica e suas conexões (Bouret, 2009).

Outro estudo demonstrou que uma superalimentação pós-natal em ratos machos leva a alterações funcionais, morfológicas e moleculares no coração adulto, como demonstrado em estudo de Ferreira Junior e colaboradores (2019).

Diversos processos fisiológicos que são modificados durante a gestação necessitam estar ajustados em sincronia com o ciclo LD de 24 horas regulado pelo NSQ. Este rearranjo é necessário para a manutenção da homeostasia da mãe e do feto. Estudos recentes mostraram que alterações no ambiente gestacional e na vida precoce, fases de grande plasticidade fenotípica, podem afetar a epigenética, o neurodesenvolvimento, a distribuição celular, o desenvolvimento dos eixos endócrinos e a homeostase energética e, dessa forma, gerar alterações irreversíveis a longo prazo tanto fisiológicas quanto psicológicas (Bouret, 2009; Jones et al., 2017).

Na gestação o sono tem o importante papel de manter a homeostase do organismo materno, restaurando a energia cardíaca e renal para suportarem a demanda do desenvolvimento placentário. Em humanos, sono de baixa qualidade e de curta duração (<6h) do meio para o final da gravidez foi associado ao aumento de citocinas inflamatórias (por exemplo IL-6); bem como ao aumento da probabilidade de parto cesáreo e pré-eclâmpsia. Já durante o primeiro trimestre gestacional, um sono mais curto (<4h) foi associado a diabetes gestacional (Lima *et al.*, 2014).

Estudos com polissonografia relataram um aumento da duração do sono no primeiro trimestre gestacional, com redução nos posteriores, inclusive redução da porcentagem do sono REM, demonstrando a necessidade de um sono mais reparador à medida que o crescimento do bebê se acentua (Lima *et al.*, 2014).

Como já mencionado, a luz é o principal fator ambiental de sincronização dos ritmos circadianos, incluindo respostas neuroendócrinas em diversas espécies. Varcoe e colaboradores, em seu estudo com ratos, verificaram peso maior na prole fêmea a partir das 40 semanas de vida, bem como aumento da massa do tecido adiposo retroperitoneal dos machos aos 12 meses de idade e do tecido adiposo epigonadal das fêmeas aos 3 meses de idade. Também observaram aumento da concentração plasmática na curva circadiana da leptina na prole aos 3 meses de idade, bem como na média marginal da insulina e leptina, tanto de machos quanto de fêmeas aos 12 meses de idade da prole de ratas submetidas ao controle de fase clara/escuro por toda a gestação sendo que, de três a quatro dias, o ciclo era manipulado de forma a se tornar totalmente invertido, simulando o trabalho por turnos (Varcoe *et al.*, 2011).

Outros estudos também relataram que alterações no padrão do ambiente gestacional, como restrição de sono ou inversão do ciclo a cada 3-4 dias, podem ocasionar sérios distúrbios metabólicos e relacionados ao sistema cardiovascular na vida adulta decorridos de desarranjos no sistema circadiano do feto, como por exemplo peso, fluido urinário e pressão arterial aumentada, número de glomérulos reduzidos com área aumentada, hiperglicemia, entre outros (Mendez *et al.*, 2016; Salazar *et al.*, 2018).

Estas alterações são explicadas pois as informações ambientais captadas pelo NSQ das mães regulam o sistema de temporização do feto nos períodos pré e pós-natal, diminuindo após a primeira semana de vida dos filhotes com o amadurecimento

da resposta do NSQ à luz. Pois, mesmo que nos ratos esta estrutura seja formada entre os dias 14 e 17 da gestação, estudos realizados identificaram que no 19º dia todos os genes relógio estavam expressos, porém sem apresentar ritmicidade endógena detectável independente (Sládek *et al.*, 2004).

O mecanismo de influência materna nos ritmos do feto ainda é estudado, mas pode ser multifatorial. O NSQ regula a glândula pineal, uma estrutura importante para o sistema de temporização interno, principal fonte de melatonina, sincronizadora hormonal central do organismo, sendo esta a primeira hipótese em análise devido a sua capacidade de ultrapassar a barreira placentária, se tornando a única fonte do feto e a única responsável pela sincronização e preparação deste organismo em formação para o ambiente externo, bem como pelo adequado desenvolvimento do sistema neuroendócrino (Amaral and Cipolla-Neto, 2018).

Em humanos, sua produção e secreção aumenta gradativamente com o desenrolar da fase escura, atingindo seu pico no meio da noite, decaindo até cessar sua produção durante a segunda metade da noite até o amanhecer. Sendo essa oscilação responsável pela regulação de diversos processos fisiológicos como imunológicos, antioxidativos, cardiovasculares, do sono, comportamentais, reprodutivos, endócrinos/metabólicos e energéticos. Portanto, conclui-se que uma função ótima do relógio circadiano materno é essencial para a formação, coordenação e preparação do sistema de temporização interno do feto e sua independência futuramente, seja via melatonina ou outros mecanismos não claramente explicitados na literatura (Bagci *et al.*, 2020).

Destarte, o modelo T22 foi utilizado em nosso estudo por se tratar de uma forma não invasiva de dessincronização do NSQ e dos componentes do ritmo biológico e, embora haja preocupação com alterações do ritmo de temporização interno pelos sincronizadores sociais, poucos são os estudos experimentais relacionando-os aos parâmetros cardiometabólicos na prole adulta de mães submetidas a dessincronização circadiana pelo modelo de T22 durante o período gestacional. Dessa forma, nossa proposta tende a auxiliar na compreensão e na fundamentação teórica das possíveis alterações cardiometabólicas na prole adulta programadas pela herança provocada durante o período gestacional a partir de uma dessincronização circadiana das mães.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar e identificar as alterações em parâmetros cardiometabólicos de ratas Wistar submetidas à dessincronização circadiana durante o período gestacional e de sua prole macho adulta.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar nas mães:

- o consumo alimentar e a massa corporal semanalmente durante a prenhes;
- a curva glicêmica após administração via gavagem de solução de glicose e injeção intraperitoneal de insulina exógena;
- a massa dos órgãos coração, rim, adrenal, ovário, pâncreas e fígado, e tecidos adiposos marrom, mesentérico, inguinal e retroperitoneal;

Avaliar na prole:

- o consumo de leite no 8º dia pós nascimento;
- o consumo alimentar e a massa corporal semanalmente por 90 dias após desmame;
- os níveis basais de pressão arterial sistólica (PAS) e frequência cardíaca (FC) semanalmente por 8 semanas após desmame;
- a curva glicêmica após administração via gavagem de solução de glicose e injeção intraperitoneal de insulina exógena;
- a massa dos órgãos coração, rim, adrenal, pâncreas e fígado, e tecidos adiposos marrom, epididimal, mesentérico, inguinal e retroperitoneal;
- a histologia cardiovascular e renal;
- a proliferação celular cardíaca.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O protocolo experimental foi realizado em conformidade com os Princípios Éticos de Experimentação Animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), pela Lei 11.794/08 e pelo Decreto 6.899/09 e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais sob o protocolo CEUA-UFG nº026/19.

Ratos Wistar machos (10) e fêmeas (20) com 6 semanas de vida (150-180g) foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Goiás (UFG).

Durante todo o protocolo experimental os animais permaneceram em caixas de polipropileno individuais acomodadas em contêineres circadianos instalados no Centro de Pesquisa em Neurociência e Fisiologia Cardiovascular da UFG (Figura 1), um ambiente de 5m² com luminosidade e com som atenuado a fim de se evitar estresse ao animal. Nesse espaço também foi instalado um aparelho de ar-condicionado de 9000BTUs e exaustores, mantendo a temperatura controlada a 21 ± 2 °C verificada diariamente por termômetro de coluna de mercúrio de alta precisão.

Figura 1. Foto representativa da disposição dos animais no contêiner específico para o protocolo de dessincronização. A mesma disposição é para ambos os grupos. Em cima com a luz acesa e embaixo com a luz apagada (sob iluminação de luz vermelha).



Fonte: Autoria própria, 2019.

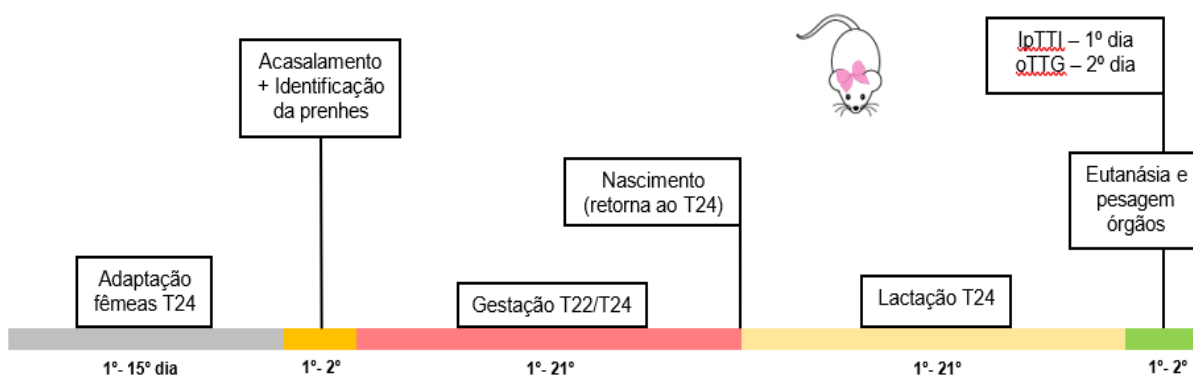
Água e ração foram ofertadas “*ad libitum*”, medidas semanalmente e corrigidas pela massa corporal através de uma balança digital de precisão e a ingestão de água por meio de uma proveta graduada de vidro.

Inicialmente, as fêmeas passaram por um período de adaptação de 15 dias nos contêiners circadianos sob um fotoperíodo de 12h escuro e 12h claro, sendo as luzes ligadas às 7h (ZT0) e se apagando automaticamente às 19h (ZT12) (Figura 2).

Ao fim da fase de adaptação inserimos os machos para acasalamento na proporção 1:2, até ser confirmada a prenhez. Ao amanhecer e ao anoitecer todos os dias, analisou-se o lavado vaginal através de microscópio eletrônico para identificação de espermatozoide, em caso afirmativo contava-se como o primeiro dia da gestação que durou em média 21 dias (Vilela, *et al.*, 2007).

O lavado vaginal foi coletado com uma pipeta de plástico 10µL preenchida com salina NaCl 0.9%, com auxílio de um conta gotas, inserida na vagina (Vilela, *et al.*, 2007).

Figura 2. Esquema representativo em linha de tempo da sequência experimental das mães



Fonte: Autoria própria, 2019

3.2 PROTOCOLO DE DESSINCRONIZAÇÃO FORÇADA DO RITMO ATIVIDADE/REPOUSO CIRCADIANO

As fêmeas prenhes foram distribuídas em dois grupos aleatoriamente, a saber: 1) Grupo Dessincronizado (DSC; n=10): animais submetidos a mudança do ciclo claro/escuro T22 durante todo o período gestacional, e 2) Grupo Controle (CTR;

n=10): animais submetidos ao ciclo claro/escuro normal 12/12h claro/escuro durante toda a gestação.

Nos contêineres havia sensores de movimento por infravermelho instalados estrategicamente acima de cada gaiola para registro da atividade locomotora dos animais, sendo tais dados coletados por meio do software Software de Acionamento Programado (SAP), desenvolvido pelo Laboratório de Neurobiologia e Ritmicidade biológica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. O ciclo claro/escuro é controlado automaticamente pelo mesmo software (aproximadamente $\pm > 120$ Lux fase clara e $\pm < 0$ Lux fase escura). As variáveis da ritmicidade circadiana da atividade locomotora foram analisadas pelo software El Temps (A. Díez-Noguera, Universitat de Barcelona, 1999). Para não interferir na captação da atividade locomotora dos animais pelos sensores, as mães eram manipuladas na fase escura (período de atividade) sob luz vermelha.

3.3 PROLE

No dia do nascimento as mães em T22 voltaram ao ciclo claro/escuro normal 12/12h.

Foram avaliadas as durações das gestações por grupo, bem como a quantidade de filhotes por ninhada. Fêmeas cujas gestações não se desenvolveram sem comprovação de implantações ou com ninhadas natimortas não foram contabilizadas.

A duração da gestação foi caracterizada em pré-termo, com duração ≤ 19 dias; termo entre 20 e 21 dias e pós-termo ≥ 22 dias.

No primeiro dia pós nascimento (PN1) foi realizada a pesagem (massa corporal ao nascer), a sexagem das proles e sua padronização em 2 fêmeas e 4 machos por ninhada.

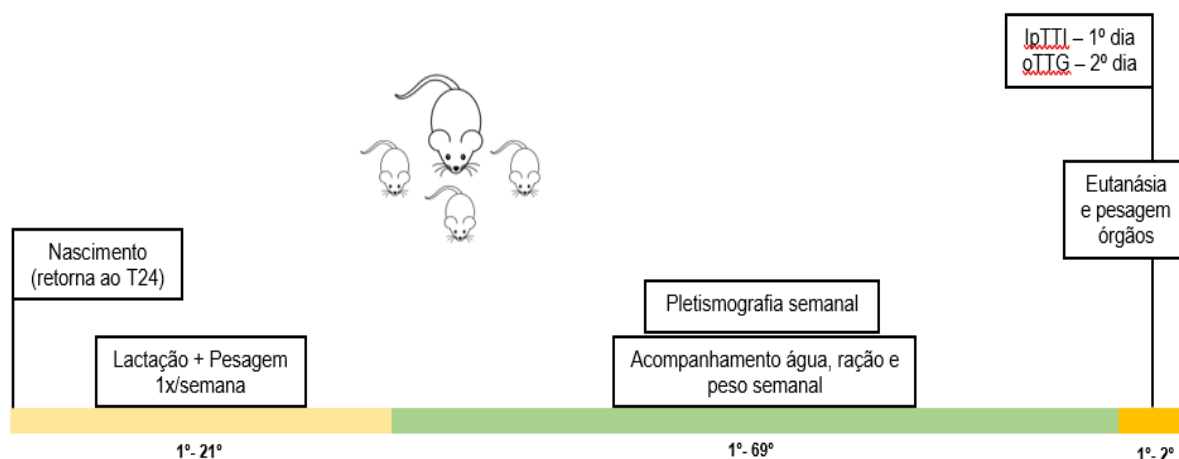
As ninhadas foram pesadas semanalmente até PN90 (Figura 3), sendo que na primeira semana a pesagem obtida foi da ninhada inteira, dividindo pelo total de filhotes da mãe em questão para se obter a média. Tal medida foi tomada com o intuito de reduzir ao máximo a perda de calor, mais susceptível nos primeiros dias de vida.

No manuseio dos filhotes, sempre na ausência da mãe, foram tomadas precauções de modo a evitar que houvesse rejeição materna. O contato com a

ninhada era feito com luvas sujas com maravalha do ninho, de modo a não modificar o cheiro habitual do filhote.

Após o desmame (PN21) a ninhada foi reduzida para 3 proles machos. Os irmãos ficaram em uma única caixa e o consumo de ração e água foi medido semanalmente, dividido por 3 de modo a se obter a média e, por fim, corrigido pelo peso individual de cada animal daquela mãe até PN90.

Figura 3. Esquema representativo em linha de tempo da sequência experimental dos filhotes



Fonte: Autoria própria, 2019

3.4 TESTE INTRAPERITONEAL DE TOLERÂNCIA À INSULINA (ipTTI) E TESTE ORAL DE TOLERÂNCIA À GLICOSE (oTTG)

No PN21, no ZT1, as mães foram separadas da ninhada e submetidas ao ipTTI (2 U/Kg de peso corporal, administrada via intraperitoneal) com insulina recombinante humana (Eli Lilly®, São Paulo, Brasil) em concentração 2% v/v diluída em solução fisiológica isotônica (NaCl 0,9%).

Amostras de sangue foram coletadas através de um pequeno furo na extremidade da cauda para ser extraída uma gota de sangue e a glicemia medida por glicosímetro comercial com fitas descartáveis (On Call® Plus, Laboratório Acon, San Diego – CA, USA) em diferentes momentos: 0 (basal), 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos após a injeção (Santomauro, *et al.*, 1999).

A taxa de decaimento da glicose sanguínea (Kitt) foi calculada através da fórmula $Kitt = 0,693 / (t_{1/2})$, sendo o $t_{1/2}$ calculado a partir da análise do ângulo de

inclinação da reta das concentrações de glicose plasmática durante a fase linear de declínio da glicemia (Santomauro, *et al.*, 1999).

No dia posterior (PN22), do ZT1 ao ZT3, os mesmos grupos foram submetidos a jejum prévio de 12 horas e ao oTTG, sem anestesia para evitar possíveis interferências na glicemia, que consistiu na administração intragástrica (2g/kg de peso corporal) de uma solução de glicose 50% diluída em solução fisiológica (NaCl 0,9%).

Amostras de sangue foram coletadas nos tempos 0 (basal), 15, 30, 60, 90 e 120 min após a injeção, utilizando do mesmo método que o teste anterior.

A prole adulta também foi submetida aos mesmos testes, ipTTI no PN88 e oTTG no PN89.

3.5 TESTE DE INGESTÃO DE LEITE

Os filhotes no PN8, no ZT1, foram separados da mãe por um período de 2 horas para posteriormente serem submetidos à pesagem, sempre mantidos aquecidos por bolsa térmica. A seguir foram recolocados junto à mãe por um período de 30 minutos e retirados para nova pesagem. As pesagens foram realizadas em balança analítica, na qual os animais foram posicionados individualmente sobre uma placa de petri com algodão para melhor conforto térmico. O consumo de leite foi estimado pela subtração da massa final pela massa da primeira pesagem dos filhotes (Amaral, 2019).

3.6 PLETISMOGRAFIA DE CAUDA

Apesar da canulação arterial apresentar um alto nível de precisão no acompanhamento da Pressão Arterial, trata-se de um método muito invasivo além de perder a capacidade da cânula com o tempo, tornando-o inviável para o monitoramento crônico desta variável. Sendo assim, a pressão arterial sistólica (PAS) e FC foram mensuradas por meio da pletismografia de cauda semanalmente durante 8 semanas pós desmame (Ibrahim, *et al.*, 2006)

Previamente ao registro foi necessário o aquecimento do animal (34 ± 2 °C) para dilatação da artéria caudal e um tempo de adaptação ao pletismógrafo de uma semana para evitar que o estresse induzisse alterações das variáveis a serem coletadas. O registro só foi iniciado após calibração do software baseado na coluna

de mercúrio e, posteriormente, da estabilização da pressão arterial pulsátil (PAP) e da FC (Kubota and Nishiwaki, 2006).

O animal foi colocado dentro de um contensor de madeira específico para o seu tamanho para impedir que fossem realizados movimentos bruscos que atrapalhassem o processo de leitura, deixando apenas a cauda exposta para que em sua região proximal fosse posicionado um manguito cilíndrico de borracha ligado ao esfigmomanômetro, sendo inflado e desinflado em intervalos regulares, obstruindo e desobstruindo o fluxo sanguíneo da artéria caudal, possibilitando que um transdutor de pulso MP100 (ADInstruments, Brasil) captasse os sinais da pulsação provenientes da artéria caudal realizando o registro da PAP, sendo este último acoplado próximo ao manguito, o qual, por sua vez, se conecta a uma coluna de mercúrio, para introduzir e acompanhar a pressão de ar interna (Moura Junior, 2009).

Os sinais mecânicos produzidos a partir da insuflação do manguito e da PAP da artéria caudal foram amplificados (LabChart 3.4; AD Instruments, Colorado Springs, CO, EUA) e, por sua vez, registrados por um software (PowerLab; ADInstruments, Colorado Springs, CO, EUA) em tempo real. Ao mesmo tempo, foram obtidos os valores de FC a partir do intervalo de pulsos provenientes da PAP (Moura Junior, 2009).

Para obter registros da PAS, foi induzida uma interrupção dos sinais de PAP a partir do preenchimento do manguito com uma pressão de ar usando o esfigmomanômetro. Ao atingir pressão de ar interna no manguito suficiente para obstruir completamente o fluxo da artéria caudal durante 3 segundos, com os sinais de PAP e FC silenciados, inicia-se o processo de desobstrução da artéria. O primeiro sinal obtido após o retorno deste processo foi considerado a PAS. Para FC, foram selecionados intervalos de 10 segundos entre os ciclos de obstrução e desobstrução do fluxo sanguíneo da artéria caudal. Essa manobra é repetida três vezes desde que não haja interferência nos sinais obtidos (Kubota and Nishiwaki, 2006).

O experimento foi realizado do ZT1 ao ZT4 em todos os animais, duas vezes por semana e, a partir dos valores obtidos, foi calculada a média semanal.

3.7 COLETA DE TECIDOS

As mães no PN23 e os filhotes no PN90 foram deixados em jejum de 12 horas, para então do ZT1 ao ZT4 serem anestesiados com tiopental sódico (45 mg/kg of BW, ip, Thiopentax®, Cristália, Itapira, São Paulo, Brazil) e eutanasiados no período matutino. Após a exposição da cavidade torácica e abdominal, o sangue foi coletado da artéria abdominal em seringas estéreis previamente heparinizadas (Hepamax, Blau Farmacêutica, Cotia, SP, Brasil) e transferidas para tubos tipo *ependorfs*. As amostras de sangue foram centrifugadas (3000 rpm por 10 min), o plasma foi coletado e armazenado em freezer a -80° C para posteriores análises bioquímicas.

Em seguida, órgãos como coração, rins, adrenais, fígado, pâncreas e tecidos adiposos foram coletados e pesados em balança analítica.

Os valores obtidos dos órgãos foram corrigidos pelo comprimento tibial e dos tecidos adiposos pela massa corporal.

3.8 ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS E MORFOMÉTRICAS

As amostras de coração e dos rins dos filhotes foram fixadas em paraformaldeído 4% tamponado por 24h, desidratadas em série de concentrações crescentes de álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em paraplast (Sigma-Aldrich, MO, EUA). Cortes de 5 µm de espessura foram obtidos em micrótomo (Leica RM2155, BW, Germany) e dispostos sobre lâminas de vidro e secas em estufa a 37 °C. As lâminas contendo os cortes foram desparafinizadas, hidratadas, coradas com Hematoxilina e Eosina (HE) e montadas com lâminulas coladas com Ethelan.

As análises histopatológicas foram realizadas utilizando imagens obtidas em microscópio óptico (Leica DM500, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) acoplado a um sistema digital de aquisição de imagens (aumento de 40x) (Leica Application Suite, V.3.10, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha), em seguida as quantificações foram realizadas através do software ImageJ 1.34s (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MS, USA).

Nos corações foram avaliadas as áreas (µm²) da fibrose perivascular e intersticial e o diâmetro (µ) dos cardiomiócitos. Nos rins, a razão da área (µm²) da cápsula glomerular pela do glomérulo foi obtida para comparação. Foram utilizadas de seis a oito imagens digitais de cada animal (n = 5 animais/grupo de filhotes e 5 animais/grupo de mães).

3.9 IMUNOHISTOQUÍMICA

A partir da preparação para análises histológicas, lâminas sem coloração foram separadas e submetidas à técnica de imuno-histoquímica, método utilizado para identificar marcadores celulares específicos utilizando anticorpos como reagentes. O produto da reação antígeno-anticorpo foi analisado pelo microscópio a partir de cortes histológicos de amostras incluídas em parafina. A partir do procedimento indireto, avaliamos a ligação do anticorpo primário ao antígeno, e o secundário se associou à imunoglobulina primária, estando esse último marcado com o elemento que permitiu a observação do complexo.

Dessa forma, para avaliar a multiplicação celular no coração dos filhotes pós-eutanásia (PN90) foi realizada a técnica de imuno-histoquímica do índice de proliferação celular (PCNA). A proteína PCNA é encontrada no núcleo atuando como cofator da DNA polimerase delta, envolvida na síntese como também no reparo do ácido desoxirribonucleico. Portanto, células em fase de proliferação, apresentam expressão aumentada dessa proteína, sendo importante marcador utilizado para identificar células em processo de mitose através da imuno-histoquímica indireta através do anticorpo primário denominado antígeno nuclear de proliferação celular (anti-PCNA) (Garcia, *et al.*, 2015).

3.10 TESTES BIOQUÍMICOS

3.10.1 Níveis de peroxidação lipídica (LPO)

Para a dosagem de LPO, foi utilizado o método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). A estimativa TBARS foi realizada espectrofotometricamente seguindo o método descrito por Ohkawa *et al.*, (1979), com algumas modificações. As amostras foram incubadas com ácido tiobarbitúrico, ácido acético (pH 3,4) e SDS a 95 ° C por 60 min. O produto da reação foi determinado a 532 nm. Para a interpretação dos resultados, foi realizada uma curva de MDA e os dados foram expressos como equivalentes de MDA em nmol / mg de proteína.

3.10.2 Níveis de proteína carbonilada (CP)

Os derivados da proteína carbonila foram medidos seguindo o método descrito por Colombo et al., (2016), com algumas modificações. As amostras foram incubadas com DNPH preparado em 2 mol / L HCl. A mistura foi mantida no escuro por 1 h e agitada em vórtex a cada 15 min. Tampão de desnaturação, etanol e hexano foram então adicionados a cada tubo e a mistura final foi agitada em vórtice por 40 segundos e centrifugada a 3000 x g por 10 minutos. O sobrenadante obtido foi descartado. O sedimento foi lavado com etanol-acetato de etilo (1: 1 v / v) e ressuspenso em tampão de desnaturação. A amostra foi agitada em vórtice por 5 min e foi usada para medir a absorbância a 370 nm. Os resultados foram expressos em nmol de conteúdo de carbonil / mg de proteína.

3.10.3 Atividade de Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade SOD foi determinada espectrofotometricamente. O princípio desse método é a capacidade da enzima superóxido dismutase de inibir a autooxidação da epinefrina. As amostras foram incubadas com bitartarato de epinefrina 60 mmol / L, e a intensidade da cor da amostra foi medida a 480 nm, segundo o método de Misra e Fridovich, (1972), com algumas modificações. A atividade enzimática é expressa em unidades (U) de SOD / mg de proteína.

3.10.4 Atividade da catalase (CAT)

A atividade da CAT foi determinada espectrofotometricamente pela decomposição do H₂O₂ a 240 nm de acordo com o método descrito por Aebi, (1984), com algumas modificações. A amostra de coração foi incubada com 86 mmol / L de H₂O₂ e tampão de fosfato de sódio (pH 7,0). A atividade enzimática é expressa em unidades (U) de CAT / mg de proteína. Um U de enzima decompõe assim um μ mol de H₂O₂ / min a pH 7,0 a 25 ° C.

3.10.5 Determinação do conteúdo de proteína

A concentração total de proteína foi medida pelo método descrito por Bradford, (1976), usando BSA como padrão.

3.10 MEDIDA DE ÁGUA E VOLUME URINÁRIO EM 24H

Os animais foram alojados individualmente em gaiolas metabólicas Tecnoplast® no PN81, nas quais permaneceram por 48 horas, sendo as primeiras 24 horas destinadas a adaptação e as últimas 24 horas destinadas à obtenção das medidas precisas da ingestão de água e volume urinário dos animais por gravimetria e obtenção de amostras de urina. A ingestão de água foi calculada como a diferença entre a quantidade inicial e a remanescente 24 horas depois. Amostras de urina (2 ml) coletados por gravimetria foram estocadas a -80°C para posteriores análises bioquímicas.

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média ($M \pm EPM$). Nas ratas prenhes a atividade locomotora foi plotada em actogramas pelo software *El Temps* para visualizar os componentes rítmicos de dessincronização. O total da atividade locomotora, bem como o percentual de atividade nas fases clara e escura do ciclo claro/escuro foi analisado por meio do software MS office Excel. Para comparação entre os grupos foi utilizado *Anova Two-way* seguido do teste a posteriori de Bonferroni.

Para as variáveis cardiovasculares e metabólicas foi utilizado o teste t de *Student* para amostras independentes. A massa corporal, o ganho de massa, a ingestão de ração e água, a PAS, FC e os testes de oTTG e ipTTI foram analisados por meio de *Anova Two-way* seguido do teste a posteriori de Bonferroni.

As porcentagens de duração da gestação foram analisadas utilizando o teste de qui-quadrado de Fischer.

As curvas glicêmicas, de PAS e FC também foram calculadas a integral da área sob a curva. Para comparação dos valores de ASC foi utilizado o teste t de *Student*.

Os resultados dos testes de comportamento foram analisados utilizando o teste não-paramétrico *two-sided* de *Mann-Whitney*.

O nível de significância mínimo estabelecido foi de $p < 0,05$. As análises estatísticas e os gráficos foram criados através do software GraphPad Prism versão 6.01 para Windows (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

4 RESULTADOS

4.1 MÃES

Como exposto inicialmente, diversos estudos têm correlacionado agravos ocorridos durante a vida fetal com o surgimento de doenças crônicas no decorrer da vida, isto é, alterações importantes no ambiente gestacional podem acarretar prejuízos significantes na prole adulta. Dessa forma buscou-se identificar mudanças fisiológicas que a dessincronização circadiana durante a gestação, resultando em uma programação fetal, promoveu nas mães.

4.1.1 Ritmo circadiano da atividade locomotora das mães CTR e DSC

A Figura 4A apresenta um actograma do ritmo da atividade locomotora de uma mãe representativa do grupo CTR e na Figura 4B do grupo DSC. Cada linha representa um dia de 24h de registro do ciclo de atividade/repouso de uma rata. Os dados estão duplicados e dispostos numa escala de 48h denominada *double-plotting* para melhor visualização da variação rítmica. As sombras verticais indicam a fase escura.

A área destacada indica o período de acasalamento e a região precedente corresponde à adaptação.

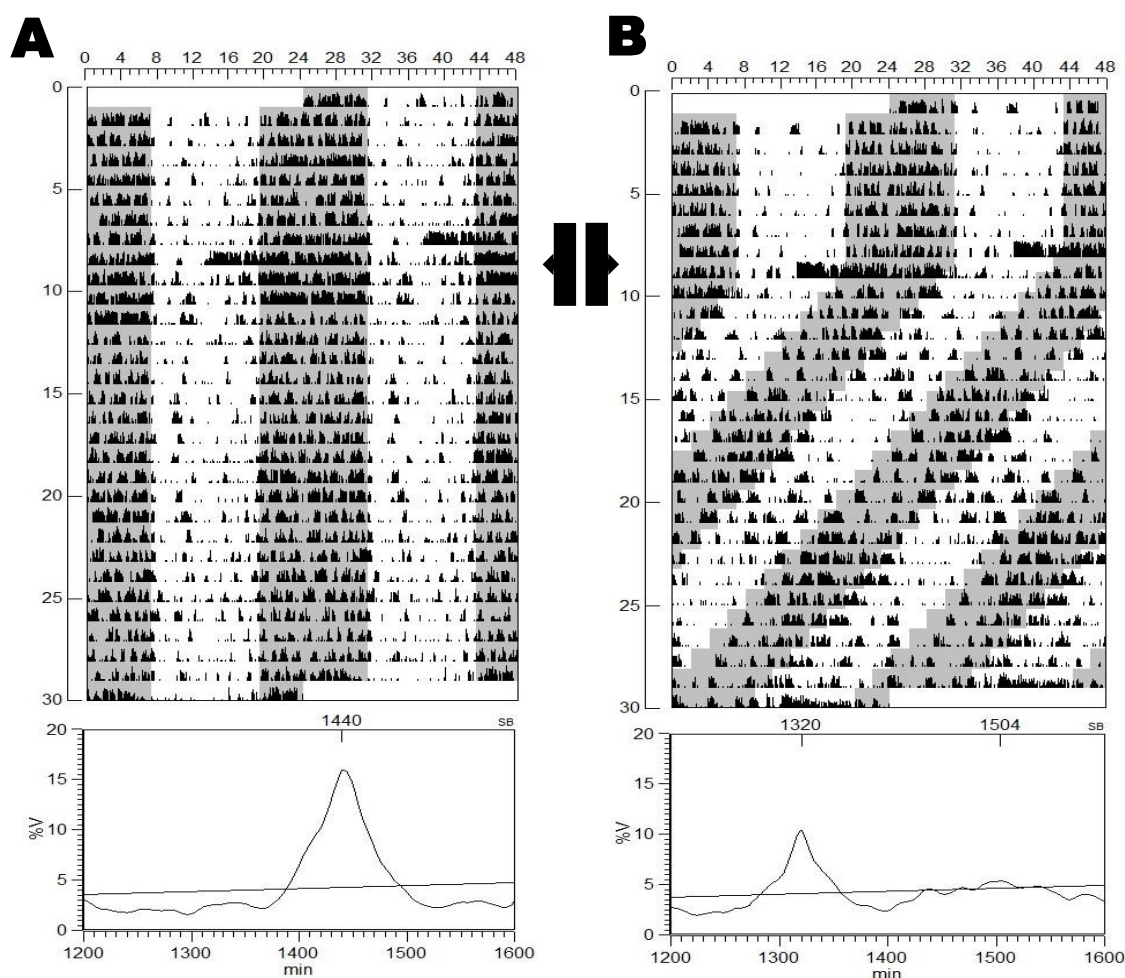
Ao visualizar o actograma no módulo de 24h de um animal DSC submetido ao regime de iluminação de 11h escuro e 11h claro, isto é, T22 (Figura 4B), observamos que dois ritmos circadianos foram encontrados simultaneamente na atividade locomotora. Para o animal CTR, em ciclo claro-escuro de 24h, a relação de fases entre o início da atividade e o início do escuro é evidente ao depararmos com a Figura 3A, o que não observamos na segunda.

Ainda para caracterização do protocolo de dessincronização, utilizamos análises da série temporal por meio do periodograma, abaixo dos actogramas correspondentes, que indica a ocorrência de periodicidade de um determinado ritmo expresso. Conforme a Figura 6A demonstra, há um único pico (1440min) de atividade locomotora nas ratas CTR. No entanto no grupo DSC exposto ao T22 (Figura 4B) a

análise do periodograma revela a presença e periodicidade de dois ritmos da atividade locomotora, portanto é possível afirmar que um deles acompanha o ciclo ambiental 11/11h representado pelo pico de 1320min, sendo denominado de componente arrastado pela luz (LEC) e o outro está em livre-curso (endógeno), maior que 24h sendo o componente não arrastado pela luz (NLEC), neste caso 1504min.

Foram incluídos no estudo somente ratas que apresentaram actogramas individuais padrão de cada grupo semelhantes aos descritos acima.

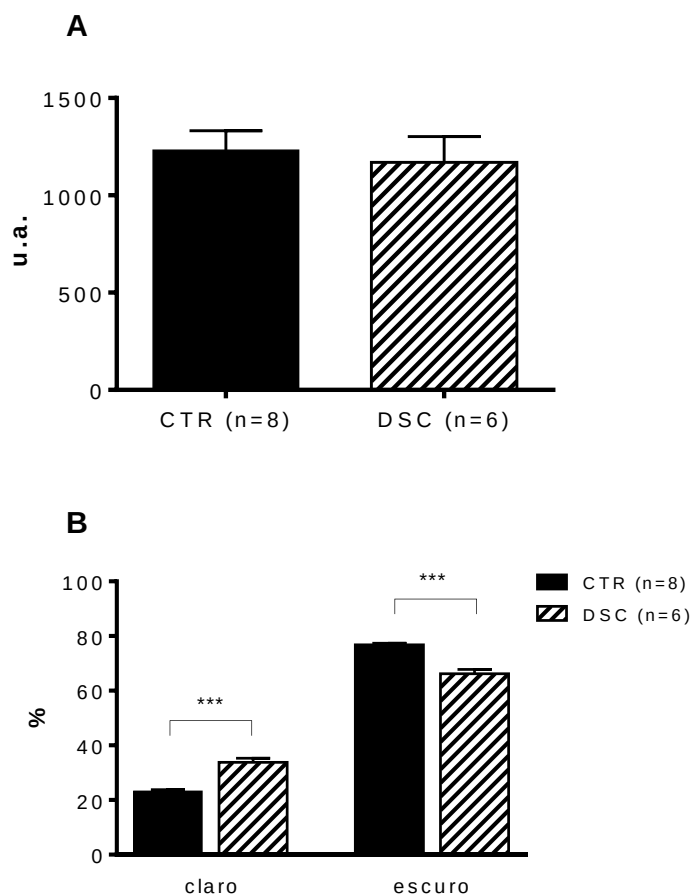
Figura 4. Actograma e periodograma de uma rata CTR e de uma DSC



(A) Representação gráfica da atividade locomotora (actograma) no módulo de 24h em *double-plotting* onde cada linha representa dois dias. Sendo a escala horizontal referente às horas e a vertical aos dias. A área destacada remete ao período de acasalamento e a precedente ao período de adaptação, não contabilizados na atividade locomotora. A sombra equivale ao período escuro. E a representação gráfica do período de atividade locomotora (periodograma) mostrando um pico de 1440 minutos (=24h), sendo que a escala horizontal representa os minutos e a vertical o percentual de variância de uma rata mantida sob ciclo claro-escuro de 24h (T24 - CTR). (B) Actograma e Periodograma de uma rata mantida sob ciclo claro-escuro de 22h (T22 - DSC). DSC: grupo dessincronizado; CTR: grupo controle; %V: percentual de variância.

A diferença identificada entre os grupos também pode ser visualizada na Figura 5 onde, apesar de haver atividade motora total similar entre os grupos demonstrada pelo teste t (CTR: $1232 \pm 99,76$ u.a. vs DSC: $1170 \pm 131,8$ u.a.; $p = 0,7153$; Figura 5A), notoriamente há o predomínio da movimentação na fase escura de um animal controle (CTR: $76,79 \pm 0,5586$ % vs DSC: $66,23 \pm 1,552$ %; $***p < 0,001$; Figura 5B), porém o mesmo não ocorre com as DSC, apresentando maior atividade na fase clara (CTR: $23,21 \pm 0,5586$ % vs DSC: $33,77 \pm 1,552$ %; $***p < 0,001$; Figura 5B).

Figura 5. Atividade locomotora total e nas fases clara e escura das ratas CTR e DSC



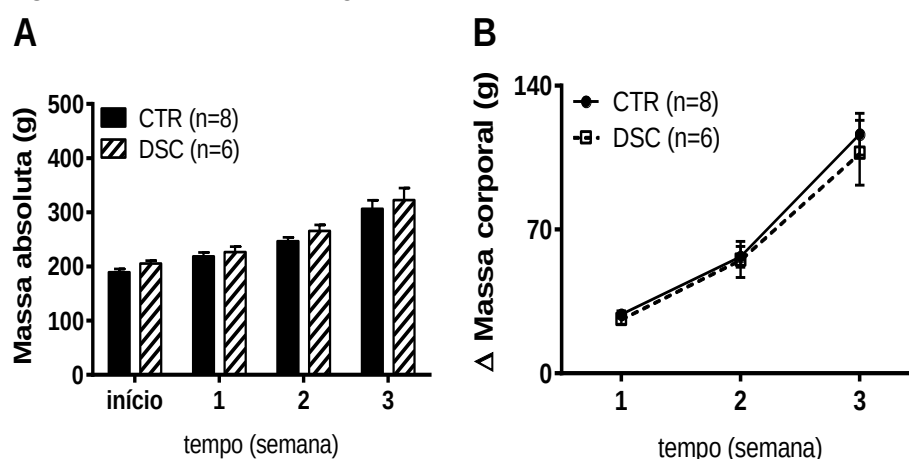
(A) Atividade locomotora total durante a gestação das ratas DSC e CTR; (B) Atividade locomotora na fase clara e na fase escura, separadamente, das ratas DSC e CTR. Resultados expressos como média $\pm$ EPM. $***p < 0,001$. DSC: grupo dessincronizado; CTR: grupo controle; n.: número de animais; u.a.: unidades arbitrárias.

4.1.2 Massa corporal e ingestão semanal de ração e água

A figura 6A demonstra a evolução semanal da massa corporal das mães ao início e durante o período gestacional pelo teste ANOVA de duas vias sendo observada uma diferença entre as semanas [$F(3, 48) = 38,81$; **** $p < 0,0001$] mas não entre os grupos [$F(1, 48) = 3,281$; $p = 0,0764$].

Na figura 6B podemos observar a evolução semanal do ganho de massa das mães ao final de cada uma das três semanas gestacionais pelo teste ANOVA de duas vias sendo observada uma diferença entre as semanas [$F(2, 36) = 52,49$; **** $p < 0,0001$] mas não entre os grupos [$F(1, 36) = 0,3691$; $p = 0,5473$].

Figura 6. Massa absoluta e ganho de massa das ratas CTR e das ratas DSC

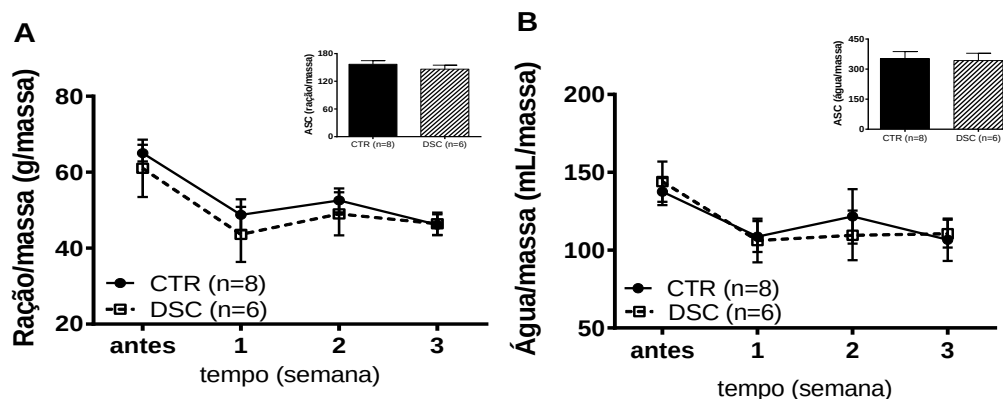


Resultados expressos como média $\pm$ EPM. CTR.: grupo controle; DSC.: grupo dessincronizado; g.: gramas; n.: número de animais; Δ .: variação.

Nas Figuras 7A e 7B observamos a evolução da ingestão corrigida pela massa corporal de ração e água, respectivamente, na semana anterior e durante a gestação das ratas CTR e DSC na qual foi observada diferença conforme o tempo na ingestão de ração [$F(3, 48) = 6,147$; $p = 0,0013$; Figura 7A] mas não na de água [$F(3, 48) = 2,728$; $p = 0,0542$; Figura 7B]. E entre os grupos não se observou diferença significativa [RAÇÃO: $F(3, 48) = 6,147$; $p = 0,0013$; Figura 7A; ÁGUA: $F(1, 48) = 0,01350$; $p = 0,9080$; Figura 7B] pelo teste ANOVA de duas vias.

Na área sob a curva não se observou diferença significativa entre os grupos pelo teste t na ingestão de ração (CTR: $157,0 \pm 7,609$ g vs DSC: $146,4 \pm 8,673$ g; $p = 0,3783$; Figura 7A) nem na ingestão de água (CTR: $352,6 \pm 35,07$ g vs DSC: $343,0 \pm 36,27$ g; $p = 0,8533$; Figura 7B).

Figura 7. Ingestão de ração e de água das ratas CTR e das DSC

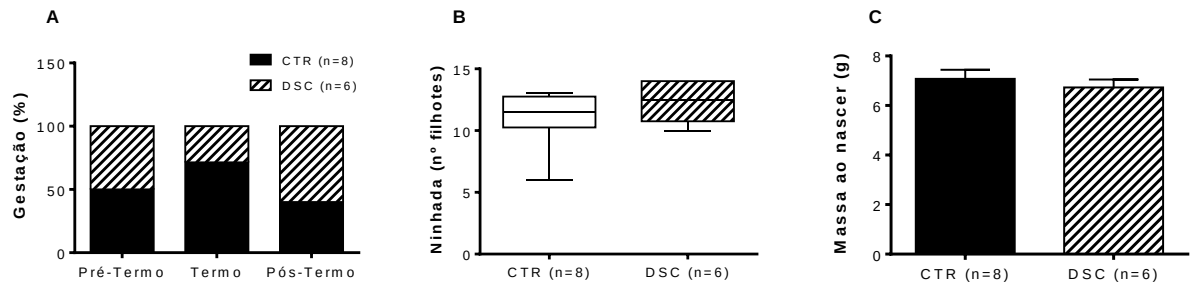


A: Ingestão de ração corrigida pelo peso das mães CTR e DSC ao início e durante as três semanas de gestação e ASC. B: Ingestão de água corrigida pelo peso das mães CTR e DSC ao início e durante as três semanas de gestação e ASC. Resultados expressos como média $\pm$ EPM. ASC.: área sob a curva; CTR.: grupo controle; DSC.: grupo dessincronizado; g.: gramas; mL.: mililitros; n.: número de animais.

4.1.3 Período de gestação, tamanho e massa corporal dos filhotes ao nascimento

A Figura 8A apresenta o período de gestação ($\chi^2 = 0,3277$; $p = 0,5670$), a 8B os dados referentes ao número de filhotes por ninhada (CTR: $11,00 \pm 0,8018$ vs DSC: $12,33 \pm 0,7601$; $p = 0,2511$) e a 8C o peso corporal de cada filhote ao nascimento (CTR: $7,080 \pm 0,3626$ vs DSC: $6,731 \pm 0,3196$; $p = 0,4842$). Como podemos observar não encontramos diferenças significantes na segunda e na terceira variáveis ao compararmos os grupos CTR e DSC, porém as quantidades de gestações a termo apresentaram uma tendência de prevalência menor no grupo DSC e as pré e pós-termo maior, se comparadas ao grupo CTR.

Figura 8. Período gestacional, número de filhotes por ninhada e massa ao nascer



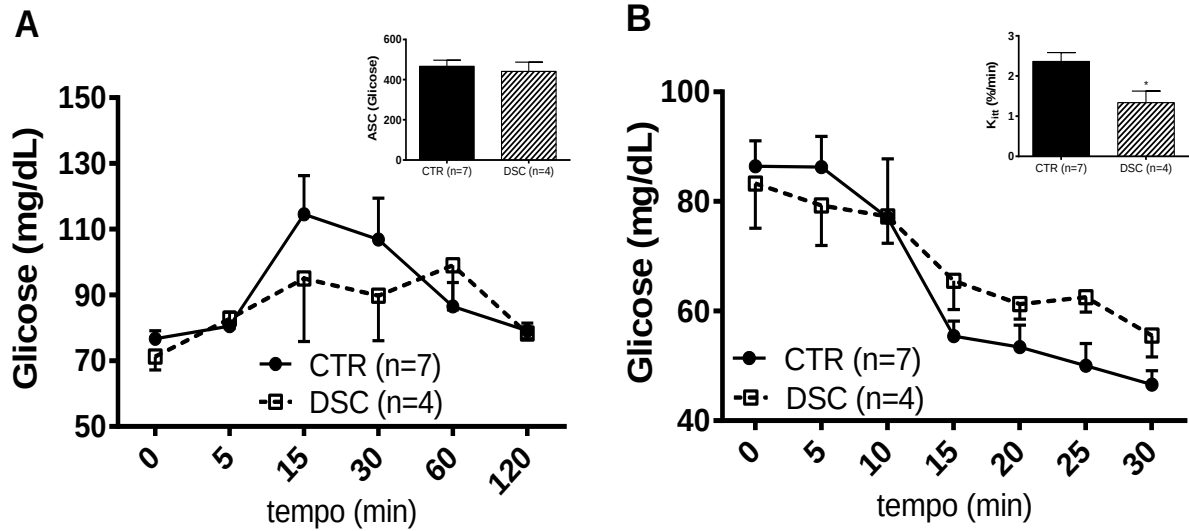
(A) Duração das gestações; (B) Quantidade de animais por ninhada; e (C) Massa corporal dos filhotes ao nascer. Resultados expressos como média $\pm$ EPM. CTR.: grupo controle; DSC.: grupo dessincronizado; g.: gramas; n.: número de animais.

4.1.4 oTTG e ipTTI

As curvas glicêmicas durante o oTTG e o ipTTI das mães CTR e DSC são demonstradas nas Figuras 9A e 9B, respectivamente. No decorrer dos pontos analisados observou-se uma diferença pelo teste ANOVA de duas vias [oTTG: $F(5, 66) = 4,518$; **** $p < 0,0001$; ipTTI: $F(6, 63) = 10,97$; **** $p < 0,0001$] porém não houve diferença significativa entre os grupos no decorrer dos testes [oTTG: $F(1, 66) = 0,02728$; $p = 0,8693$; ipTTI: $F(1, 63) = 1,724$; $p = 0,1940$].

Na área sob a curva analisada do oTTG não se observou diferença significativa entre os grupos pelo teste t (CTR: $466,5 \pm 30,75$ vs DSC: $471,3 \pm 43,77$; $p = 0,665$; Figura 9A). Já na análise do kitt no ipTTI observou-se uma diferença significativa entre os grupos (CTR: $2,361 \pm 0,2225$ vs DSC: $1,338 \pm 0,2891$; * $p < 0,05$; Figura 9B).

Figura 9. oTTG e ipTTI das mães CTR e DSC



(A) Comportamento da glicemia das mães CTR e DSC durante o oTTG no decorrer do tempo. (B) Comportamento da glicemia das mães CTR e DSC durante o ipTTI no decorrer do tempo. Resultados expressos como média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$. ASC.: área sob a curva; CTR.: grupo controle; DSC.: grupo dessincronizado; dL.: decilitro; kitt.: constante de decaimento da glicose plasmática; mg.: miligramas; min.: minutos; n.: número de animais.

4.1.5 Órgãos

No PN23, foram coletados os seguintes órgãos das mães CTR e DSC para pesagem, os quais não apresentaram diferenças significativas de massa corrigida pela tibia ou pela massa corporal pelo teste t (tabela 1).

Tabela 1. Órgãos coletados das ratas CTR e DSC

	CTR (n=8)	DSC (n=6)
coração (g/cm)	$248,8 \times 10^{-3} \pm 4,375 \times 10^{-3}$	$259,1 \times 10^{-3} \pm 6,824 \times 10^{-3}$
rim (g/cm)	$231,9 \times 10^{-3} \pm 3,733 \times 10^{-3}$	$225,8 \times 10^{-3} \pm 4,966 \times 10^{-3}$
adrenal (g/cm)	$12,45 \pm 0,3369 \times 10^{-3}$	$12,12 \pm 0,6566 \times 10^{-3}$
fígado (g/cm)	$2,871 \pm 0,1097$	$2,877 \pm 0,08099$
pâncreas (g/cm)	$220,7 \times 10^{-3} \pm 13,87 \times 10^{-3}$	$215,2 \times 10^{-3} \pm 26,31 \times 10^{-3}$
ta marrom (g/massa)	$0,08845 \times 10^{-2} \pm 674,6 \times 10^{-2}$	$0,08243 \times 10^{-2} \pm 535,7 \times 10^{-2}$
ovário (g/cm)	$18,77 \times 10^{-3} \pm 0,6974 \times 10^{-3}$	$18,95 \times 10^{-3} \pm 1,243 \times 10^{-3}$
ta mesentérico (g/massa)	$8,507 \times 10^{-3} \pm 0,5979 \times 10^{-3}$	$8,254 \times 10^{-3} \pm 1,022 \times 10^{-3}$
ta periuterino (g/massa)	$10,65 \times 10^{-3} \pm 1,070 \times 10^{-3}$	$10,19 \times 10^{-3} \pm 1,870 \times 10^{-3}$
ta retroperitoneal (g/massa)	$4,496 \times 10^{-3} \pm 0,4192 \times 10^{-3}$	$4,625 \times 10^{-3} \pm 0,8422 \times 10^{-3}$

Órgãos coletados das mães no PN23. Resultados expressos como média $\pm$ EPM. Cm.: centímetros; CTR.: grupo controle; DSC.: grupo dessincronizado; g.: gramas; n.: número de animais; TA: tecido adiposo.

4.2 PROLE

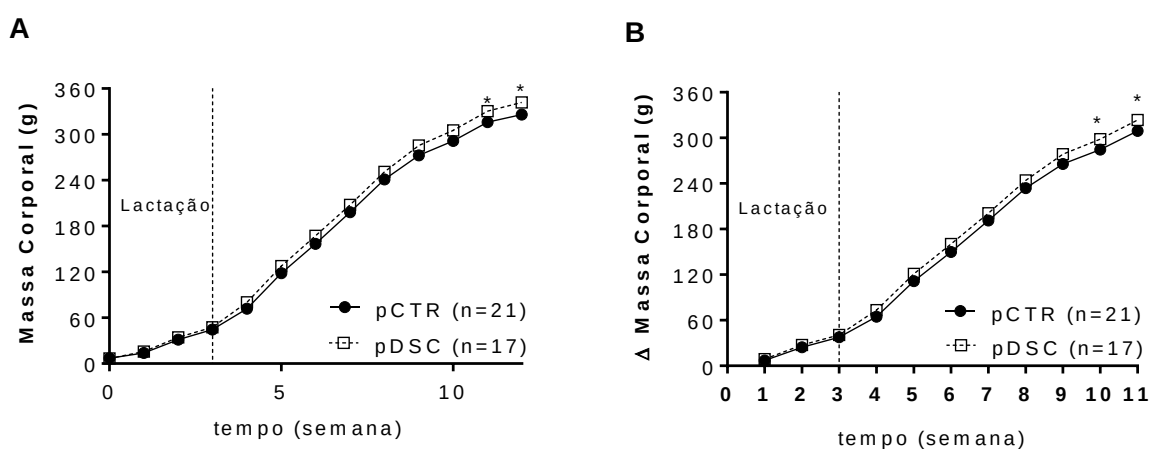
Insultos ocorridos durante a embriogênese que sejam capazes de influenciar a expressão gênica ou mecanismos epigenéticos amplificam o risco para doenças crônicas ao longo do desenvolvimento. Dessa forma buscamos avaliar se a dessincronização circadiana das mães durante o período de formação fetal tem papel importante na geração de agravos na vida adulta da prole.

4.2.1 Massa corporal e ingestão equivalente semanal de ração e água

A figura 10A demonstra a evolução semanal da massa corporal dos filhotes durante o período de lactação e ao longo das 8 semanas de desenvolvimento pelo teste ANOVA de duas vias, mostrou uma diferença significativa entre os grupos [F (1, 468) = 40,69; $p < 0,0001$], e ao longo do tempo [F (12, 468) = 2541; $p < 0,0001$], mas não na interação [F (12, 468) = 1.149; $p = 0,3182$]. O teste a posteriori de Bonferroni identificou que pDSC apresentou um maior peso corporal na 11^a e 12^a semana após o nascimento quando comparados com pCTR ($p < 0,05$).

Na figura 10B, podemos observar uma diferença significativa entre os grupos acerca da evolução semanal do ganho de massa dos filhotes do nascimento ao PN90 pelo teste ANOVA de duas vias entre os grupos [$F(1, 432) = 43,27$; $p < 0,0001$], e ao longo do tempo [$F(11, 432) = 2221$; $p < 0,0001$]. O teste a posteriori de Bonferroni identificou que pDSC apresentou um maior ganho de peso corporal na 10ª e 11ª semana após o nascimento quando comparados com pCTR ($p < 0,05$).

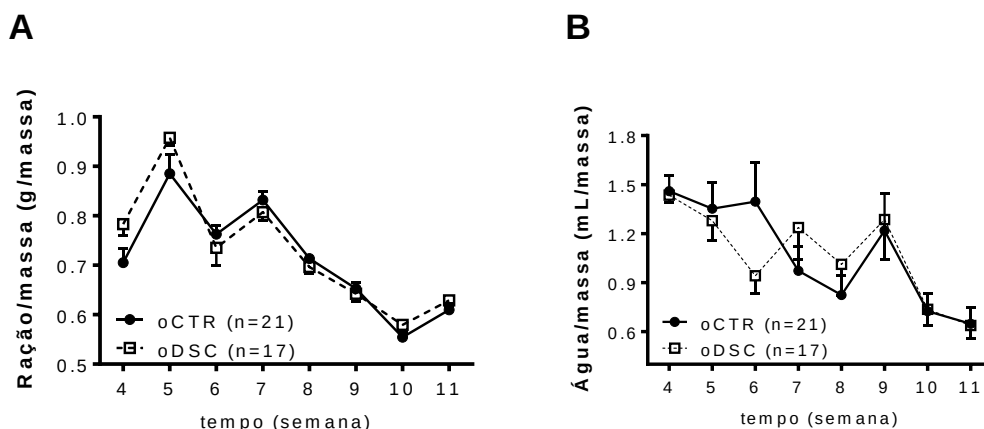
Figura 10. Evolução da massa e ganho de massa corporal dos filhotes pCTR e pDSC



(A) massa corporal dos filhotes pCTR e pDSC semanal durante 11 semanas de vida. (B) ganho de massa corporal dos filhotes pCTR e pDSC durante 11 semanas de vida. Resultados expressos como média $\pm$ EPM; * $p < 0,05$. pCTR.: grupo controle; pDSC.: grupo de mães dessincronizadas; g.: gramas; n.: número de animais; Δ .: variação.

Nas Figuras 11A e 11B observamos a evolução da ingestão corrigida pela massa corporal de ração e água durante as 8 semanas pós lactação das proles pCTR e pDSC através teste ANOVA de duas vias o qual não mostrou uma diferença significativa entre os grupos [$F(1, 288) = 1,949$; $p = 0,1638$; 11A] e [$F(1, 288) = 0,002150$; $p = 0,9630$; 11B], mas significativa ao longo do tempo [$F(7, 288) = 60,75$; $p < 0,0001$; 11A] e [$F(7, 288) = 6,577$; $p < 0,0001$; 11B].

Figura 11. Ingestão de ração e água equivalentes dos filhotes pCTR e pDSC

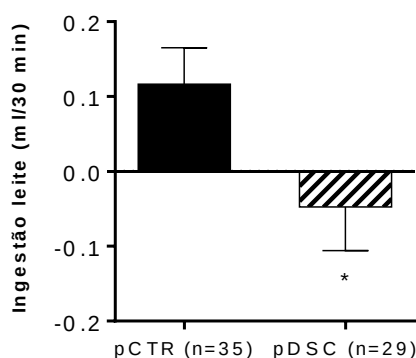


(A) Ingestão de ração semanal relativa ao peso dos filhotes pCTR e pDSC pós lactação durante 8 semanas. (B) Ingestão de água semanal relativa ao peso dos filhotes pCTR e pDSC pós lactação durante 8 semanas. Resultados expressos como média $\pm$ EPM; * $p < 0,05$. pCTR.: grupo controle; pDSC.: grupo de mães dessincronizadas; g.: gramas; n.: número de animais.

4.2.2 Ingestão de leite

O consumo de leite no PN8 foi menor no pDSC comparado ao pCTR (pCTR: $0,1165 \pm 0,04852$ ml/30min vs pDSC: $-0,04759 \pm 0,05830$ ml/30min; * $p < 0,05$; Figura 12) sendo encontradas diferenças significativas entre o peso inicial e o peso pós mamada dos filhotes.

Figura 12. Ingestão de leite dos filhotes pCTR e pDSC



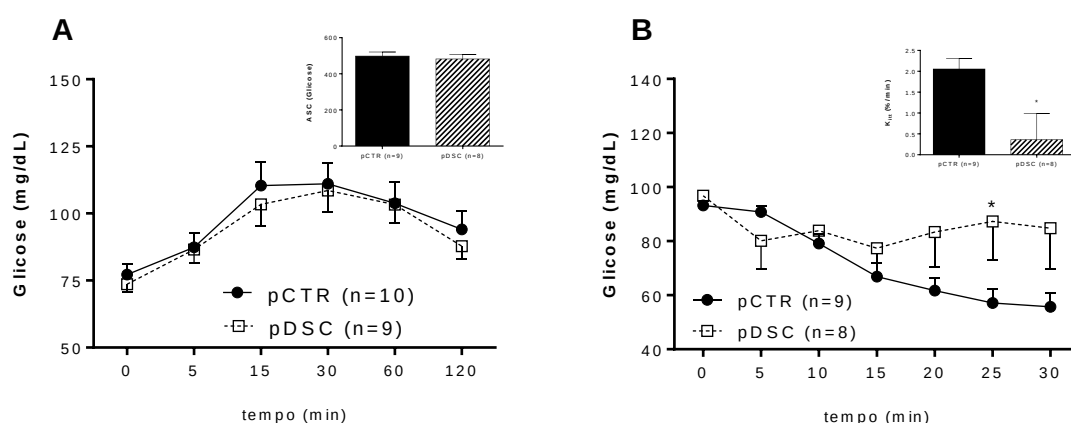
Ingestão de leite durante 30 minutos analisada a partir do peso final menos o peso inicial dos filhotes. Resultados expressos como média $\pm$ EPM; * $p < 0,05$. pCTR.: grupo controle; pDSC.: grupo de mães dessincronizadas; min.: minutos; ml.: mililitros; n.: número de animais.

4.2.3 oTTG e ipTTI

As curvas glicêmicas durante o oTTG e o ipTTI das proles pCTR e pDSC são demonstradas nas Figuras 13A e 13B, respectivamente. No decorrer dos pontos analisados observou-se uma diferença pelo teste ANOVA de duas vias no oTTG [$F(5, 90) = 7,989$; $p < 0,0001$], sem diferenças entre os grupos [$F(5,90) = 0,7948$; $p = 0,3750$] e na interação [$F(5,90) = 0,08142$; $p = 0,9950$]. Já a curva glicêmica induzida por administração de insulina ip a análise da variância de 2 vias mostrou um efeito sobre o tempo [$F(6, 105) = 2,970$; $p = 0,010$] e entre os grupos [$F(1, 105) = 9,819$; $p = 0,002$] e uma tendência na interação [$F(6,105) = 1,951$; $p = 0,079$]. A análise a posteriori pelo teste de Bonferroni indicou maior nível de glicemia após 25 minutos da curva glicêmica dos pDSC ($p < 0,05$).

Na área sob a curva analisada do oTTG não se observou diferença significativa entre os grupos pelo teste t. Já na análise da constante de decaimento da glicemia calculada pelo kitt durante o ipTTI, apresentou está reduzida no pDSC em comparação a do grupo controle (CTR: $1,832 \pm 0,3142$ vs DSC: $0,6373 \pm 0,6193$; $*p < 0,05$) (Figura 13B).

Figura 13. oTTG e ipTTI dos filhotes pCTR e pDSC

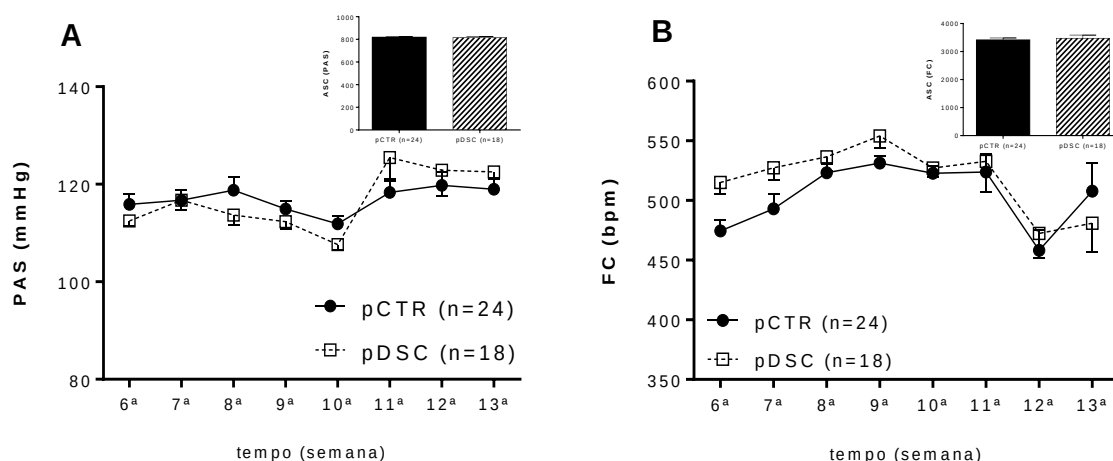


(A) Comportamento da curva glicêmica dos filhotes pCTR e pDSC durante o oTTG. (B) Comportamento da curva glicêmica dos filhotes pCTR e pDSC durante o ipTTI. Resultados expressos como média $\pm$ EPM; $*p < 0,05$. ASC.: área sob a curva; pCTR.: grupo controle; pDSC.: grupo de mães dessincronizadas; dL.: decilitro; kitt.: constante de decaimento da glicose sanguínea; mg.: miligramas; min.: minutos; n.: número de animais.

4.2.4 PAS e FC

Durante 8 semanas pós desmame, os filhotes foram submetidos a análise de PAS e FC através da pletismografia de cauda. A evolução da curva de PAS (Figura 14A) e FC (Figura 14B) durante as 8 semanas de pletismografia apresentou diferenças apenas ao longo do tempo [$F(7, 320) = 5,880$; $p < 0,0001$; 14A] e [$F(7, 304) = 6,491$; $p < 0,0001$; 14B]. A curva de PAS não apresentou diferenças significativas entre os grupos [$F(1, 320) = 0,02309$; $p = 0,8793$], ao contrário da curva de FC que, embora apontou diferença entre os grupos [$F(1, 304) = 3,902$; $p = 0,0491$] o teste de Bonferroni não foi capaz de detectar o momento da diferença.

Figura 14. PAS e FC dos filhotes pCTR e pDSC



(A) PAS dos filhotes pCTR e pDSC durante 8 semanas pós desmame. (B) FC dos filhotes pCTR e pDSC durante 8 semanas pós desmame. ASC: área sob a curva; Bpm: batimentos por minuto; CTR.: grupo controle; DSC.: grupo de mães dessincronizadas; FAC: frequência cardíaca; mmHg: milímetros de mercúrio; n.: número de animais; PAS: pressão arterial sistólica.

4.2.5 Órgãos coletados dos filhotes pCTR e pDSC

No PN90 os filhotes pCTR e pDSC foram eutanasiados e seus órgãos retirados para pesagem e tiveram sua massa corrigida pela tíbia ou pela massa corporal (Tabela 2). O pâncreas (pCTR: $0,1671 \pm 0,01191$ g/cm vs pDSC: $0,2090 \pm 0,01605$ g/cm; $*p < 0,05$) apresentou maior peso no grupo pDSC se comparado ao pCTR.

Tabela 2. Órgãos coletados dos filhotes pCTR e pDSC

	pCTR (n=18)	pDSC (n=18)
adrenal (g/cm)	$8,373 \times 10^{-3} \pm 0,3077 \times 10^{-3}$	$8,356 \times 10^{-3} \pm 0,3338 \times 10^{-3}$
fígado (g/cm)	$251,4 \times 10^{-2} \pm 5,023 \times 10^{-2}$	$253,0 \times 10^{-2} \pm 7,514 \times 10^{-2}$
pâncreas (g/cm)	$16,71 \times 10^{-2} \pm 1,191 \times 10^{-2}$	$20,90 \times 10^{-3} \pm 1,605 \times 10^{-2*}$
ta marrom (g/massa)	$0,6893 \times 10^{-3} \pm 5,344 \times 10^{-3}$	$0,773 \times 10^{-3} \pm 2,422 \times 10^{-3}$
ta epididimal (g/massa)	$0,7568 \pm 0,1353$	$0,5238 \pm 0,1400$
ta inguinal (g/massa)	$5,484 \times 10^{-3} \pm 0,6185 \times 10^{-3}$	$4,637 \times 10^{-3} \pm 0,5737 \times 10^{-3}$
ta mesentérico (g/massa)	$8,386 \times 10^{-3} \pm 0,3420 \times 10^{-3}$	$8,216 \times 10^{-3} \pm 0,3961 \times 10^{-3}$
ta periuterino (g/massa)	$10,65 \times 10^{-3} \pm 1,070 \times 10^{-3}$	$10,19 \times 10^{-3} \pm 1,870 \times 10^{-3}$
ta retroperitoneal (g/massa)	$11,43 \times 10^{-3} \pm 0,7573 \times 10^{-3}$	$10,29 \times 10^{-3} \pm 0,9271 \times 10^{-3}$

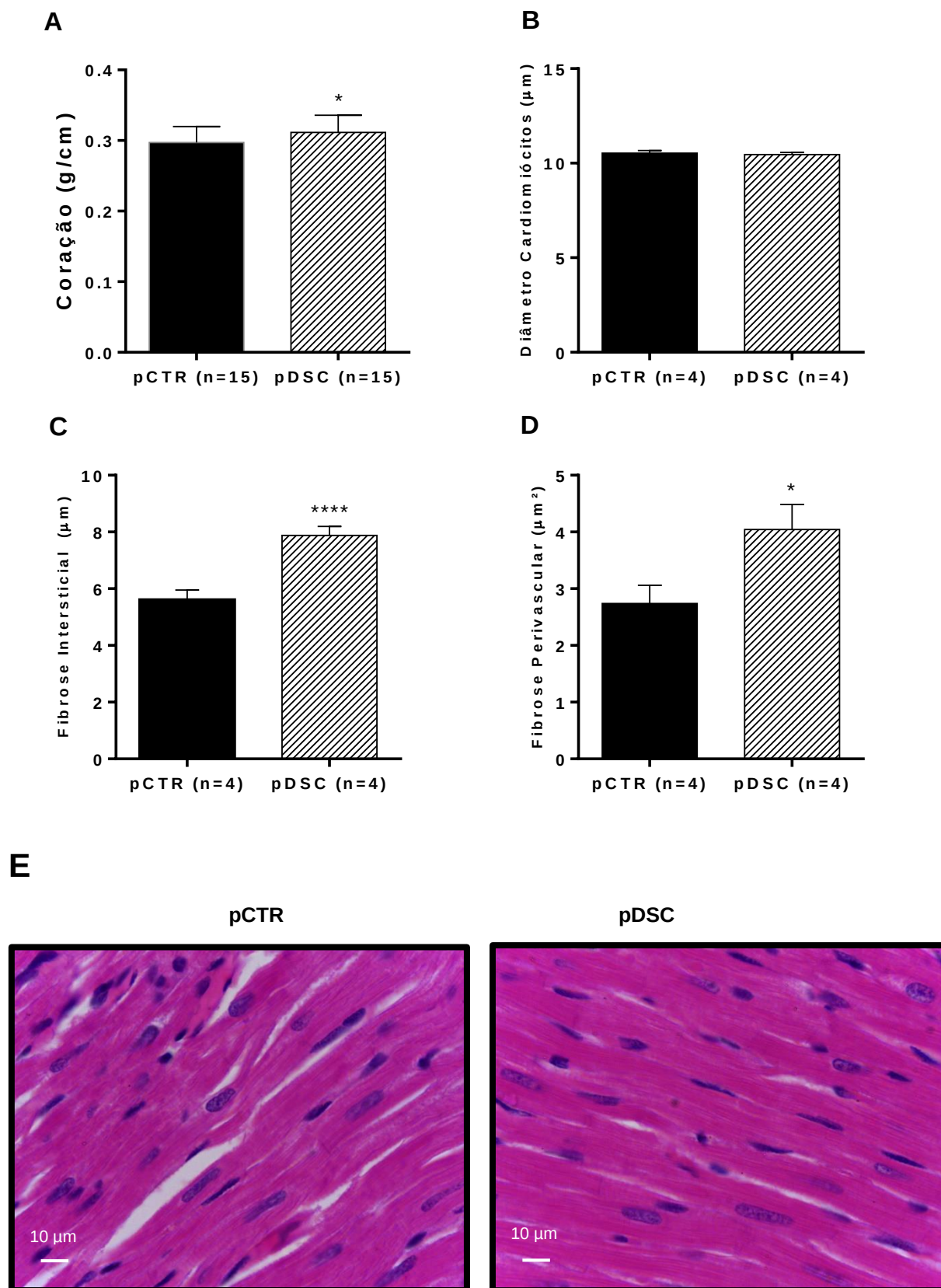
Órgãos coletados dos filhotes no PN90. Resultados expressos como média $\pm$ EPM; *p < 0,05. Cm.: centímetros; pCTR.: grupo controle; pDSC.: grupo de mães dessincronizadas; g.: gramas; n.: número de animais; TA: tecido adiposo.

4.2.6 Análises Histológicas e Morfométricas

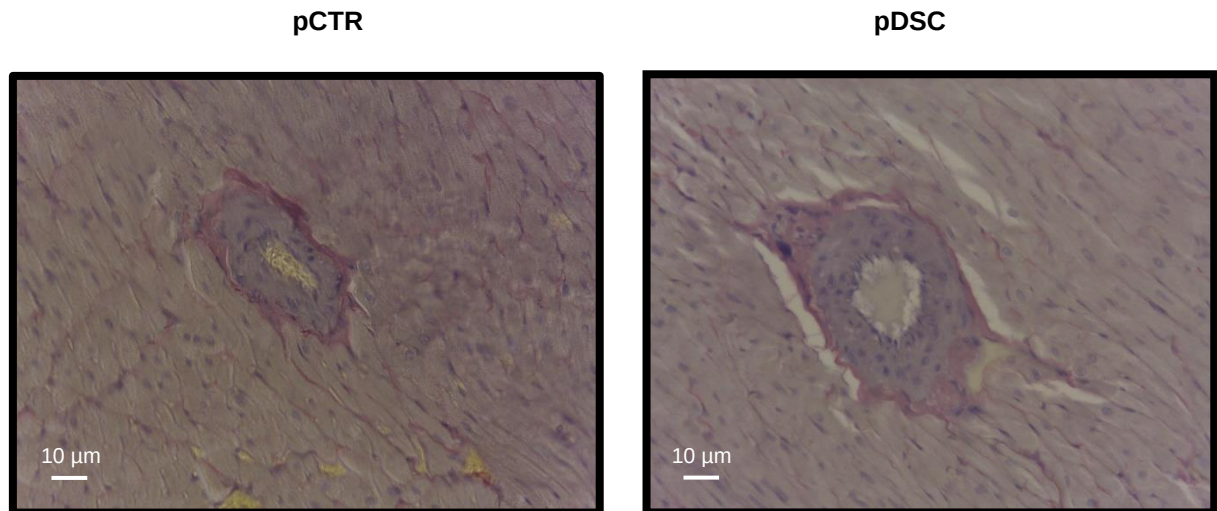
4.2.6.1 Coração

A massa do coração dos animais pDSC foi maior que no grupo pCTR (pCTR: $0,2971 \pm 0,005363$ g/cm vs pDSC: $0,3116 \pm 0,005880$ g/cm, *p < 0,05; Figura 15A). Ao analisarmos a morfometria do coração, encontramos um aumento significativo da fibrose perivascular (pCTR: $2,739 \pm 0,3215$ μm^2 vs pDSC: $4,044 \pm 0,4410$ μm^2 ; *p < 0,05; Figura 15D e 15E) e da fibrose intersticial (pCTR: $5,609 \pm 0,3450$ μm^2 vs pDSC: $7,878 \pm 0,3174$ μm^2 ; ****p < 0,0001; Figura 15C e 15F) nos animais dessincronizados, em comparação com os controles, sem observar diferença no diâmetro dos cardiomiócitos (pCTR: $10,54 \pm 0,1295$ μm vs pDSC: $10,45 \pm 0,1178$ μm , p = 0,6367 Figura 15B).

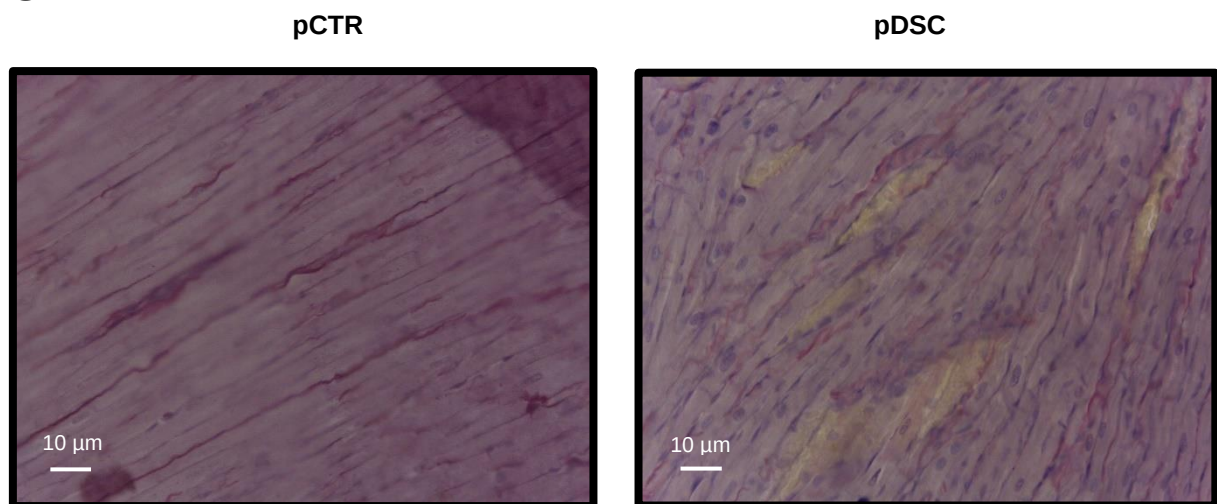
Figura 15. Massa e Análises Histológicas e Morfométricas: Coração dos grupos pCTR e pDSC



F



G



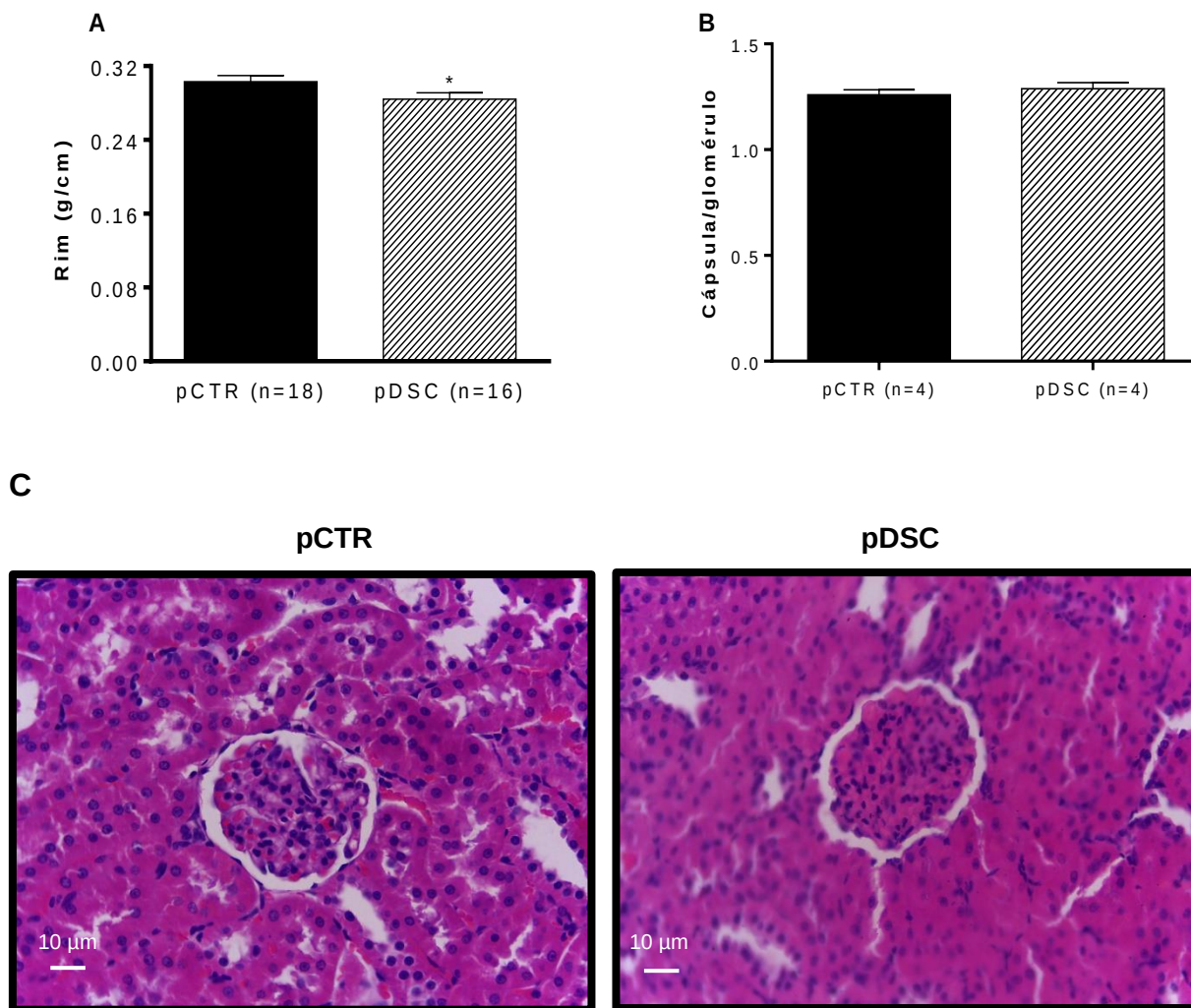
(A) Massa do coração relativizada pelo comprimento da tibia; (B) Diâmetro dos cardiomiócitos; (C) Fibrose intersticial; (D) Fibrose perivascular; (E) Fotomicrografias representativas de cardiomiócitos de animais controle (pCTR) e de animais dessincronizados (pDSC); (F) Fotomicrografias de fibrose perivascular de animais controle (pCTR) e de animais dessincronizados (pDSC), (G) Fotomicrografias representativas de fibrose intersticial de animais controle (pCTR) e de animais dessincronizados (pDSC). Imagens obtidas com objetiva de 40X. Resultados expressos como média $\pm$ EPM. Teste t de Student; * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$, g.: gramas; μ m.: microgramas; n.: número de animais; pCTR.: grupo controle; pDSC.: grupo de mães dessincronizadas.

4.2.6.2 Rim

A massa do rim dos animais pDSC foi menor que no grupo pCTR (pCTR: $0,3031 \pm 0,006654$ g/cm vs pDSC: $0,2840 \pm 0,006954$ g/cm, * $p < 0,05$; Figura 16A).

Ao analisarmos a morfometria do rim não encontramos diferenças significativas na razão área da cápsula/área do glomérulo (pCTR: $1,259 \pm 0,02394$ vs pDSC: $1,288 \pm 0,02866$; $p = 0,449$; Figura 16B e 16C) nos animais dessincronizados, em comparação com os controles.

Figura 16. Massa e Análises Histológicas e Morfométricas: Rim dos grupos pCTR e pDSC



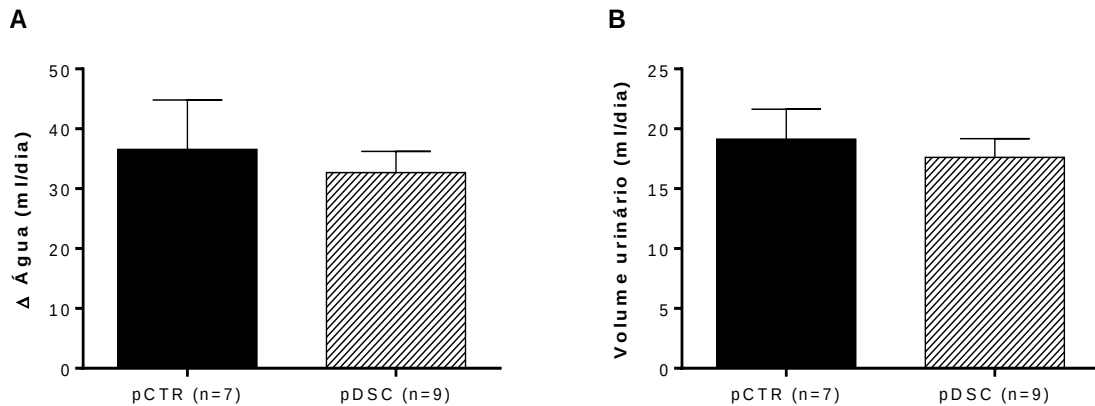
(A) Massa do rim relativizada pelo comprimento da tíbia (g/cm); (B) Razão área da cápsula glomerular/área do glomérulo; (C) Fotomicrografias representativas de glomérulo e cápsula glomerular de animais controle (pCTR) e de animais dessincronizados (pDSC). Imagens obtidas com objetiva de 40X. Resultados expressos como média $\pm$ EPM. Teste t de Student. Cm.: centímetros; g.: gramas; ml.: mililitros; n.: número de animais; pCTR.: grupo controle; pDSC.: grupo de mães dessincronizadas.

4.2.7 Avaliação da Excreção Urinária e Ingestão de Água

Para avaliar a ingestão de água proporcionalmente ao volume urinário em 24h foi utilizada a gaiola metabólica, na qual não encontramos diferença significativa na

ingestão de água (pCTR: $36,57 \pm 8,243$ ml vs pDSC: $32,67 \pm 3,555$ ml; $p = 0,6748$; Figura 17A) e nem no volume urinário (pCTR: $19,14 \pm 2,490$ ml vs pDSC: $17,61 \pm 1,570$ ml; $p = 0,6136$; Figura 17B) entre os grupos.

Figura 17. Avaliação da Excreção Urinária e Ingestão de Água dos grupos pCTR e pDSC em 24h

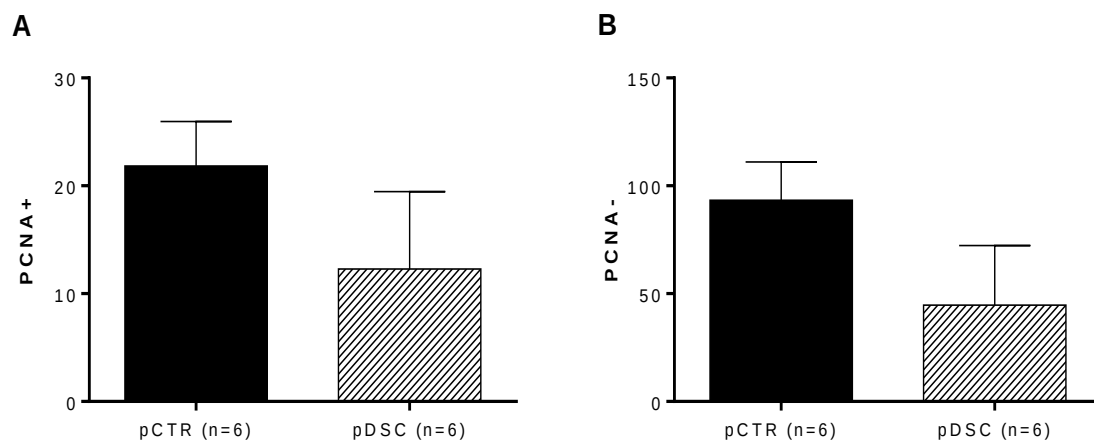


(A) Ingestão de água e (B) Volume urinário em 24h. Resultados expressos como média $\pm$ EPM. Teste t de Student. ML.: mililitros; n.: número de animais; pCTR.: grupo controle; pDSC.: grupo de mães dessincronizadas.

4.2.8 Imunohistoquímica tecido cardíaco

A técnica de imuno-histoquímica realizada nos tecidos cardíacos não demonstrou diferença significativa entre as porcentagens de positividade (pCTR: $21,85 \pm 4,113\%$ vs pDSC: $12,30 \pm 7,164\%$; Figura 18A) nem de negatividade (pCTR: $93,28 \pm 17,78\%$ vs pDSC: $44,63 \pm 27,69\%$; Figura 18B).

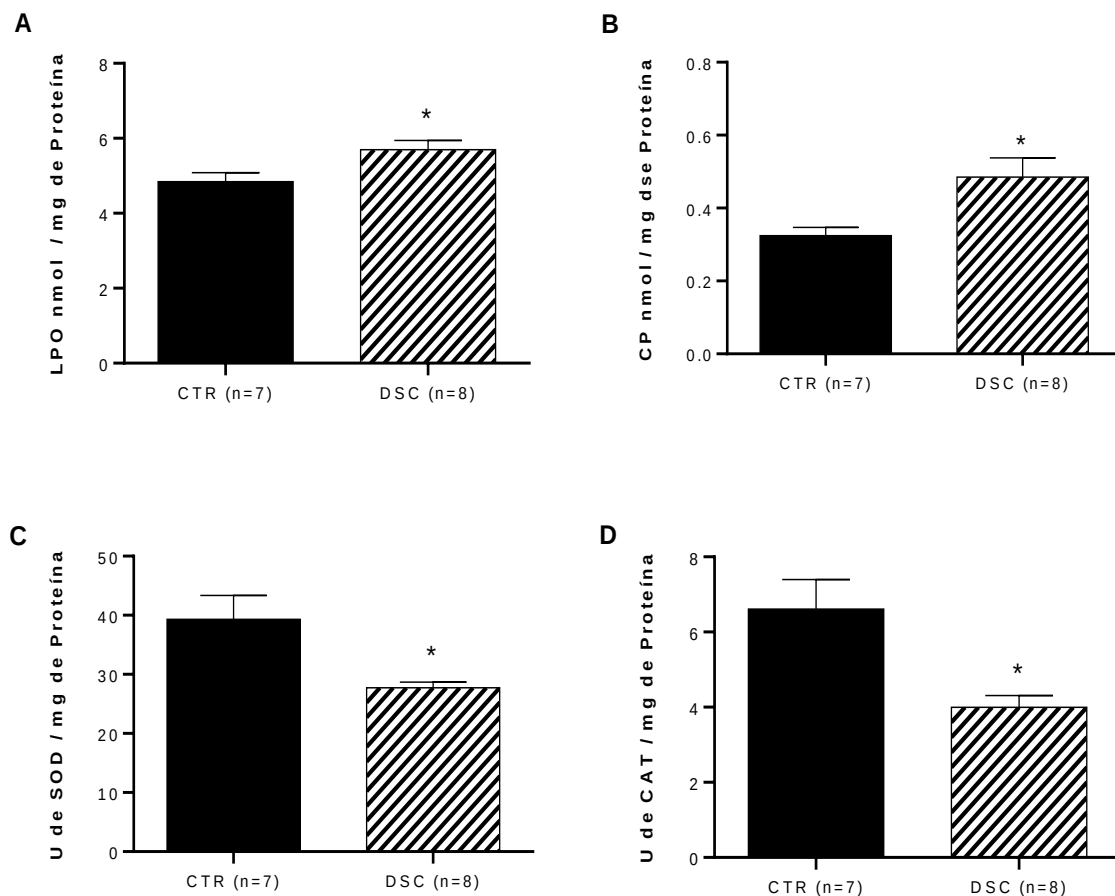
Figura 18. Comparação entre os percentuais de positividade e negatividade de PCNA em tecido cardíaco dos grupos pCTR e pDSC



(A) Porcentagem de PCNA positivo e (B) Porcentagem de PCNA negativo de tecido cardíaco dos filhotes pCTR e pDSC em PN90. Resultados expressos como média $\pm$ EPM. Teste t de Student. N.: número de animais; pCTR.: grupo controle; pDSC.: grupo de mães dessincronizadas.

4.2.9 Testes Bioquímicos Tecido Cardíaco

Figura 19. Dosagens de LPO, CP, SOD e CAT em tecido cardíaco dos grupos pCTR e pDSC



(A) Efeitos da dessincronização circadiana durante a gestação nos níveis de LPO, (B) Níveis de CP, (C) Atividade da SOD, e (D) Atividade da CAT de tecido cardíaco dos filhotes pCTR e pDSC em PN90. Resultados expressos como média $\pm$ EPM. Teste t de Student. CAT.: catalase; CP.: proteína carbonilada; LPO.: peroxidação lipídica; N.: número de animais; pCTR.: grupo controle; pDSC.: grupo de mães dessincronizadas; SOD.: superóxido dismutaseóidio;

5 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que durante a gestação a dessincronização interna forçada pelo protocolo de T22, proposto por Campuzano *et al.* (1998), não resultou em consequências reprodutivas negativas nas ratas, porém induziu uma menor sensibilidade à insulina após o período de amamentação. Contudo os filhotes das ratas DSC apresentaram maior ganho de massa corporal total, menor sensibilidade à insulina, atrofia renal, hipertrofia com remodelamento e estresse oxidativo cardíaco na fase adulta, porém sem alterar os níveis PAS e FC ao longo do desenvolvimento.

O protocolo T22 durante a gestação promoveu a dissociação do ritmo de atividade/repouso das mães em dois componentes distintos, o LEC e o NLEC, comprovado pela maior atividade locomotora das ratas DSC durante a fase clara e menor durante a fase escura se comparadas às CTR. Embora não foi observado um pico robusto do ritmo em livre curso durante a gestação, o maior nível de atividade locomotora das ratas submetidas ao T22 indica uma dessincronização circadiana do ritmo de atividade/repouso. Assim a dessincronização circadiana promovida pelo T22 por ser um ótimo modelo animal para observar os efeitos epigenéticos.

Neste estudo o nosso objetivo era verificar se alterações metabólicas geradas nas mães durante a gestação, devido a uma dessincronização forçada do ritmo de atividade, poderiam levar a uma programação de distúrbios cardiometabólicos no feto com reflexos já na fase adulta. Os mecanismos associados a programação fetal ainda não foram explicados, porém algumas hipóteses podem ser levantadas com relação ao desfecho aqui observado.

No PN22 as mães dessincronizadas apresentaram uma menor taxa de decaimento da glicose se comparadas aos seus pares controles. Semelhantes às suas mães, os filhotes também apresentaram uma menor taxa de decaimento da glicose na fase adulta. Está bem estabelecido na literatura uma maior probabilidade de resistência insulínica na fase adulta de filhos de mães que apresentaram diabetes gestacional (Westermeyer, *et al.*, 2014). Porém, o mecanismo relacionado a essa interrelação não está totalmente esclarecido. Acredita-se que um excesso de nutrientes está associado com respostas adaptativas persistentes de sobrecarga de glicose, aminoácidos e lipídeos, levando a inflamação crônica e estresse oxidativo

celular, que ativa cascatas intracelulares promovendo liberação de substâncias bioativas circulantes tais como as adipocinas (ex.: leptina, adiponectina e resistina), e os marcadores inflamatórios como as interleucinas e o fator de necrose tumoral alfa (TNF α) (Dong, *et al.*, 2013; Duque-Guimarães and Ozanne, 2013). No entanto, grande parte destes estudos associam estes mecanismos ao aumento dos adipócitos das mães durante a gestação. Por outro lado, outro fator associado a programação para resistência à insulina na fase adulta é o baixo peso ao nascer, geralmente associado a uma subnutrição materna (Whincup, *et al.*, 2008). Curiosamente, em nosso estudo não foi observada diferença no peso corporal das ratas durante a gestação sob T22, quando comparada as ratas em T24. Contudo, pode-se observar uma maior atividade locomotora na fase clara do ciclo nas ratas em T22, a qual podemos associar um maior consumo alimentar durante o período de inatividade destas ratas. Estudos têm apontado uma forte associação entre o horário da alimentação e a resistência à insulina em indivíduos adultos. Desta forma, é lícito supor que, dentre os possíveis mecanismos de programação fetal da resistência insulínica, também possa estar atribuída a um desalinhamento circadiano ligado ao horário do dia da ingestão alimentar.

Neste estudo, observamos também um maior peso do pâncreas e do coração, e um menor peso do rim nos filhotes de mães dessincronizadas se comparados aos filhos de mães em T24. Com esse aumento da massa do coração foi identificada uma maior deposição de fibrose perivascular e intersticial no tecido cardíaco, provavelmente resultado de um aumento do estresse oxidativo.

É comprovado que processos fisiológicos durante a gestação são regulados pelo NSQ e apresentam um ritmo circadiano que acompanha o ciclo claro/escuro, como por exemplo temperatura corporal, contração uterina, fluxo sanguíneo, disponibilidade de glicose, níveis hormonais, pressão do líquido amniótico, entre outros. E sua sincronização é de suma importância na manutenção da hemodinâmica da mãe e do feto, portanto qualquer alteração ambiental crônica pode trazer complicações. O eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA), uma das vias com grande participação nesses processos, é extremamente responsiva à regulação por estresse, antecipação alimentar e mecanismos de feedback negativo (Varcoe, *et al.*, 2013).

Em estudo cujas mães foram submetidas a uma inversão de ciclo a cada 3-4 dias durante a gestação foi observado um ganho de massa corporal menor do grupo

dessincronizado nas duas primeiras semanas e o contrário ocorreu na última semana gestacional, sem apresentar diferenças significativas na ingestão de ração durante o período (Varcoe *et al.*, 2013). Já outro estudo que utilizou como protocolo a privação de sono encontrou uma diminuição de peso do grupo privado ao final da gestação (Thomal *et al.*, 2010). No presente estudo, as fêmeas submetidas ao protocolo T-22 durante a gestação não apresentaram alterações significativas quanto ao ganho de peso e consumo alimentar gestacional quando comparadas às fêmeas do grupo controle. Contudo, ao final do período de lactação as ratas DSC apresentaram uma menor taxa de decaimento da glicemia, analisado pelo KiTT da curva glicêmica induzida pela administração de insulina.

Essa taxa menor no grupo DSC é um marcador que pode indicar uma intolerância à glicose. Considerando que o teste ipTTI ocorreu ao final do período da lactação, e as mães estavam expostas ao ciclo claro/escuro de 12-12h, o que não alteraria o ritmo de secreção de melatonina, nossa principal hipótese para a alteração na intolerância à glicose das ratas DSC, nessa fase, seria em decorrência de uma maior sobrecarga de estresse ao cuidado parental, visto que elas estavam submetidas a um ambiente hostil durante a gestação. Diversos estudos têm demonstrado os efeitos dos glicocorticoides sobre a homeostase glicêmica em diferentes modelos de estresse em animais (Hsu and Tain, 2020; Tsai *et al.*, 2019).

Outra hipótese poderia estar associada ao fato de que a desregulação da sinalização do receptor de insulina no hipotálamo, o qual também pode ser responsável por provocar resistência insulínica (Bouret, 2009).

Outro aspecto importante para se destacar sobre o modelo de dessincronização T-22 durante a gestação é que ele não impactou negativamente sobre os parâmetros gestacionais avaliados em nosso estudo. Há evidências demonstrando que a ruptura circadiana, alterando a ritmicidade fisiológica na gestação, pode levar à parto prematuro, baixo peso fetal e outros prejuízos ao feto (Mendez *et al.*, 2016). Como pode se observar neste estudo, não houve alterações significativas quanto tempo de gestação, número de filhotes por ninhada e o peso ao nascer entre as ratas DSC e CTR, assim como demonstrado também em outros estudos com protocolo de inversão de ciclo LD (Varcoe, *et al.*, 2011).

Protocolo utilizando atraso ou avanço de fase a cada 5-6 dias durante a gestação avaliou redução na quantidade de gestações a termo em ambas as

alterações se comparadas as mães controles, indo de encontro ao comportamento do grupo dessincronizado observado em nosso estudo (Summa, *et al.*, 2012).

Na placenta foram encontrados receptores para melatonina, com ação antioxidante, a qual atua principalmente na proteção placentária contra degradação por parte de radicais livres além da regulação imunológica, assim, um rompimento em sua liberação pode ser um fator de descontrole do estresse oxidativo nos tecidos fetais, ainda imaturos para conter as causas. Além de atuar enviando informações fóticas ao tecido cerebral do bebê (Hsu and Tain, 2020). Dessa forma, alterações nos níveis plasmáticos maternos de melatonina foram associados a aumento do risco de gestações pré-termo, restrição do crescimento uterino e pré-eclâmpsia, distúrbios associados ao aumento de natimortos, restrição de crescimento fetal e retardo na formação do SNC. Apesar de termos identificado uma tendência ao baixo peso ao nascer na prole das mães DSC essa não foi significativa (Bagci *et al.*, 2020). Portanto, os impactos negativos sobre a gestação, podem estar associados a supressão crônica de melatonina materna, e em menor grau com as alterações em sua ritmicidade circadiana.

De forma aguda, os glicocorticoides atuam por feedback negativo na regulação da secreção do Fator Liberador de Corticotrofina (CRH) e do Hormônio Adenocorticotrófico (ACTH). Em situações nas quais o estresse se torna crônico, como por exemplo na captação alterada das informações ambientais pelo NSQ, a inibição do ACTH por esse mecanismo se mostra alterada, o que acaba modificando diversos fatores hormonais e neuronais associados. Esse comportamento também pode ser explicado pela alteração na secreção de melatonina durante a noite, a qual também modula a produção de diversos hormônios durante o dia seguinte. A barreira placentária consegue inativar os glicocorticoides maternos de modo a manter os níveis fetais estáveis, porém em condições estressantes, um nível excessivo pode saturar a barreira, interferindo no desenvolvimento do sistema de temporização interno fetal, sugerindo alterações irreversíveis do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (Cipolla-Neto and Amaral, 2018; Dallman, *et al.*, 2004; Hsu and Tain, 2020).

Os filhotes pDSC apresentaram um aumento de massa corporal maior na 10^a e 11^a semana de vida se comparados aos pCTR mesmo não tendo sido identificada modificação na ingestão de ração. Estudo de restrição calórica na primeira metade da gestação de ratas, ocasionou em um fenótipo de maior adiposidade, hiperinsulinemia

e hiperleptinemia aos 5 meses de idade da prole, efeitos metabólicos profundos mesmo que não tenha afetado o peso ao nascer (García, *et al.*, 2010). O que não foi o caso do nosso estudo, no qual nem as mães durante a gestação, nem os fetos durante o desenvolvimento apresentaram alteração na ingestão alimentar. Porém a ingestão de leite no PN8 estava alterada no grupo pDSC, que perdeu peso após a mamada se comparado do pCTR, podendo também estar associada a uma alteração do horário de ingestão; e precária ingestão de leite durante fase de amamentação pode provocar aumento nos níveis de leptina sérica que pode acompanhar prejuízos irreversíveis na regulação do peso corporal e na homeostase da glicose no decorrer do desenvolvimento, podendo justificar o ganho de peso ao final da vida (Bouret, 2009).

Em estudo utilizando protocolo de inversão do ciclo claro/escuro no período de prenhez, os filhotes das mães que sofreram insulto durante a gestação apresentaram peso maior ao final dos 3 meses de vida se comparados aos seus pares controle, com maior prevalência no tecido adiposo retroperitoneal. Apesar do aumento de massa corporal observado nos filhotes em nossa pesquisa, os tecidos adiposos não apresentaram diferenças significativas entre os grupos, mesmo ao correlacioná-los ao peso final. Portanto, tal diferença pode ser explicada por um incremento de tecido livre de gordura como músculo, órgãos ou ossos (VARCOE *et al.*, 2013).

Em animais noturnos, a produção e utilização de glicose demonstram um aumento ao final da fase clara, preparando o organismo para a fase de atividade. Somado a isso, a glicemia nesses mamíferos é aumentada pela exposição à luz em diferentes momentos do dia, através de projeções do sistema nervoso autônomo até a estimulação de órgãos como fígado, músculo e pâncreas (Jha, *et al.*, 2015).

Nos filhotes, as curvas glicêmicas durante o oTTG não apresentaram diferenças, mas a kitt dos pDSC apresentou uma queda menos acentuada, indicando uma possível resistência à insulina. O que pode explicar o aumento no peso do pâncreas dos animais pDSC em comparação aos seus controles, pois a não eficiência da atuação desse hormônio provoca um aumento de sua síntese, buscando aumentar a tolerância das células à glicose (Cipolla-Neto and Amaral, 2018). Contudo precisa-se detalhar mais estes achados a partir da análise histológica do tecido pancreático.

Com alteração do fotoperíodo a cada 3 ou 4 dias durante a gestação, Varcoe e colaboradores (2011) demonstraram uma intolerância a glicose e resistência à insulina na prole com 12 meses de idade.

Todos os tecidos associados ao metabolismo como fígado, músculo, TA e, claro, pâncreas, são alvos da melatonina. Portanto, a resistência insulínica e tolerância à glicose nos filhotes podem ser explicadas tanto pela alteração da expressão dos genes relógio periféricos quanto do NSQ, bem como sua programação circadiana influenciada pelo ritmo do relógio central e produção de melatonina maternos (Bagci *et al.*, 2020).

Quedas dos níveis desse hormônio também estão associadas à redução de translocação do GLUT4 em todos os tecidos insulina-dependentes. Por isso alterações dos níveis noturnos de melatonina estão associados a anormalidades endócrinas como intolerância à glicose e resistência à insulina, demonstrando seu papel importante no estímulo à captação de glicose pelos adipócitos e células musculares, e, conseqüentemente, diabetes materna resultando em hiperinsulinemia, podendo provocar alterações morfológicas hipotalâmicas importantes no feto, que por sua vez, tem a capacidade de afetar a organização metabólica na vida adulta (Bagci *et al.*, 2020; Bouret, 2009; Cipolla-Neto and Amaral, 2018).

Portanto, apesar de não termos avaliado a glicemia das mães no período gestacional, não podemos excluir a possibilidade de que as alterações metabólicas observadas na prole adulta de mães dessincronizadas tenham sido programadas devido a uma exposição a hiperglicemia pré-natal.

A regulação da PA pode ser realizada por diversos processos: vasoconstrição, FC, contratilidade cardíaca, temperatura corporal e função renal, e qualquer alteração dos ritmos circadianos de algum desses fatores pode influenciar essa variável. Assim como aumento nos níveis de glicocorticoides, supressão de melatonina, estresse oxidativo e fatores inflamatórios (Mendez, *et al.*, 2016).

A melatonina se mostrou também um importante regulador das oscilações de pressão arterial, contribuindo para seu declínio normal durante a noite e sua elevação durante o período de atividade. Somado a isso temos que esse hormônio atua como componente antioxidante endotelial, combatendo o estresse oxidativo causado pela hipertensão arterial, podendo estar associado à redução da resistência arterial periférica. Dessa forma, podemos dizer que a melatonina é essencial na proteção do

sistema cardiovascular bem como na prevenção de lesões no seu órgão principal (Bagci *et al.*, 2020).

Quando adultos, os filhotes não apresentaram alteração da PAS nem FC se comparados aos pCTR, porém maior deposição de tecido fibrótico foi observado no coração dos filhotes das mães dessincronizadas sugerindo mecanismo de estresse oxidativo aumentado, visto que a expressão de enzimas antioxidantes (SOD e CAT) estava reduzida e a de marcadores oxidativos como peroxidação lipídica (LPO) e proteína carbonilada estava aumentada no tecido cardíaco.

Sobrecarga de pressão no ventrículo esquerdo é um dos fatores que podem resultar em injúrias aos cardiomiócitos e, conseqüentemente, induzir aumento na deposição de fibrose intersticial e perivascular (Frangogiannis, 2019).

Estudos epigenéticos como o de Lima e colaboradores (2014) demonstraram que a prole de ratas submetidas à privação de sono durante o período gestacional desenvolve hipertensão arterial na fase adulta, corroborando com estudo de Thomal e colaboradores (2010). Em nosso estudo não foi observado um aumento da PAS e FC, não sendo esse o único mecanismo responsável por indicar um recrutamento de macrófagos e linfócitos fibrogênicos, com conseqüente secreção de citocinas e fatores de crescimentos, diretamente associados a estimulação da ativação e expansão fibroblástica (Frangogiannis, 2019).

Galdames (2014), em seu estudo, demonstrou que o transcriptoma cardíaco fetal responde a alterações do sistema circadiano materno, podendo estabelecer conseqüências a longo prazo na prole de mães que tiveram o ciclo de luz modificado. Outra pesquisa, realizada por Chaves e colaboradores (2019), identificou presença de fibrose no coração de filhotes machos de 20 semanas de cujas mães foram dessincronizadas durante a gestação, não encontrando o mesmo resultado em prole controle.

O ritmo do sistema renina-angiotensina-aldosterona também demonstrou ser controlado pelo NSQ, apresentando uma queda gradual com o decorrer do dia e um aumento durante a noite, com pico de renina, angiotensina II e aldosterona nas primeiras horas da manhã. Portanto, o peso reduzido dos rins da pDSC pode ser justificada pela redução na produção de renina devido à alteração do fotoperíodo sofrida durante a gestação maternos (Bagci *et al.*, 2020).

No que se refere aos órgãos coletados da prole, estudo que submeteu as mães à privação de sono refletiu um aumento do fluxo plasmático renal e da filtração glomerular na prole macho aos três meses de vida, com diminuição na quantidade de néfrons, podendo ser justificado por estresse aumentado durante a embriogênese, porém com mecanismos não tão bem esclarecidos (Thomal *et al.*, 2010). Em nosso estudo observamos uma diminuição na massa dos rins do pDSC se comparado ao seu par controle. Mesmo analisando ingestão de água e volume urinário durante 24 horas não encontramos diferenças nesses parâmetros. Buscamos então analisar a morfometria do órgão através da histologia e a razão cápsula glomerular/glomérulo que também não foram diferentes entre os grupos.

Nosso objetivo com esse estudo foi demonstrar que estressores durante o período gestacional como por exemplo alterações luminosas podem trazer consequências ao feto na vida adulta. Se estendermos a gravidade dos distúrbios gerados na prole de ratas dessincronizadas para as gestantes expostas à luz artificial durante trabalhos por turnos, estas devem ser mais investigadas, de forma a se buscar a solução do desafio de prevenir e/ou reduzir a incidência de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT).

6 CONCLUSÃO

A exposição crônica em ratas Wistar durante o período gestacional à um ciclo claro/escuro diferente de 24h ocasionou alterações cardiometabólicas na prole adulta relacionadas a um maior risco de distúrbios cardiovasculares e associados ao metabolismo.

O modelo T22 nas mães acarretou:

- Resistência à ação da insulina exógena;
- Nenhuma influência nos aspectos reprodutivos;

O insulto durante a gestação provocou na prole:

- Aumento da massa corporal, assim como no ganho de massa dos filhotes na vida adulta;
- Aumento na massa do coração e pâncreas;
- Redução da massa do rim;
- Nenhuma alteração na PAS e FC durante 8 semanas de vida;
- Aumento na deposição de fibrose perivascular e intersticial;
- Aumento do estresse oxidativo.

Assim, demais estudos podem ser elaborados visando compreender os principais mecanismos fisiopatológicos observados.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aebi, H., (1984), "Catalase. Enzym Act Oxidoreductases", Vol. 51, pp. 674–684.
- Amaral, F.G., and Cipolla-Neto, J., (2018), "A brief review about melatonin, a pineal hormone", *Archives of Endocrinology and Metabolism*, Vol. 62, No. 4, pp. 472-479.
- Amaral, V. J., (2019), "Efeitos metabólicos e reprodutivos da sobrenutrição pós-natal precoce em ratas Wistar provenientes da redução de ninhada durante a lactação: Consequências na primeira e segunda geração", Dissertação, Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás.
- Bagci, S. *et al.*, (2020), "Effects of altered photoperiod due to COVID-19 lockdown on pregnant women and their fetuses", *Chronobiology International*, Vol. 37, pp. 961-973.
- Bailey, K.R., *et al.*, (2009), "Anxiety-Related Behaviors in Mice", *Frontiers in Neuroscience*, In: *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*. 2ed, Boca Raton, FL.
- Bouret, S.G., (2009), "Early Life Origins of Obesity: Role of Hypothalamic Programming", *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, Vol. 48, pp. 31-38.
- Bradford, M. M., (1976), "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Analytical Biochemistry*, Vol. 72, pp. 248–254.
- Buijs, R.M. and Kalsbeek, A., (2001), "Hypothalamic integration of central and peripheral clocks", *Neuroscience*, Vol. 2, pp. 521-526.
- Campuzano, A, *et al.*, (1998), "Dissociation of the Rat Motor Activity Rhythm Under T Cycles Shorter Than 24 Hours" *Physiology Behavior*, Vol. 63 No. 2, pp. 171-176.
- Chaves, I., *et al.*, (2019), "Gestational jet lag predisposes to later-life skeletal and cardiac disease", *Chronobiology International*, Vol. 36, No. 5, pp. 657-671.
- Cipolla-Neto, J., and Amaral, F.G., (2019), "Melatonin as a Hormone: New Physiological and Clinical Insights", *Endocrine Reviews*, Vol. 39, No. 6, pp. 990-1028.
- Colombo, G., *et al.*, (2016), "A step-by-step protocol for assaying protein carbonylation in biological samples", *Journal of Chromatography. B., Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, Vol. 2019, pp. 178–190.
- Dallman, M. F.; *et al*, (2004), "Chronic Stress-Induced Effects of Corticosterone on Brain: Direct and Indirect", *Annals of The New York Academy of Sciences*, Vol. 1018, pp. 141-150.
- De La Iglesia, H.O., *et al.*, (2004), "Forced desynchronization of dual circadian oscillators within the rat Suprachiasmatic Nucleus", *Current Biology*, Vol 14, pp. 796-800.
- Dibner, C, *et al.*, (2010), "The Mammalian Circadian Timing System: Organization and Coordination of Central and Peripheral Clocks", *Annual Review of Physiology*, Vol. 72, pp. 517-549.

- Dong, M., *et al.*, (2013), "Maternal obesity, lipotoxicity and cardiovascular diseases in offspring", *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, Vol. 55, 0020pp. 111-116.
- Drapier, D., *et al.*, (2007), "Effects of acute fluoxetine, paroxetine and desipramine on rats tested on the elevated plus-maze", *Behavioural Brain Research*, Vol. 176, pp. 202-209.
- Duque-Guimarães, D. E. and Ozanne, S. E., (2013), "Nutritional programming of insulin resistance: causes and consequences", *Trends in Endocrinology and Metabolism*, Vol. 889, pp. 1-11.
- Ferreira Junior, M.D.F., *et al.*, (2019), "Postnatal early overfeeding induces cardiovascular dysfunction by oxidative stress in adult male Wistar rats", *Life Science*, Vol. 226, pp. 173-184.
- Frangogiannis, N. G., (2019), "Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction", *Molecular Aspects of Medicine*, Vol. 65, pp. 70-99.
- Gachon, F., *et al.*, (2004), "The mammalian circadian timing system: from gene expression to physiology", *Chromosoma*, Vol. 113, pp. 103-112.
- Garcia, L. F., (2015) "Células envolvidas no remodelamento da matriz extracelular após infarto agudo do miocárdio", *Einstein*, Vol. 13, N. 1, pp. 89-95.
- García, A. P., *et al.*, (2010), "Moderate caloric restriction during gestation results in lower arcuate nucleus NPY- and α MSH-neurons and impairs hypothalamic response to fed/fasting conditions in weaned rats", *Diabetes, Obesity and Metabolism*, Vol. 12, p 403-413.
- Gaspar, S., *et al.*, (1998), "Os plantões médicos, o sono e a ritmicidade biológica", *Revista da Associação Médica Brasileira*, Vol. 44, No. 3, pp. 239-45.
- Hsu, C. and Tain, Y., (2020), "Light and Circadian Signaling Pathway in Pregnancy: Programming of Adult Health and Disease", *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 21, N. 2232.
- Ibrahim, J., Berk, B. C. and Hughes, A. D., (2006) "Comparison of Simultaneous Measurements of Blood Pressure by Tail-Cuff and Carotid Arterial Methods in Conscious Spontaneously Hypertensive and Wistar-Kyoto Rats", *Clinical and Experimental Hypertension*, Vol. 28, No. 1, pp. 57-72.
- Jha, P. K.; Challet, E.; Kalsbeek, A., (2019), "Circadian rhythms in glucose and lipid metabolism in nocturnal and diurnal mammals", *Molecular and Cellular Endocrinology*, Vol. 418, N. 1, pp. 74-88.
- Jones, C., *et al.*, (2017), "Fetal programming and eating disorder risk", *Journal of Theoretical Biology*, Vol. 428, pp. 26-33.
- Kubota, Y. and Nishiwaki, K. C., (2006), "Elegans as a model system to study the function of the COG complex in animal development", *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 387, pp. 1031-5.
- Lima, I.L., *et al.*, (2014), "Chronic Sleep Restriction during Pregnancy - Repercussion on Cardiovascular and Renal Functioning of Male Offspring", *PLOS ONE*, Vol. 9, No. 11, pp. 1-7.
- Machado, A. and Haertel, L.M., (2014), "Neuroanatomia funcional", *Editora Atheneu*, São Paulo, SP, 3ed.

- Marques, N. and Menna-Barreto, L. (2003), *Cronobiologia: princípios e aplicações*, 3ed, São Paulo, Ed. USP.
- Mendez, N., *et al.*, (2012), "Timed maternal melatonin treatment reverses circadian disruption of the fetal adrenal clock imposed by exposure to constant light", *PLOS ONE*, Vol. 7, No. 8, pp. 1-16.
- Mendez, N., *et al.*, (2016), "Gestational chronodisruption impairs circadian physiology in rat male offspring, increasing the risk of chronic disease", *Endocrinology*, Vol. 157, No. 12, pp. 4654-4668.
- Misra, H. P., and Fridovich, I., (1972), "The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase", *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 247, pp. 3170–3175.
- Michel, S.; Nakamura, T. J.; Meijer, J. H.; Colwell, C. S., (2021), "Electrophysiological approaches to studying the Suprachiasmatic Nucleus", *Methods in Molecular Biology*, Vol. 2130, pp. 303-324.
- Moura Junior, M. R., (2009), "Avaliação Temporal da Pressão Arterial Sistólica por Pletismografia de Cauda em Ratos Submetidos à Desnutrição Protéica e a Hipertensão de Goldblatt (2R-1C)", Dissertação [Mestrado em Ciências Biológicas] – Universidade Federal de Ouro Preto.
- Ohkawa, H.; Ohishi, N., and Yagi, K., (1979), "Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction", *Analytical Biochemistry*, vol. 95, pp. 351–358.
- Oliveira, I.G.B., *et al.*, (2019), "Forced internal desynchrony induces cardiometabolic alterations in adult rats", *Journal of Endocrinology*, Vol. 242, No. 2, pp. 25-36.
- Pereira, L.C., *et al.*, (2010), "Trabalho noturno: a privação do sono da equipe de enfermagem em uma unidade de pronto atendimento", *Ciência et Praxis*, Vol. 3, No. 6, pp. 19-24.
- Pittendrigh, C.S., (1960), "Circadian Rhythms and the Circadian Organization of Living Systems", *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, Vol. 25, pp. 159-184.
- Ralph, M.R., *et al.*, (1990), "Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period", *Science*, Vol. 247, No. 4945, pp. 975-978.
- Salazar, E.R., *et al.*, (2018), "Gestational chronodisruption leads to persistent changes in the rat fetal and adult adrenal clock and function", *The Journal of Physiology*, Vol. 596, No. 23, pp. 5839-5857.
- Silveira, P.P., *et al.*, (2007), "Developmental origins of health and disease (DOHaD)", *Jornal de Pediatria*, Vol. 83, No. 6, pp. 494-504.
- Sládek, M., *et al.*, (2004), "Insight into molecular core clock mechanism of embryonic and early postnatal rat suprachiasmatic nucleus", *PNAS*, Vol. 101, No. 16, pp. 6231-36.
- Thomal, J.T., *et al.*, (2010), "Sleep restriction during pregnancy: hypertension and renal abnormalities in young offspring rats", *Sleep*, Vol. 33, No. 10, pp. 1357-62.
- Tomotani, B.M. and Oda, G.A., (2012), "Diurnos ou Noturnos? Discutindo padrões temporais de atividade", *Revista da Biologia*, Vol. 9, No. 3, pp. 1-6002E.

- Tsai, C., (2019), "Obesity programmed by prenatal dexamethasone and postnatal high-fat diet leads to distinct alterations in nutrition sensory signals and circadian-clock genes in visceral adipose tissue", *Lipids in Health and Disease*, Vol. 18, No. 19, pp. 1-10.
- Varcoe, T.J., *et al.*, (2011), "Chronic phase shifts of the photoperiod throughout pregnancy programs glucose intolerance and insulin resistance in the rat", *PLOS ONE*, Vol. 6, No. 4, pp. 1-10.
- Varcoe, T.J., *et al.*, (2013), "Characterisation of the maternal response to chronic phase shifts during gestation in the rat: implications for fetal metabolic programming", *PLOS ONE*, Vol. 8, No. 1, pp. 1-13.
- Vilela, M.G., *et al.*, (2007), "Determinação do ciclo estral em ratas por lavado vaginal", *Femina*, Vol. 35, No. 10, pp. 667-670.
- Voiculescu, S.E., *et al.*, (2016), "Behavioral and molecular effects of prenatal continuous light exposure in the adult rat", *Brain Research*, Vol. 1650, pp. 51-59.
- Weaver, D.R., (1998), "The Suprachiasmatic Nucleus: A 25-Year Retrospective", *Journal of Biological Rhythms*, Vol. 13, No. 2, pp. 100-112.
- Westermeier, F., *et al.*, (2014), "Programming of Fetal Insulin Resistance in Pregnancies with Maternal Obesity by ER Stress and Inflammation", *BioMed Research International*, pp. 1-13.
- Whincup, P. H., *et al.*, (2008), "Birth Weight and Risk of Type 2 Diabetes: a systematic review", *American Medical Association*, Vol. 300, No. 24, pp. 2886-2897.