

Fisiologia do sistema de temporização circadiano

Juan José Chiesa

Laboratório de Cronobiologia, Universidad Nacional de Quilmes

Santiago Andrés Plano

Instituto de Investigaciones Biomédicas (BIOMED CONICET), Pontificia Universidade Católica Argentina

John Fontenele Araújo

Laboratório de Neurobiologia e Ritmicidade Biológica, Departamento de Fisiologia e Comportamento, Universidade Federal do Rio Grande do Norte

A rotação da Terra sobre seu eixo, com um período aproximado de 24 horas, impõe uma alternância na exposição da superfície terrestre à radiação solar, o ciclo diário de luz e escuridão (Ciclo Claro-Escuro – CE). Por sua vez, temos também a translação do planeta em uma órbita elíptica de aproximadamente 365 dias ao redor do sol, impondo transições estacionais na duração da parte iluminada do ciclo CE, ou fotoperíodo, os quais se alternam entre os hemisférios norte e sul em decorrência da inclinação do eixo do planeta em relação ao plano de órbita. Os ciclos CE estabeleceram uma forte pressão de seleção sobre os organismos, pois, durante a evolução, foram selecionados aqueles que apresentaram variações periódicas de 24 horas, atualmente chamamos de ritmos circadianos, e sua existência é conhecida em uma grande variedade de espécies, desde unicelulares procariontes até em plantas e animais. A primeira descrição formal de um ritmo foi documentada em 1729, por Jean Jacques De Mairan, que registrou os movimentos das folhas na planta *Mimosa pudica* por um tempo, evidenciando o ritmo de 24 horas nos movimentos de abrir e fechar as folhas sobre

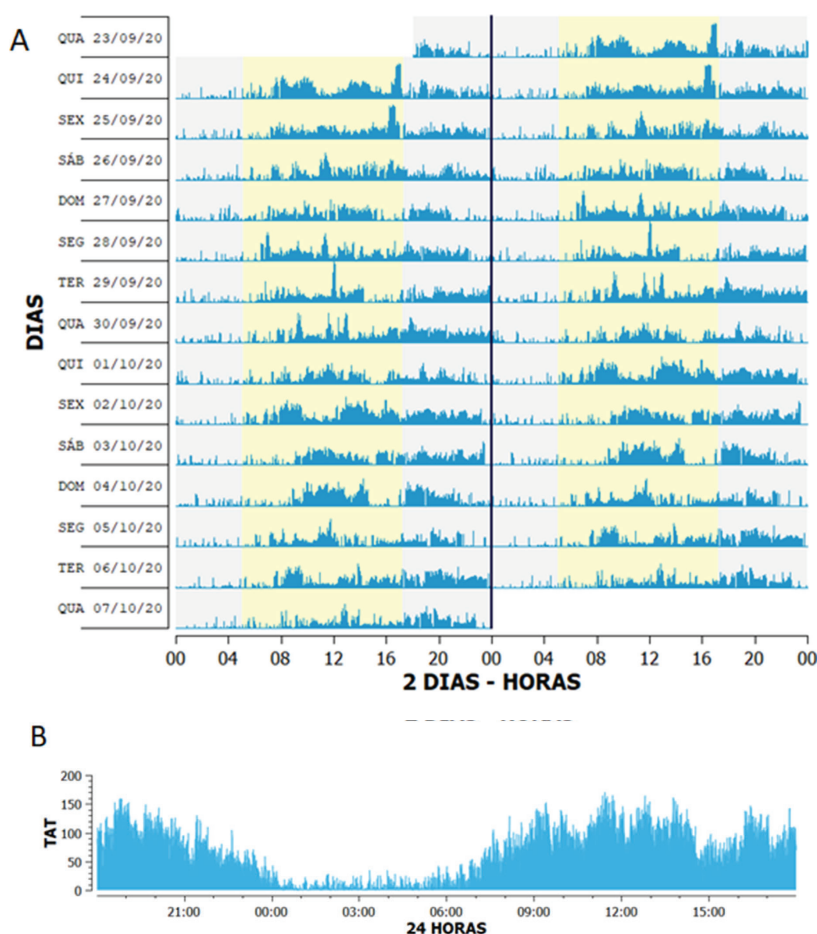
ciclo CE, o qual também se mantinha em condições de escuro constante com a ausência do CE. A hipótese de o ritmo ser endógeno só teve uma evidência experimental no século XX, em que a presença de ritmos no comportamento e na fisiologia foi descrita em todos os táxons biológicos (1). A ocorrência de ritmos espontâneos em situação de ausência de pista temporais, separados de suas influências externas, permitiu hipotetizar a existência de processos biológicos com funções de marcapassos, denominados relógios biológicos. Atualmente, sabemos que essas oscilações diárias são apresentadas em praticamente todos os seres vivos e em todos os níveis de organização, desde o molecular e celular (por exemplo, na atividade dos genes, rotas metabólicas, atividade neuronal elétrica), até o nível fisiológico (por exemplo, ritmos hormonais, cardiovasculares, temperatura central) e comportamental (por exemplo, ritmo de atividade-reposo). O estudo científico de ritmos e os relógios biológicos constituem a Cronobiologia.

Para poder estudar a presença de um ritmo em qualquer variável biológica, devemos obter amostras sucessivas no tempo ou séries temporais ($x_1, x_2, \dots$).

2, ..., x_i, para t₁, t₂, ..., t_i) de dados de uma determinada variável. Uma ferramenta muito útil em estudos cronobiológicos é um gráfico que consta uma matriz com os dados nas seções sucessivas da série temporal (por exemplo, cada 24 horas, o módulo 24 do gráfico), e, nas colunas, o valor da série variável para cada (x_i, t_i) (Figura 1A). Dado

que uma das saídas mais utilizadas para estudar o relógio biológico nos animais é a atividade comportamental, esse gráfico se denomina actograma. Essa representação gráfica, como a média diária ou waveform (Figura 1B), resulta em uma grande utilidade para analisar o padrão diário característico do ritmo e dos protocolos cronobiológicos.

Figura 1. Actograma duplo (A) e forma de onda (B) em módulo 24 do registro da atividade motora por actimetria em humano



Fonte: LNRB-UFRN.

Nas condições em que o ciclo CE tem 12 horas de claro e 12 horas de escuro, os ritmos se manifestam em um período de 24 horas. Para o caso do ritmo de atividade e repouso de um roedor noturno, em condições de laboratório, a atividade comportamental começa no início da fase de escuro e é distribuída durante a escuridão. Ao remover a exposição ao ciclo CE, estabelecendo uma condição

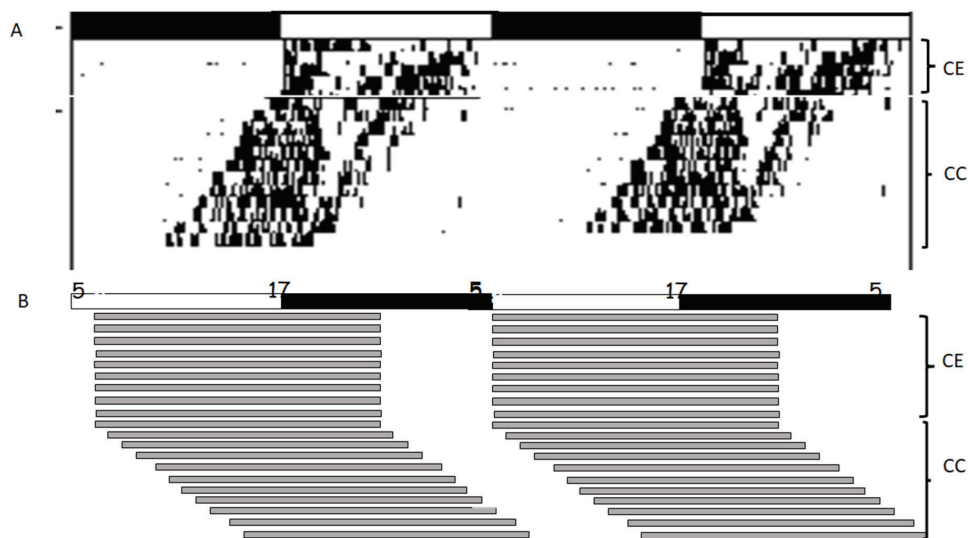
laboratorial com claro ou escuro constante, o padrão rítmico de atividade-repouso se mantém, porém com uma periodicidade diferente de 24 horas. As mudanças no período do ritmo podem ser observadas com clareza comparando os dois actogramas, da Figura 1 e Figura 2. Na Figura 1, os ritmos estão sincronizados pelo ciclo CE, que atua como um

zeitgeber (do alemão *zeit* – tempo – e *geber* – doador) promovendo a periodicidade de 24 horas.

Na situação experimental de isolamento temporal, na ausência do *zeitgeber*, temos um ritmo com um período diferente de 24 horas, chamado de Tau ou τ (período de um ritmo em livre curso (2)). Na

Figura 2 encontramos dois actogramas do ritmo de atividade e repouso em condições de claro constante. Na Figura 2 temos um actograma em que podemos observar, na imagem A, um registro real feito em laboratório do ritmo de atividade e repouso em um sagui e, na imagem B, um desenho esquemático de como seria para o ser humano.

Figura 2. Actograma do ritmo de atividade e repouso em condições de claro e escuro (CE 12/12) e em condições claro constantes (CC)



Fonte: LNRB-UFRN.

Na Figura 2A, temos um actograma do ritmo de atividade e repouso de um sagui (primata). Nos primeiros dias o animal estava em ciclo CE 12/12 e, em seguida, passou a condições de claro constante (CC). Como podemos ver, o sagui manifestou um ritmo com um τ de 23,7 horas, aproximadamente às 24h. Já na Figura 2B, temos um diagrama de como se comportaria o ritmo de atividade e repouso de um ser humano que, em condições de livre curso, apresenta um τ de aproximadamente 24,3 horas, em média. Por isso são denominados ritmos circadianos (do latim *circa* – próximo – e *diem* – dia). Esse é um protocolo básico que permite estudar a periodicidade endógena e a sincronização dos ritmos para o *zeitgeber*. Os estudos sobre os mecanismos desses ritmos foram sistematizados experimentalmente ao longo do século XX, dando origem à Cronobiologia,

disciplina que estuda o controle temporal das funções dos organismos. Dependendo de se tratar de espécies animais diurnas ou noturnas a um nível comportamental, podemos estabelecer tanto exposição à luz (claro constante – CC) ou à escuridão (escuro constante – EC), como também a outras variáveis ambientais que podem influenciar a ritmicidade observada (por exemplo, temperatura, umidade, acesso ao alimento, presença de coespecíficos etc.).

Operativamente, para estudar os ritmos endógenos, usamos o registro de um ritmo biológico, por exemplo, o ritmo de atividade e repouso, como a medida da saída do relógio circadiano. Em laboratório, dividimos o período do ritmo em livre curso por 24, determinando a hora circadiana (HC). Assim, $1 \text{ HC} = \tau / T$. Por convenção, chamamos de hora

zeitgeber (HZ ou ZT – Zeitgeber Time) as condições experimentais com ciclo CE e hora circadiana (HC ou CT – Circadian Time) a condição de ausência de pista temporal. A HZ = 0 é definida como o início da fase de claro; a HC = 0, por sua vez, é definida como o início da fase ativa para animais diurnos e o início do repouso para animais noturnos. Desse modo, podemos generalizar o seguinte:

- a) O dia subjetivo ou biológico define-se como a fase comportamental que corresponderia quando o animal está exposto à luz em condições naturais (por convenção, entre 0 e 12 HC).
- b) A noite subjetiva ou biológica é a fase que corresponde ao mesmo comportamento quando está no escuro em condições naturais (por convenção, entre 12 e 24 HC).

Todavia, isso não se pode generalizar. Por exemplo, na Figura 2 podemos ver que o sagui é uma animal estritamente diurno, sendo ativo exclusivamente na fase de claro. Já para o ser humano, como podemos ver na Figura 1 e Figura 2B, nossa atividade ocorre durante a fase de claro e parte da fase escura. Como este livro é orientado para profissionais de saúde, vamos, na medida do possível, representar exemplos humanos ou de animais diurnos. Caso não seja possível apresentar exemplos reais, iremos apresentar por diagramas explicativos.

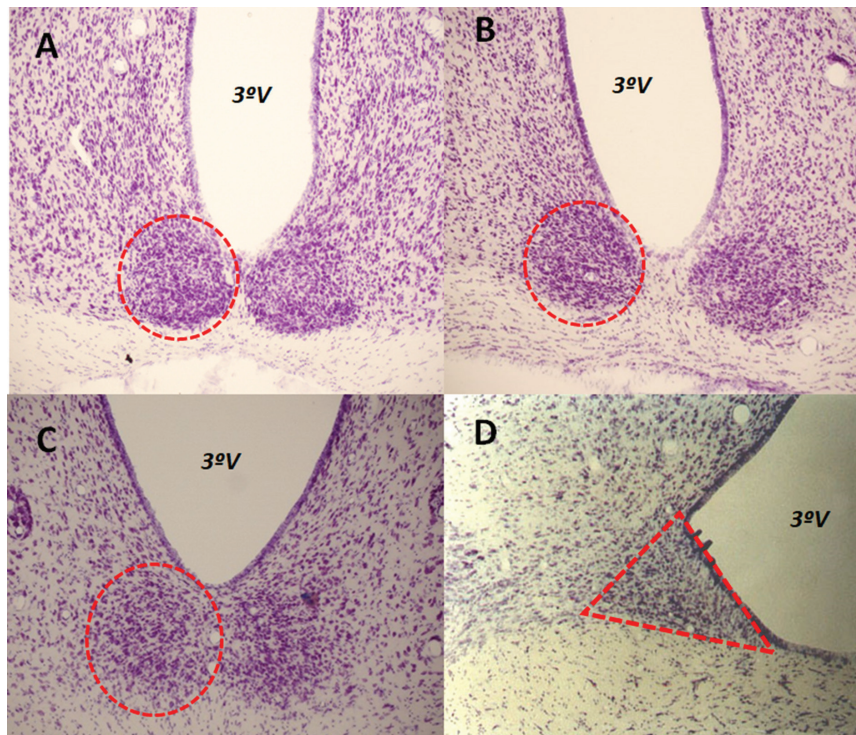
Além da definição do τ , outros parâmetros de oscilação circadiana podem ser verificados, como a fase (Φ), determinada como o momento de ocorrência de um evento característico, e a amplitude (A), como a variação dos valores da variável rítmica em relação ao valor médio. Esses parâmetros podem ser determinados pela técnica de COSINOR.¹ A partir de estudos comparados em espécies distintas, surgiram as características fundamentais dos ritmos circadianos (2,3):

- a) são ubíquos, pois ocorrem em todas as espécies;
- b) são endógenos, autossustentados e permanecem por períodos prolongados de isolamento temporal, por todo o curso da ontogenia;
- c) as espécies distintas têm distribuições de frequências características, observando variabilidade intraespecífica dependente de variantes genéticas na população;
- d) o valor do τ apresenta pouca variação ao longo do tempo, como consequência de um processo de controle por um mecanismo similar a um relógio.

Dado que os ritmos se apresentam no comportamento e na fisiologia dos animais, a pesquisa em busca de um marcapasso no sistema nervoso central foi predominante na Cronobiologia entre 1960 e 1990. A partir de experimentos de lesão em áreas do cérebro, identificou-se um conjunto de neurônios em mamíferos, localizados no hipotálamo e chamados de núcleos supraquiasmáticos (NSQ) (4). Nos primeiros experimentos foi demonstrado que a lesão desses neurônios produzia uma perda na capacidade de expressão do ritmo circadiano. Além disso, em animais lesionados, o transplante de tecido do NSQ restaurava a ritmicidade. Adicionalmente, foi demonstrado que, quando os doadores tinham mutações circadianas ($\tau \approx 20$ hs), a recuperação do ritmo era do fenótipo rítmico do doador (5), confirmando a determinação genética dos ritmos circadianos. Outro ponto interessante é que a morfologia dos NSQ muda de acordo com a espécie; em roedores, por exemplo, apresentam um formato mais circular, enquanto em primatas, um formato triangular (Figura 3).

¹ N.O.: Para mais informações sobre esses parâmetros, ver Capítulo 6.

Figura 3. Microfotografias do hipotálamo mostrando os núcleos supraquiasmáticos de diferentes espécies



Legenda: A – NSQ de camundongo; B – NSQ de rato; C – NSQ de mocó (*Kerodon rupestris*); D – NSQ esquerdo de sagui (*Callithrix jacchus*); 3ºV – terceiro ventrículo. Todas as imagens foram coloridas pela técnica de Nills.

Fonte: Labneuro-UFRN.

Atualmente, sabemos que o sistema circadiano está formado por um marcapasso central nos NSQ, o qual coordena a atividade de osciladores circadianos periféricos presentes em praticamente todos os tecidos.

Em nível celular, os osciladores circadianos são formados por mecanismos moleculares conservados durante a evolução; eles possuem um alto grau de homologia funcional, inclusive ao serem comparados entre diferentes grupos, como insetos e mamíferos (6). Mutações de genes induzidas em laboratório produzem fenótipos circadianos anormais, como períodos extremos ou ausência de uma periodicidade estável – em alguns casos podem chegar até a arritmicidade. Esses genes foram clonados e estudados extensamente em mamíferos, esses estudos fazem com que hoje seja possível conhecermos esse mecanismo central do oscilador circadiano.

Esse mecanismo molecular está baseado em alças de retroalimentação de atividade transcricional – transducional nos genes que hoje são conhecidos como genes-relógio.

Nas alças centrais, o heterodímero formado pelas proteínas *clock circadian regulator* (CLOCK) e *basic helix-loop-helix ARNT like 1* (BMAL1) une-se a elementos promotores dos genes repressores, como *periods* (*Per 1, 2, e 3*) e *cryptochromes* (*Cry 1 e 2*), incrementando sua transcrição. Por sua vez, as proteínas PER e CRY formam heterodímeros que atuam como repressores transcricionais para o CLOCK:BMAL1, finalizando o ciclo com uma periodicidade circadiana.²

2 N.O.: No Capítulo 3 você encontrará mais detalhes sobre os mecanismos moleculares envolvidos no controle da ritmicidade circadiana.

O padrão rítmico circadiano apresenta um fenótipo característico para cada espécie (6). Esses caracteres genéticos dependem de um conjunto de polimorfismos herdáveis evolutivamente neutros. No caso do humano, os caracteres poligênicos determinam a maior tendência à matutuidade ou vespertinidade. Esses fenótipos, denominados cronotipos, são diferenciados pela presença de alelos do gene *period* (7). Outras variantes alélicas de *period*, *cryptochrome*, *casein kinase 1 epsilon*, foram associadas a distúrbio familiar da fase avançada do sono (ver Capítulo 5).

2.1 Efeitos do ciclo CE sobre o oscilador circadiano

Como mencionamos, os relógios biológicos ajustam seu período endógeno ao período diário de 24 horas por meio de estímulos que atuam como sincronizadores, ou *zeitgebers*, sendo o ciclo claro e escuro (CE) um dos principais. Existem modelos funcionais construídos com base em evidência experimental que pretendem explicar o fenômeno de sincronização com o *zeitgeber*. Um deles é o *modelo paramétrico*, segundo o qual a quantidade total de luz (intensidade e duração) presente no ciclo CE exerce um efeito contínuo sobre o marcapasso circadiano, modificando sua velocidade de oscilação – o período (2). O outro é o *modelo não paramétrico*, estudado originalmente por Colin Pittendrigh (1976), com a hipótese de que as transições fóticas que se apresentam nos crepúsculos do ciclo dia e noite é que são essenciais para sincronizar o relógio. Experimentalmente, foram aplicados em organismos, mantidos em escuro constante, breves pulsos de luz (de duração que variam de minutos a horas) simulando os crepúsculos naturais. Observou-se que esses pulsos produziam um efeito discreto modificando a fase do ritmo circadiano nos dias subsequentes. Posteriormente, Pittendrigh observou que o efeito do pulso sobre a fase depende da hora circadiana em que é administrado. Dessa maneira, um pulso de luz

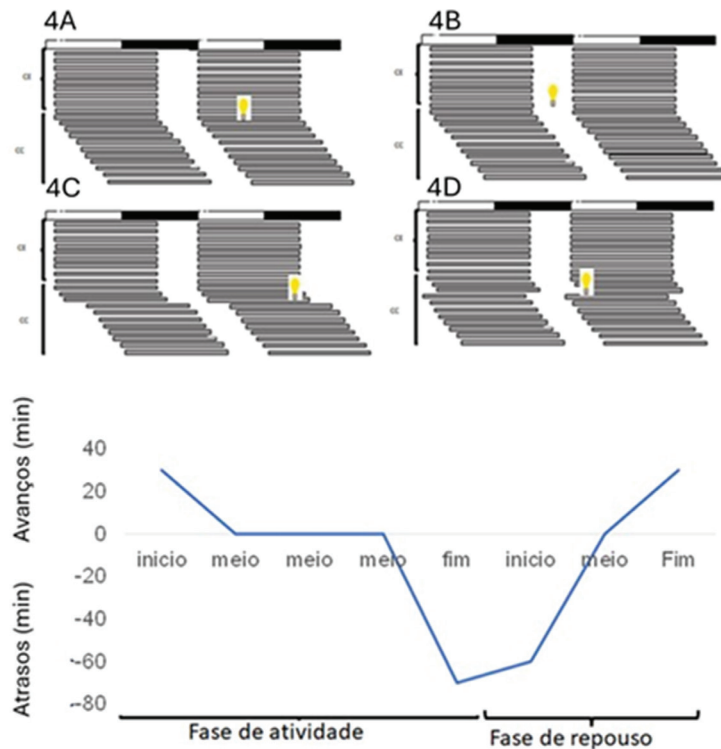
administrado em um animal em escuro constante durante o dia subjetivo (momento de repouso dos organismos noturnos ou de atividade em animais diurnos) não causou nenhuma interferência sobre a ritmicidade circadiana; porém, os pulsos administrados durante a noite subjetiva (momento de atividades noturnas ou repouso diurnos) tiveram alguns efeitos. Um pulso administrado durante o começo da noite subjetiva (fim da fase de atividade para o ser humano – Figura 4C) provoca um atraso no início da atividade no dia seguinte. Por outro lado, os pulsos de luz administrados durante o final da noite subjetiva (fim da fase de repouso para o ser humano – Figura 4D) induziram um avanço no início da atividade nos dias seguintes. Quando um pulso de luz é aplicado no meio do dia ou noite subjetivos, não há alterações na fase circadiana. Para nós, humanos, fica mais claro quando fazemos a seguinte explicação: quando somos submetidos à luz no início da manhã, é provocado um avanço de fase dos nossos ritmos circadianos, por exemplo, tendemos a dormir e acordar mais cedo. Já quando somos expostos à luz à noite, há um atraso que faz com que as pessoas passem a sentir sono e acordar mais tarde. Já a exposição à luz ao meio-dia não provoca um efeito evidente na fase da ritmicidade circadiana (Figura 4).

Esses efeitos dependem da hora circadiana sobre a fase do marcapasso circadiano. Construímos um gráfico (Figura 4) que chamamos de *curva de resposta dependente da fase* (CRF). No eixo y colocamos a magnitude (tamanho do tempo) e o sentido – avanço (+) ou atraso (-) – das mudanças de fase geradas em função da hora circadiana de administração do estímulo (eixo x). Para exemplificar um caso humano, colocamos com marcadores o início, meio e fim da fase de atividade ou de repouso. Na Figura 4, uma CRF foi construída de forma didática. Primeiro, determina-se as fases do ritmo no livre-curso previamente ao estímulo, determinando o

início e fim da fase de atividade. Depois, aplica-se um pulso de luz em diferentes momentos, em especial no início e fim da fase (Figura 4D e 4C respectivamente). Por último, é calculada a diferença entre o início da atividade pré e pós-estímulo ($\Delta\Phi = \Phi_{\text{pré}} - \Phi_{\text{pós}}$), obtendo-se, assim, a mudança da fase. Desse modo,

se $\Delta\Phi > 0$, tem-se um avanço de fase; caso contrário, se $\Delta\Phi < 0$, ocorre um atraso; por fim, se $\Delta\Phi \cong 0$, não ocorre mudança ao aplicar o estímulo, o que define a *zona morta da CRF* (Figura 4B). Não há resposta quando se aplica o estímulo luminoso no meio da fase de atividade (Figura 4A)..

Figura 4. Esquema representativo de uma CRF para o ser humano



Fonte: LNRB-UFRN.

A curva de resposta dependente de fase é uma propriedade intrínseca do sistema circadiano de cada espécie, e, para o caso das curvas de resposta de fase à luz, é dependente da intensidade fótica do pulso administrado (8,9). Em geral, para estímulos comparáveis, observa-se que a amplitude máxima da curva, determinada pela mudança da fase obtida, é maior em invertebrados do que em vertebrados, sendo menor em primatas e humanos. Algumas espécies apresentam uma ampliação da zona de avanços com uma grande amplitude, outras espécies apresentam maior amplitude na zona de atrasos. Isso mostra que existem diferentes estratégias para sincronizar a ritmicidade circadiana ao nicho temporal

de cada espécie. Há um consenso que diz que a curva de resposta de fase à luz específica do humano é similar à apresentada na Figura 4 (10).

Em condições naturais, a ritmicidade biológica não manifesta sua oscilação espontânea, pois ela apresenta uma relação dinâmica temporal com o ambiente geofísico. Essa é uma resposta ativa, visto que, em geral, o ajuste não é imediato quando se impõe um *zeitgeber*, o qual pode sugerir a ocorrência de mudanças no estado funcional do marcapasso. Como mostra a curva de resposta de fases, os relógios biológicos são osciladores autossustentados que respondem de maneira específica ao ciclo ambiental de acordo com as diversas fases do próprio ritmo

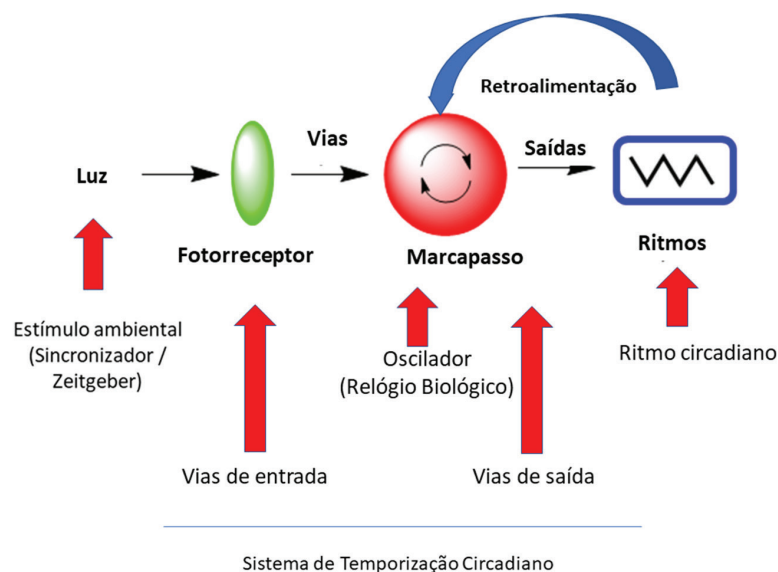
endógeno. Dado que o marcapasso pode responder com avanços ou atrasos de fase, o processo de sincronização entre o sistema circadiano e um *zeitgeber* ambiental se denominou em português como *arrastamento* (11). Isso significa que o mecanismo de sincronização apresenta vários graus de liberdade, portanto, os organismos apresentam um grau de flexibilidade no ajuste temporal com o ambiente. As curvas de resposta de fase têm um valor preditivo, pois depende da amplitude do estímulo gerando um padrão característico e permite estabelecer o máximo de mudança de fase que pode ser obtida. Então, assumindo que o relógio mantenha um período endógeno, τ , constante e que se sincroniza usando as transições luminosas do ciclo CE, o grau de *arrastamento* pode se estimar como $T = \tau \pm \Delta\phi$ máximo (8). Além disso, o ajuste do relógio circadiano ao ciclo CE se baseia em igualar a 0 a diferença ($\tau - T$). Se $\tau > T$, essa diferença será maior que 0, e requer avanços de fase para que $\tau = T$ (*arrastamento* por avanços diários do relógio); se $\tau < T$, o *arrastamento* ocorre por atrasos. O processo de *arrastamento* permite ajustar ou adequar o sistema circadiano com o dia terrestre, o qual apresenta uma certa variação anual,

e isso proporciona aos organismos um mecanismo para reconhecer a hora local e gerar uma referência temporal interna. Por isso, os mecanismos de marcapasso circadiano são chamados de relógio biológico. Para o ser humano, temos diferentes fenótipos em relação à fase da atividade e isso está relacionado com a presença de fenótipos extremos de τ , que denominamos *cronotipos* (12).

2.2 O sistema circadiano

Na seção anterior, descrevemos o processo de *arrastamento* para os estímulos fóticos do ciclo CE, o qual modifica a atividade do relógio circadiano central, ajustando ao período e aos ritmos de saída no período T do *zeitgeber*. Desse modo, o sistema circadiano inclui quatro componentes básicos: um *sistema fotorreceptor* com vias aferentes que comunica a estimulação luminosa ao *relógio biológico* ou *marcapassos centrais* localizados nos NSQ do hipotálamo, o qual traduz e codifica a informação circadiana do *zeitgeber* e se projeta para as *eferências neuroendócrinas* controlando os *ritmos fisiológicos e comportamentais de saída* e *osciladores periféricos* (Figura 5).

Figura 5. Esquema do sistema circadiano



Fonte: LNRB-UFRN.

2.2.1 Fotorreceptores e vias aferentes ao relógio circadiano

Os estímulos fóticos do ciclo CE são percebidos pelo sistema circadiano por meio de um sistema fotorreceptor de *detecção de irradiação*. Em vertebrados existem células fotorreceptoras especializadas e localizadas em lugares distintos do cérebro, as quais respondem diretamente à luz, penetrando e atravessando o crânio (13). As células fotorreceptoras relacionadas à detecção do CE é um subconjunto pequeno (2 a 5% do total) de grupos fotossensíveis da retina (células ganglionares intrinsecamente fotossensíveis, CGifR) (14). Essas células expressam melanopsina, um fotopigmento específico da família das opsinas (15) que respondem com maior intensidade à luz “azul” no espectro (480 nm). As células ganglionares enviam seus axônios pelo trato retino-hipotalâmico (TRH) do nervo óptico conduzindo essa informação fótica tanto para a região ventral do NSQ, como também para outras regiões do cérebro (16). Mediante a liberação de glutamato e de neuromoduladores como a substância P (o peptídeo ativador de adenilato ciclase hipofisária), ativam-se diferentes cascatas de transdução que regulam o sinal fótico nos neurônios do NSQ. Assim, há efeitos diretos sobre a atividade dos genes-relógio do mecanismo molecular do relógio circadiano (17).

2.2.2 Vias fóticas de informação não visual para regiões extra NSQ

As eferências das células ganglionares que contém melanopsina não se projetam apenas para os NSQ. Recentemente foi estudado a interação entre as vias fotorreceptoras não visuais que projetam as CGifR para outras regiões do cérebro, regulando, assim, processos como o sono, o estado de humor e a aprendizagem (16). Além de se projetarem para o NSQ, regulando o *arrastamento* fótico, as CGifR têm padrões de projeções estendidos para outras regiões do cérebro – como a amígdala medial (AM)

e a habênula lateral (HabL) – e para o hipotálamo subparaventricular (hSPV). Essas regiões regulam os comportamentos diretamente dependentes da luz, como o sono, a depressão, a ansiedade e o aprendizado. Em seguida, as regiões que recebem projeções das CGifR, como a HabL, o hSPV, o hipotálamo lateral (hL) e a área pré-óptica ventrolateral hipotalâmica, também recebem eferências dos NSQ, o qual pode atuar como um meio de informação fótica do ciclo CE para essas regiões. Atualmente, já sabemos que tanto a HabL quanto a AM são verdadeiros osciladores circadianos extra-hipotalâmicos que recebem informação fótica diretamente das CGifR. Regiões envolvidas na regulação do humor, como a área tegmental ventral e a rafe, ou com processos cognitivos, como a hL, podem ser reguladas pela luz, indiretamente por eferências dos NSQ, ou em paralelo através da AM e da HabL. Projeções das CGifR fazem com que o NSQ regule os efeitos da luz sobre a aprendizagem (18). Por outro lado, a regulação fótica do humor requer um circuito independente do NSQ, que conecta o CGifR com o núcleo perihabenular do tálamo. Recentemente, foi demonstrado que outras projeções das CGifR para a área hipotalâmica pré-óptica, especificamente na subpopulação neuroendócrina do hormônio liberador da corticotrofina, inervam regiões promotoras da vigília, processando os efeitos agudos da luz sobre o sono (18,19).

2.2.3 Vias não fóticas para o relógio circadiano

Estímulos ambientais não fóticos e cíclicos podem funcionar como geradores de *arrastamento* ao nível do relógio central, tais como a variação diária da temperatura, a disponibilidade cíclica de alimento, o exercício físico voluntário ou induzido, os sinais de comunicação social e as interações interespecíficas (20). Esses estímulos foram determinados de maneira coletiva como *estímulos não estritos*, ou

estímulos não dependentes da luz. Por exemplo, o exercício físico, realizado em momentos diferentes do ritmo circadiano, é capaz de gerar atrasos e avanços de fases e com isso podemos construir uma curvatura de resposta dependente de fase para nós, humanos (21). Um pulso de escuro durante a fase de claro do ciclo CE, ou a privação de sono, são capazes de induzir um *arrastamento* do marcapasso central (22). Como esses estímulos são de natureza diversa, consideramos que essas informações em conjunto estão relacionadas com processos de manutenção do nosso estado de atenção e de alerta. Essas informações múltiplas são integradas ao nível do tálamo, no folheto intergeniculado lateral, que envia aferências ao NSQ pelo trato genículo-hipotalâmico, com o neuropeptídeo Y e o ácido gama aminobutírico (GABA) como neurotransmissores. Já as eferências do tronco cerebral para o NSQ são do núcleo mediano da rafe, cujo neurotransmissor é a serotonina (22,23). Usando essas vias, essas informações não fóticas são *capazes* de interagir com a informação luminosa do ciclo CE (24).

2.2.4 Os núcleos supraquiasmáticos

O controle do *arrastamento* fótico dos ritmos é realizado pelos núcleos supraquiasmáticos (NSQ), duas estruturas localizados na base do hipotálamo, nas partes dorsais ao tecido caudal do quiasma óptico e ventrolaterais ao terceiro ventrículo. Cada núcleo está constituído por cerca de 10.000 a 20.000 células, com um terço das células da glia, e um volume total de 0,068 mm³ (24,25). Uma característica principal dos NSQ é sua compartimentalização em regiões: uma ventrolateral, com a presença do peptídeo vaso intestinal ativo (VIP) e do peptídeo liberador de gastrina (GRP), e uma região dorsomedial e rostral, que apresenta uma alta densidade de arginina vasopressina (AVP) e GABA. Os neurônios ventrolaterais não apresentam ritmos de atividade elétrica e expressão de genes circadianos, mas recebem inervação direta da retina e respondem à luz incrementando

a expressão de genes reguladores, como cFos, além dos genes- relógio *per1* e *per2*, liberando VIP, GABA e GRP, e se projetam para a região dorsomedial. Os neurônios dorsomediais representam o oscilador molecular sendo intrinsecamente rítmico, apresentando um ritmo endógeno de atividade elétrica (26) e gerando um ritmo na liberação de neurotransmissores em suas eferências (27). A região dorsomedial responde aos neurotransmissores fóticos liberados da região retinorrecipiente, acoplando o processo de *arrastamento* à saída do marcapasso (28). Por meio da comunicação sináptica local, usando VIP, GRP (29,30), GABA (30,31,32,33), ou por sinapse elétrica mediante *gap junctions*, as subpopulações de osciladores neuronais nessa região acoplam sua atividade celular a nível elétrico e molecular, gerando uma saída circadiana coerente.

2.2.5 Vias eferentes dos NSQ

As projeções eferentes do NSQ são bastante semelhantes entre os mamíferos, implicando um controle automático e neuroendócrino conservado dos ritmos. Existem diversas áreas do cérebro, como os núcleos paraventriculares do hipotálamo (NPV) e outras áreas no hipotálamo, que são relevantes para informações sensoriais (34). A via mais importante é a que controla as secreções homônimas: 1) liberando o hormônio estimulador da corticotrofina, que estimula a adeno-hipófise a liberar o hormônio adrenocorticotrófico por meio da sinapse de neurônios neuroendócrinos no NPV; 2) comunicando com interneurônios, por exemplo, do núcleo pré-óptico medial, dos núcleos hipotalâmico dorsomedial e SPV; 3) estimulando projeções autonômicas do NPV intervindo em circuitos de controle do sistema nervoso autônomo que regula o meio interno; e 4) regulando sua própria atividade por retroalimentação (27). As eferências do núcleo paraventricular participam do controle circadiano das funções simpáticas e parassimpáticas controlando os centros autônomos medulares e do tronco encefálico.

2.2.6 Circuito gânglio cervical superior – glândula pineal

O gânglio cervical superior (GCS) é o primeiro da cadeia de gânglios paravertebrais, situado entre a artéria carótida interna e a veia jugular interna, na posição anterior no músculo da cabeça. É um par ganglionar e cada gânglio tem um volume aproximado de 0,5 mm³ com cerca de 13.000 a 45.000 neurônios (35,36,37). Os GCS inervam várias estruturas, dentre elas a hipófise, eminência média, o corpo carotídeo, a tireoide e paratireoides, a íris, o músculo de Müller e a glândula pineal (37,38,39). A pineal recebe uma projeção do GCS cujo neurotransmissor é noradrenalina, embora se tenham descrito outros neurotransmissores como o neuropeptídeo Y (37,39,40,41,42).

Como mencionamos, um dos principais alvos do GCS é a glândula pineal, promovendo a liberação de melatonina sob o controle restrito do NSQ. Várias áreas do hipotálamo, tais como o núcleo pré-óptico medial, o dorsomedial e o paraventricular (NPV), recebem sinais sincronizadores do NSQ, modulando circadianamente suas funções. Nesse sentido, o NSQ exerce um controle sobre as eferências do NPV, modulando circadianamente a maioria das

funções do sistema nervoso autônomo, incluindo a via simpática, cujos neurônios pré-ganglionares estão localizados na coluna intermédio-lateral da medula espinhal, e cujos axônios se projetam para os neurônios pós-ganglionares dos GCS. Assim, ao passar por sua ação sobre o circuito NPV-GCS, o NSQ controla ritmicamente a liberação de noradrenalina, fazendo a glândula pineal produzir e liberar a melatonina durante a noite.

A liberação de noradrenalina promove a atividade da enzima arilalquilamina N - acetiltransferase (AA-NAT) e a produção consequente de melatonina (43). Existem outras fontes de melatonina (como a retina) e outros estímulos para sua produção (como a liberação de catecolaminas depende do estresse), esse sistema de sinalização (NSQ – NPV – GCS – glândula pineal) é responsável por gerar e manter o ritmo circadiano de melatonina circulante. Em ratos, por exemplo, é responsável por aumentar umas 150 vezes a produção de AA-NAT durante à noite, promovendo um aumento de 10 vezes na síntese e liberação noturna de melatonina (44,45,46). Atualmente, usamos a dosagem do ritmo de melatonina como um dos indicadores de fase do sistema de temporização circadiano em humanos.

Referências

1. Dunlap JC. Molecular bases for circadian clocks. *Cell*. 1999 Jan 22;96(2):271-90.
2. Aschoff J. Freerunning and Entrained Circadian Rhythms. *Biological Rhythms*. 1981;81-93.
3. Pittendrigh CS. Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1960;25:159-84.
4. Moore RY, Eichler VB. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res*. 1972 Jul 13;42(1):201-6.
5. Ralph MR, Lehman MN. Transplantation: a new tool in the analysis of the mammalian hypothalamic circadian pacemaker [Internet]. Vol. 14, *Trends in Neurosciences*. 1991. p. 362-6. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/0166-2236\(91\)90164-p](http://dx.doi.org/10.1016/0166-2236(91)90164-p)
6. Vitaterna MH, Shimomura K, Jiang P. Genetics of Circadian Rhythms. *Neurol Clin* [Internet]. 2019 Aug [cited 2023 Mar 23];37(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31256785/>
7. Gentry NW, Ashbrook LH, Fu YH, Ptáček LJ. Human circadian variations. *J Clin Invest* [Internet]. 2021 Aug 16;131(16). Available from: <http://dx.doi.org/10.1172/JCI148282>

8. Daan S, Pittendrigh CS. A Functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. *J Comp Physiol.* 1976 Oct;106(3):253-66.
9. Johnson CH. Forty years of PRCs – what have we learned? *Chronobiol Int.* 1999 Nov;16(6):711-43.
10. St Hilaire MA, Gooley JJ, Khalsa SBS, Kronauer RE, Czeisler CA, Lockley SW. Human phase response curve to a 1 h pulse of bright white light. *J Physiol.* 2012 Jul 1;590(13):3035-45.
11. Pittendrigh CS, Daan S. A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. *J Comp Physiol.* 1976 Oct;106(3):291-331.
12. Roenneberg T, Pilz LK, Zerbini G, Winnebeck EC. Chronotype and Social Jet lag: A (Self-) Critical Review. *Biology.* 2019 Jul 12;8(3):54.
13. Menaker M. Circadian rhythms. Circadian photoreception. *Science.* 2003 Jan 10;299(5604):213-4.
14. Berson DM, Dunn FA, Takao M. Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science.* 2002 Feb 8;295(5557):1070-3.
15. Panda S, Sato TK, Castrucci AM, Rollag MD, DeGrip WJ, Hogenesch JB, et al. Melanopsin (Opn4) requirement for normal light-induced circadian phase shifting. *Science.* 2002 Dec 13;298(5601):2213-6.
16. LeGates TA, Fernandez DC, Hattar S. Light as a central modulator of circadian rhythms, sleep and affect. *Nat Rev Neurosci.* 2014 Jul;15(7):443-54.
17. Hegazi S, Lowden C, Rios Garcia J, Cheng AH, Obrietan K, Levine JD, et al. A Symphony of Signals: Intercellular and Intracellular Signaling Mechanisms Underlying Circadian Timekeeping in Mice and Flies. *Int J Mol Sci [Internet].* 2019 May 13;20(9). Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20092363>
18. Fernandez DC, Fogerson PM, Lazzerini Osprei L, Thomsen MB, Layne RM, Severin D, et al. Light Affects Mood and Learning through Distinct Retina-Brain Pathways. *Cell.* 2018 Sep 20;175(1):71-84.e18.
19. Zhang Z, Beier C, Weil T, Hattar S. The retinal ipRG-C-preoptic circuit mediates the acute effect of light on sleep. *Nat Commun.* 2021 Aug 25;12(1):5115.
20. Wams EJ, Riede SJ, Hut RA. Mechanisms of Non-photic Entrainment. *Biological Timekeeping: Clocks, Rhythms and Behaviour.* 2017;395-404.
21. Youngstedt SD, Elliott JA, Kripke DF. Human circadian phase-response curves for exercise. *J Physiol.* 2019 Apr;597(8):2253-68.
22. Antle MC, Tse F, Koke SJ, Sterniczuk R, Hagel K. Non-photic phase shifting of the circadian clock: role of the extracellular signal-responsive kinases I/II/mitogen-activated protein kinase pathway. *Eur J Neurosci.* 2008 Dec;28(12):2511-8.
23. Yannielli P, Harrington ME. Let there be “more” light: enhancement of light actions on the circadian system through non-photic pathways. *Prog Neurobiol.* 2004 Sep;74(1):59-76.
24. Smith VM, Hagel K, Antle MC. Serotonergic potentiation of photic phase shifts: examination of receptor contributions and early biochemical/molecular events. *Neuroscience.* 2010 Jan 13;165(1):16-27.
25. Moore RY. Organization and function of a central nervous system circadian oscillator: the suprachiasmatic hypothalamic nucleus. *Fed Proc [Internet].* 1983 Aug [cited 2023 Mar 23];42(11). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6135628/>
26. Colwell CS. Linking neural activity and molecular oscillations in the SCN. *Nat Rev Neurosci [Internet].* 2011 Sep 2 [cited 2023 Mar 23];12(10). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21886186/>
27. Buijs RM, Kalsbeek A. Hypothalamic integration of central and peripheral clocks. *Nat Rev Neurosci [Internet].* 2001 Jul [cited 2023 Mar 23];2(7). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11433377/>
28. Antle MC, Silver R. Orchestrating time: Arrangements of the brain circadian clock. *Trends Neurosci [Internet].* 2005 Mar [cited 2023 Mar 23];28(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15749168/>
29. Maywood ES, Reddy AB, Wong GK, O'Neill JS, O'Brien JA, McMahon DG, et al. Synchronization and maintenance of timekeeping in suprachiasmatic circadian clock cells by neuropeptidergic signaling. *Curr Biol [Internet].* 2006 Mar 21 [cited 2023 Mar 23];16(6). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16546085/>
30. Maywood ES, O'Neill JS, Chesham JE, Hastings MH. Minireview: The circadian clockwork of the suprachiasmatic nuclei – analysis of a cellular oscillator that drives endocrine rhythms. *Endocrinology [Internet].* 2007 Dec [cited 2023 Mar 23];148(12). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17901233/>

31. Liu C, Reppert SM. GABA synchronizes clock cells within the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron* [Internet]. 2000 Jan [cited 2023 Mar 23];25(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10707977/>
32. Michel S, Colwell CS. Cellular communication and coupling within the suprachiasmatic nucleus. *Chronobiol Int*. 2001 Jul;18(4):579-600.
33. Vosko AM, Schroeder A, Loh DH, Colwell CS. Vasoactive intestinal peptide and the mammalian circadian system. *Gen Comp Endocrinol* [Internet]. 2007 Jun [cited 2023 Mar 23];152(2-3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17572414/>
34. Buijs R, Salgado R, Sabath E, Escobar C. Peripheral circadian oscillators: time and food. *Prog Mol Biol Transl Sci* [Internet]. 2013 [cited 2023 Mar 23];119. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23899595/>
35. Smolen AJ, Wright LL, Cunningham TJ. Neuron numbers in the superior cervical sympathetic ganglion of the rat: a critical comparison of methods for cell counting. *J Neurocytol* [Internet]. 1983 Oct [cited 2023 Mar 23];12(5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6644354/>
36. Ribeiro AA, Davis C, Gabella G. Estimate of size and total number of neurons in superior cervical ganglion of rat, capybara and horse. *Anat Embryol* [Internet]. 2004 Aug [cited 2023 Mar 23];208(5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15235907/>
37. Cardinali DP, Romeo HE. The autonomic nervous system of the cervical region as a channel of neuroendocrine communication. *Front Neuroendocrinol*. 1991;12:278-97.
38. Cavallotti C, Frati A, Sagnelli P, Pescosolido N. Re-evaluation and quantification of the different sources of nerve fibres supplying the rat eye. *J Anat* [Internet]. 2005 Mar [cited 2023 Mar 23];206(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15733292/>
39. Cassaglia PA, Griffiths RI, Walker AM. Sympathetic nerve activity in the superior cervical ganglia increases in response to imposed increases in arterial pressure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* [Internet]. 2008 Apr [cited 2023 Mar 23];294(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18216142/>
40. Reuss S, Moore RY. Neuropeptide Y-containing neurons in the rat superior cervical ganglion: Projections to the pineal gland. *J Pineal Res* [Internet]. 1989 [cited 2023 Mar 23];6(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2732890/>
41. Zigmond RE. Neuropeptide action in sympathetic ganglia. Evidence for distinct functions in intact and axotomized ganglia. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 2000 [cited 2023 Mar 23];921. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11193812/>
42. Møller M, Baeres FM. The anatomy and innervation of the mammalian pineal gland. *Cell Tissue Res* [Internet]. 2002 Jul [cited 2023 Mar 23];309(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12111544/>
43. Klein DC. Arylalkylamine N-acetyltransferase: "the Timezyme." *J Biol Chem* [Internet]. 2007 Feb 16 [cited 2023 Mar 23];282(7). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17164235/>
44. Borjigin J, Wang MM, Snyder SH. Diurnal variation in mRNA encoding serotonin N-acetyltransferase in pineal gland. *Nature* [Internet]. 1995 Dec [cited 2023 Mar 23];378(6559). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8524412/>
45. Roseboom PH, Coon SL, Baler R, McCune SK, Weller JL, Klein DC. Melatonin synthesis: Analysis of the more than 150-fold nocturnal increase in serotonin N-acetyltransferase messenger ribonucleic acid in the rat pineal gland. *Endocrinology* [Internet]. 1996 Jul [cited 2023 Mar 23];137(7). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8770929/>
46. Perreau-Lenz S, Kalsbeek A, Van Der Vliet J, Pévet P, Buijs RM. In vivo evidence for a controlled offset of melatonin synthesis at dawn by the suprachiasmatic nucleus in the rat. *Neuroscience* [Internet]. 2005 [cited 2023 Mar 23];130(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15590161/>