

# Thèse de Doctorat

André de Sà Braga Oliveira

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du  
grade de Docteur de l'Université de Nantes  
sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans*

École doctorale : **ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTÉ**

Discipline : *Biologie, Médecine, Santé*

**Effets de la gestation et de la malnutrition périnatale sur les rythmes circadiens**  
**Efeitos da gestação e da desnutrição perinatal sobre os ritmos circadianos**

## JURY

Rapporteurs : **John Fontenele Araujo, Professeur, Universidade Rio Grande do Norte, Brasil**  
**Latifa Abdennebi-Najar Latifa, Professeure, Institut Polytechnique de LaSalle Beauvais, France**

Examineurs : **Khadija Ouguerram, Professeure, Université de Nantes**  
**Elizabeth Nascimento, Professeure, Universidade de Pernambuco**

Directeur de Thèse : **Raul Manhaes de Castro, Professeur, Universidade de Pernambuco**

Co-directeur de Thèse : **Bertand Kaeffer, Chargé Recherche Inra, UMR-1280, Nantes**

Membre Invité : **Francisco Bolanos-Jimenez, Chargé Recherche Inra, UMR-1280, Nantes**

**André de Sá Braga Oliveira**

**Efeitos da gestação e da desnutrição perinatal sobre os ritmos circadianos**  
**Effets de la gestation et de la malnutrition périnatale sur les rythmes circadiens**

Tese apresentada a Université de Nantes (UN)/França em cotutela com a ao Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), para obtenção do título de Doutor em Neurociências pela UFPE e Doutor em Biologie et Santé pela UN.

Thèse présentée à l'Université de Nantes (UN) / France en cotutelle avec le programme d'études supérieures en neuropsychiatrie et sciences du comportement, Université fédérale de Pernambuco (UFPE), pour obtenir le doctorat en neurosciences titre UFPE et un doctorat en Biologie et Santé par l'UN.

Orientador Brasileiro: Pr Dr. Raul Manhães de Castro

Co-orientador: Pra Dra Elizabeth do Nascimento

Orientador Francês: Dr. Bertrand Kaeffer

Co-orientador francês: Dr. Francisco Bolaños Jiménez

Recife

2015

FICHA CATALOGRÁFICA  
UNIVERSITÉ DE NANTES  
UFR SCIENCES ET TECHNIQUES

---

ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTÉ

Année 2015

N° attribué par la bibliothèque

| | | | | | | | | |

**Effets de la gestation et de la malnutrition périnatale sur les rythmes circadiens**

**Efeitos da gestação e da desnutrição perinatal sobre os ritmos circadianos**

---

THÈSE DE DOCTORAT  
Discipline: Biologie, Médecine et Santé  
Spécialité: Biochimie, Biologie cellulaire et moléculaire, Physiologie et Nutrition

*Présentée  
et soutenue publiquement par*

**André DE SÁ BRAGA OLIVEIRA**

*Le 29 octobre 2015, devant le jury ci-dessous:*

Président Désignation en séance

Rapporteurs Pr. . **John Fontenele Araujo**, Professeur de l'Université Fédéral de Rio Grande do Norte, Brasil  
Pra. **Latifa Abdennebi-Najar**, Professeur de l'Institut Polytechnique LaSalle Beauvais, France

Examineurs Pra. **Elizabeth do Nascimento**, Professeur de l'Université Fédérale de Pernambuco  
Pra. **Khadija Ouguerram**, Professeur de l'Université de Nantes

**Directeurs de thèse :**

Pr Raul **Manhães De Castro**, Professeur de l'Université Fédérale de Pernambuco

Dr Bertrand **Kaeffer**, Institut National de Recherche Agronomique, UMR-1280

**André de Sá Braga Oliveira**

**Efeitos da gestação e da desnutrição perinatal sobre os ritmos circadianos**

Tese aprovada em \_\_\_\_\_ de outubro de 2015

---

Profa Dra. Elizabeth do Nascimento, Universidade Federal de Pernambuco

---

Dr Bertrand KAEFFER, Institut National de la Recherche Agronomique

---

Prof Dr. John Fontenele Araujo, Universidade Federal do Rio Grande do Norte

---

Profa. Dra. Latifa Abdennebi-Najar, Institut Polytechnique LaSalle Beauvais

---

Profa. Dra. Khadija Ouguerram, Universidade de Nantes

Recife

2015

## AOS MEUS PAIS

*É na educação dos filhos que se revelam as virtudes dos pais. Essa é mais uma conquista dedicada a vocês, que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade. Para isso, não bastaria um obrigado. A vocês, que iluminaram os caminhos obscuros com afeto e dedicação para que os trilhássemos sem medo e cheios de esperanças, não bastaria um muito obrigado. A vocês, que se doaram inteiros e renunciaram aos seus sonhos, para que, muitas vezes, pudesse realizar os meus. Pela longa espera e compreensão durante minhas viagens, não bastaria um muitíssimo obrigado. A vocês, pais por natureza, por opção e amor, não bastaria dizer, que não tenho palavras para agradecer tudo isso. Mas é o que me acontece agora, quando procuro arduamente uma forma verbal de exprimir uma emoção ímpar. Uma emoção que jamais seria traduzida por palavras. Amo vocês!*

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

### **RAUL MANHÃES DE CASTRO**

*Obrigado por ter acreditado no meu potencial e ter oferecido a oportunidade de ir à França. Obrigado por sempre estar presente e se preocupar com os detalhes científicos e psicológicos envolvidos nesta caminhada. O senhor tem importância fundamental no sucesso deste doutorado. Obrigado!*

### **SANDRA LOPES DE SOUZA**

*Ainda me lembro em meados de 2008, uma pessoa muito especial que me deu uma oportunidade de ser um estudante, um professor e um pesquisador melhor. Após quase sete anos de convívio (mas não somente agora), vejo que o resultado desse esforço merece minha eterna gratidão. Você compartilhou seus conhecimentos, transformou meus ideais em realizações. Estarei seguindo seus ensinamentos para sempre! Obrigado!*

### **RENATA CAMPINA E PAULA MARTIMIANO**

*Vocês foram fundamentais nesta jornada, principalmente no período fora do país! O convívio gera discordâncias, mas sempre estivemos atentos e preocupados uns com os outros para que tudo desse certo! Agradeço pela paciência e reconheço a grande solidariedade que vocês tiveram comigo na construção desta tese!*

## AGRADECIMENTOS

**Ao meu irmão, Henrique,** que me ajudou, mesmo distante, a ter forças para a construção deste trabalho.

**Às minhas avós, Zilda e Nida,** exemplos de dignidade e honestidade. Dedico grande parte desse trabalho a elas.

**Aos meus amigos mais próximos e aos amigos que fiz no mestrado,** procurarei não citar nomes, mas saibam que todos foram essenciais para que estes 4 anos do doutorado passassem da melhor maneira. Obrigado a todos!

**À Professora Elizabeth do Nascimento,** que me acolheu cientificamente no meu retorno ao Brasil principalmente. Obrigado pelos conhecimentos passados ao longo desse período, pela sua seriedade e responsabilidade com a pesquisa científica, e por sempre estar à disposição quando mais precisei.

**Ao Professor John Fontenele,** que me recebeu tão bem em uma visita científica em Natal e que tirou muitas dúvidas sobre os ritmos circadianos desde que voltei da França. Agradeço por aceitar o convite para participar desta banca de tese. Tenho certeza que sua contribuição será excelente para o nosso trabalho!

**À Edeones França,** pelo cuidado com os ratos para o estudo durante as experiências no Brasil.

**Aos professores, estagiários, mestrandos e doutorandos do grupo de pesquisa Nutrição, Atividade Física e Plasticidade e do antigo NNI,** obrigado pela ajuda, pela inspiração, pela preocupação. Tive várias contribuições, de diferentes formas.

**À Natália,** muito obrigado pela excelente contribuição na minha tese e na de Paula durante os experimentos no Brasil. Você foi fundamental para a viabilidade dessa fase da pesquisa.

**Aos colegas da turma de doutorado,** obrigado pela companhia durante as aulas.

**Às secretárias e à chefia da Pós-graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento,** muito obrigado pela ajuda em todos os trâmites administrativos. Mesmo em situações de emergência, vocês foram muito competentes!

**Aos colegas professores de Anatomia da UFPE**, obrigado pelo apoio, paciência e solidariedade nos momentos em que precisei me afastar para alguma atividade no doutorado ou fora dele, durante o período que fui professor do departamento. Obrigado também pela contribuição científica e acadêmica na Anatomia!

**Ao CNPq/CAPES/Ciências sem fronteiras** pela concessão da bolsa de doutorado no exterior e financiamento de parte dos experimentos no Brasil

Enfim, obrigado **a Deus** por mais esta etapa vencida e, principalmente, por colocar todos vocês em minha vida.

*« Non...Rien de rien...  
Non...Je ne regrette rien...  
Ni le bien, qu'on m'a fait  
Ni le mal, tout ça m'est bien égal !»*

Edith Piaf



## Remerciements

**Mon directeur de thèse, Dr Bertrand Kaeffer**, vous avez été une personne très importante au cours des dernières années. Je n'ai pas des doutes que sans vous, nous n'aurions pas cette thèse. Merci pour ton merveilleux accueil en France. Je suis très heureux d'avoir connu ta famille et toi. J'espère que nous continuons à collaborer dans les prochaines années.

**Dr. Francisco Bolaños-Jiménez**, je vous remercie pour tous les enseignements, pour la patience et la compréhension avant, au cours et après de mon séjour en France.

**Profa. Dra. Latifa Abdennebi-Najar et Profa. Dra. Khadija Ouguerram**, merci pour avoir accepté l'invitation pour être membres de ce jury de thèse. Je suis sûr que vous allez donner une excellente contribution pour notre travail.

**Dominique Darmaun**, merci beaucoup pour m'avoir reçu dans votre laboratoire de recherche.

**Omar**, merci! Tu m'as aidé beaucoup au début de mon séjour à Nantes.

**Gina**, c'était un grand plaisir de travailler avec toi. Merci pour m'aider au cours de mes expériences!

**Aurélie, Aurore, Fanny, Axel, Camille, Jacob, Laure, Omar, Morganne, Caroline, Angèle**, merci pour vos compagnies au labo. Mon séjour à Nantes a été certainement très agréables à cause de vous

**Blandine et Guillaume!** Merci pour votre amitié au labo. Vous avez fait mon travail au labo plus amusant

**Armelle et Evelyne**, merci beaucoup pour toutes les aides avec les démarches administratives.

**Agnès, Anthony, Christian, Isabelle Grit, Jean-Pierre, Patricia, Pierre, Gwenola, Clair-Yves, Thomas, Valérie**, merci pour l'accueil au labo. À toutes et tous du labo, merci pour les pauses-café et pour les enseignements du français. Merci!

Le CAPES-COFECUB merci pour la concession de la bourse en France.

*« Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena  
Acreditar no sonho que se tem  
Ou que seus planos nunca vão dar certo  
Ou que você nunca vai ser alguém  
Tem gente que machuca os outros  
Tem gente que não sabe amar  
Mas eu sei que um dia a gente aprende  
Se você quiser alguém em quem confiar  
Confie em si mesmo  
Quem acredita sempre alcança... »*

Legião Urbana

# Lista de Ilustrações / Liste des Figures

## Résumé en français

- Figure 1** – Les rythmes circadiens de la prolifération des cellules dans les larves de poisson zèbre.....34
- Figure 2** – Suppression de la mélatonine par la lumière.....36
- Figure 3** – Le mécanisme de base de l'horloge circadienne dans le noyau suprachiasmatique et les tissus périphériques.....37
- Figure 4.** De part sa capacité à synchroniser son activité en réponse à un signal, tel une transition lumineuse ou une prise de nourriture, qui agissent comme des signaux "entrant" ; l'horloge circadienne coordonne les activités métaboliques d'un individu en contrôlant l'expression cyclique d'un grand nombre de gènes, qui forment des signaux "sortant". Des altérations dans le rythme des gènes horloge sont associées à l'apparition du syndrome métabolique. Les résultats de nos laboratoires présentés dans la figure en bas à droite montrent que la restriction protéique périnatale modifie le profil d'expression circadien du neuropeptide Y, un gène impliqué dans la régulation de la prise alimentaire et du métabolisme.....56
- Figure 5.** Prévalence du Syndrome Métabolique dans les pays développés et en développement.....67

## Méthodes

**Figure 1. Conception expérimentale (Expériences 1 - E1 and 2 – E2).** C1, C2 = *Control mothers* (n=6 et 10, respectivement) d'expériences 1 et 2; C1E = *Control embryos* (n=6); LP1, LP2 = *Low-Protein mothers* (n=6 et 10, respectivement); LP1E = *Low-Protein embryos*; C1-AG = *Control mothers After Gestation* (23 jours après le sevrage, n=6), C1P-AG = *Control pups After Gestation* (rats de 35 jours, n=6); LP1-AG = *Low-Protein mothers After Gestation* (23 jours après le sevrage, n=6); LP1P-AG = *Low-Protein pups After Gestation* (rats de 35 jours, n=6). NP2 = *Non-pregnant rats* (C - n =10; LP - n = 10); C2-AG = *Control mothers After Gestation* (23 jours après le sevrage , n=10); LP2 – AG = *Low-Protein mothers After Gestation* (23 jours après le sevrage , n=10). Boîtes noires = jour de l'analyse moléculaire ou de la consommation/glycémie circadienne.....81

## **Revisão Bibliográfica**

- Figura 1** - Os ritmos circadianos de proliferação celular em larvas do peixe-zebra.....107
- Figura 2** - Supressão da melatonina pela luz.....109
- Figura 3** – Mecanismo molecular central do relógio circadiano no núcleo supraquiasmático e tecidos periféricos.....110
- Figura 4** - Através da habilidade em sincronizar sua atividade em resposta à um estímulo, como à luz e ao alimento, que agem como sinais de “entrada”, e para controlar o padrão de expressão cíclica de um grande número de genes, como sinais de “saída”, o relógio circadiano é localizado no centro do sistema de adaptação da entrada de energia para as necessidades metabólicas do indivíduo. Alterações na ritmicidade do relógio são associadas ao desenvolvimento da síndrome metabólica. Nossos resultados, apresentados no canto inferior direito da figura mostra que a desnutrição perinatal altera o perfil circadiano de expressão do Neuropeptídeo Y, um gene envolvido no controle da ingestão alimentar e do metabolismo (Adaptado de Bass e Takahashi, Science 330:1349-54, 2010 et de Orozco-Solis et al., 2010).....128
- Figura 5** - Prevalência da Síndrome Metabólica em países desenvolvidos e em desenvolvimento.....138

## **Artigo / Article**

**Figure 1. Experimental design of work (Experiments 1 - E1 and 2 – E2).** C1, C2 = Control mothers (n=6 and 10, respectively) of experiments 1 and 2; C1E = Control embryos (n=6); LP1, LP2 = Low-Protein mothers (n=6 and 10, respectively); LP1E = Low-Protein embryos; C1-AG = Control mothers After Gestation (23 days post weaning, n=6), C1P-AG = Control pups After Gestation (35-old-day pups, n=6); LP1-AG = Low-Protein mothers After Gestation (23 days post weaning, n=6); LP1P-AG = Low-Protein pups After Gestation (35-old-day pups, n=6). NP2 = Non-pregnant rats (C - n =10; LP - n = 10); C2-AG = Control mothers After Gestation (23 days post weaning , n=10); LP2 – AG = Low-Protein mothers After Gestation (23 days post weaning , n=10). Black boxes = day of molecular or circadian food intake/glycemic analysis.....175

**Figure 2. Re-induction by a serum shock of *bmal1*, *per1* and *per2* in cultured fibroblasts for control groups (mothers at Day-17 of gestation and Day-65 post-fecundation; embryos at Day-17, rat pups at Day-35 of life).** Daily expression profile of *Bmal 1* (A),

Per1 (B) and Per2 (C) transcripts in fibroblast culture of control mothers on day 17 of gestation (closed circles) and the same mothers after 65 days of the beginning of gestation (i.e., 23 days after weaning - open circles). Daily expression profile of Bmal 1 (D), Per1 (E) and Per2 (F) genes in fibroblasts culture of control embryos on day 17 of gestation (closed circles – C1<sub>E</sub> group) and control 35-day-old pups (open circles – C1<sub>P</sub> group). Values illustrate the relative abundance of each transcript in relation to those of the endogenous b-2-microglobulin amplified within the same sample and under the same experimental conditions. \*P<0.05; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001 (two-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test). Each point corresponds to the mean±s.e.m. expression levels of four–six pups born to at least three different dams.....176

**Figure 3. Daily percentages of food intake of Non-Pregnant and Pregnant rats (Day-17 of gestation and Day-65 post fecundation).** A single difference was observed on dark cycle of food intake, at ZT8 during 3 consecutive days of observations. Data (g/100 g body weight) are expressed in mean ± SE. \*p<0.05 NP2 vs LP2, by Two-way RM ANOVA followed by Bonferroni test. NP2 = non-pregnant rats; LP2 = low-protein mothers at day 17 of gestation; LP2-AG = low-protein mothers after 65 days of the beginning of gestation (23 days after weaning). Dams (n = 10) fed low-protein diet during perinatal period.....177

**Figure 4. Evolution of total blood glucose over 24 hours of Control rats sampled before (NP2), during (C2) and after gestation (C2-AG).** Rats fed on control diet. Data are expressed as mean ± SE. \* p<0.05; \*\*\* p<0.001 – NP2 x C2; ### p<0.001 – NP2 x C2-AG; <sup>δ</sup> p<0.05 – C2 x C2-AG. By two-way RM ANOVA followed by post-hoc of Bonferroni test.....178

**Figure 5. Evolution of total blood glucose over 24 hours of Low Protein rats sampled before (NP2), during (LP2) and after gestation (LP2-AG).** Rats fed on low-protein diet. Data are expressed as mean ± SE. \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001 – NP2 x LP2; ## p<0.01; ### – p<0.001 - LP2 x LP2-AG. By two-way ANOVA followed by post-hoc of Bonferroni test.....179

**Figure 6. Re-induction by a serum shock of bmal1, per1 and per2 in cultured fibroblasts of Low Protein mothers and their embryos at Day-17 of gestation in comparison with corresponding controls.** Daily expression profiles of bmal 1 (A), per1 (B) and per2 (C) transcripts in fibroblasts of control embryos at Day-17 of gestation (closed circles – C1<sub>E</sub> group) and their control mothers at Day-17 of gestation (open circles – C1 group). Daily expression profile of bmal 1 (D), per1 (E) and per2 (F) genes in fibroblasts of Low-Protein

embryos at Day-17 of gestation (closed circles – LP1<sub>E</sub> group) and of corresponding mothers sampled in parallel (open circles – LP1 group). Values illustrate the relative abundance of each transcript in relation to those of the endogenous b-2-microglobulin amplified within the same sample and under the same experimental conditions. \*P<0.05; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001 (two-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test). Each point corresponds to the mean±s.e.m. expression levels of four–six pups born to at least three different dams.....180

**Figure 7. Re-induction by a serum shock of bmal1, per1 and per2 in cultured fibroblasts of 35-day old pups and their mother.** Daily expression profile of bmal 1 (A), per1 (B) and per2 (C) genes in fibroblasts culture of control 35-day-old pups (closed circles – C1P group) and their mothers almost at the same temporal point (open circles – C1-AG group). Daily expression profile of bmal 1 (D), per1 (E) and per2 (F) genes in fibroblasts culture of low-protein 35-day-old pups (closed circles – LP1<sub>P</sub> group) and their mothers sampled at Day-65 after fecundation (open circles – LP1-AG group). Values illustrate the relative abundance of each transcript in relation to those of the endogenous b-2-microglobulin amplified within the same sample and under the same experimental conditions. \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001 (two-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test). Each point corresponds to the mean±s.e.m. expression levels of four–six pups born to at least three different dams.....181

**Figure 8. Re-induction by a serum shock of bmal1, per1 and per2 in cultured fibroblasts of Low Protein and Control mothers at day 17 of gestation.** Daily expression profile of bmal 1 (A), per1 (B) and per2 (C) transcripts in fibroblasts culture of Low-Protein (open circles – LP1 group) and control (closed circles – C1 group) mothers at Day 17 of gestation. Daily expression profile of bmal 1 (D), per1 (E) and per2 (F) transcripts in fibroblasts culture of low-protein (open circles – LP1<sub>E</sub> group) and control (closed circles – C1<sub>E</sub> group) embryos at Day 17 of gestation. Values illustrate the relative abundance of each transcript in relation to those of the endogenous b-2-microglobulin amplified within the same sample and under the same experimental conditions. \*P<0.05; \*\*\*P<0.001 (two-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test). Each point corresponds to the mean±s.e.m. expression levels of four–six rats.....182

**Figure 9. Re-induction by a serum shock of bmal1, per1 and per2 in cultured fibroblasts of Low Protein and Control mothers at Day-65 after fecundation and of Low Protein and Control 35-day-old rat pups.** Daily expression profile of bmal 1 (A), per1 (B) and per2 (C) genes in fibroblasts culture of Low Protein (open circles – LP1-AG group) and Control mothers ( closed circles – C1-AG group) at Day-65 after fecundation (or 23 days after weaning). Daily expression profile of bmal 1 (D), per1 (E) and per2 (F) genes in fibroblasts culture of Low-Protein 35-day-old pups (open circles – LP1<sub>P</sub> group) and corresponding controls (closed circles – C1<sub>P</sub> group). Values illustrate the relative abundance of each transcript in relation to those of the endogenous b-2-microglobulin amplified within the same sample and under the same experimental conditions. \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001 (two-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test). Each point corresponds to the mean±s.e.m. expression levels of four–six rats.....183

**Supplementary figures**

**Figure S1. Daily percentages of food intake of dams 23 days post-weaning.** No differences were observed on the dark or light phase of food intake during 3 consecutive days of observations made every 4 hours. Data (g/100 g body weight) are expressed in mean  $\pm$  SE. Two-way RM ANOVA followed by Bonferroni test.; \*NP2 = non-pregnant rats; C2 = control mothers at day 17 of gestation; C2-AG = control mothers after 65 days of the beginning of gestation (23 days after weaning). Dams (n = 10) fed control diet during perinatal period.....184

# Lista de Tabelas / Liste des Tableaux

## Résumé en français

**Tableau 1.** Critères permettant de définir le Syndrome Métabolique selon diverses organisations.....64

**Tableau 2.** Compositions des régimes à faible teneur en protéines (low protein) et témoins..76

## Méthodes

**Tableau 1.** Composition des diètes à faible teneur protéique ou témoin.....79

## Revisão bibliográfica

**Tabela 1.** Critérios para definições da Síndrome Metabólica de acordo com diversas organizações.....136

**Tabela 2.** Diversas composições usadas nas dietas *low protein* com suas respectivas dietas controles.....147

## Métodos

**Tabela 1.** Ingredientes das dietas Controle e Protein-restricted.....151

## Artigo / Article

**Table 1 - Effects of maternal low-protein diet in different perinatal periods on nutritional parameters of dams.** Data are from Experiment 1 with n = 6 for each group). C1 - control mothers until the 17<sup>th</sup> day of gestation, LP1 – low-protein mothers until the 17<sup>th</sup> day of gestation, C1-AG - control mothers until the 65<sup>th</sup> day after the beginning of gestation, LP1 – low-protein mothers until the 65<sup>th</sup> day after the beginning of gestation. Data expressed in mean ± SEM \* p<0.05 CTRL versus LP using t test of Student.....168

## Lista de abreviações e siglas / Liste des abréviations et sigles

ABRÉVIATI ONS	INGLÊS	PORTUGUÊS	FRANCÊS
AACE	American Association of Clinical Endocrinologists	Associação Americana dos endocrinologistas clínicos	Association américaine des endocrinologues cliniques
AGRP		Proteína relacionada ao agouti	protéine apparentée à agouti
ARC	Arcuate nucleus	Núcleo arqueado	Noyau arqué
AVP		vasopressina	Vasopressine
Bmal1	Brain and Muscle Arnt-like protein 1		
BNs	Bolwig's nerves	Nervos de Bolwig	Nerfs de Bolwig
BOs	Bolwig's organs	Órgãos de Bolwig	Organes de Bolwig
CFTT		Ciclo de feedback transcrição/translação	Cycle Feedback Transcription/Translation
CART		Transcrito ligado à cocaína e anfetamina	Transcripte lié à La cocaïne et amphétamine
CLOCK	Circadian Locomotor Output Cycles Kaput control		
C, CTRL		Controle	Contrôle
CRY		Criptocromo	Cryptochrome
DCNT		Doenças crônicas não-transmissíveis	
DM		Diabetes Mellitus	Diabète
DMH	Dorsomedial hypothalamus	Hipotálamo dorsomedial	l'hypothalamus dorsomédial
DOHaD	Developmental origins of health and disease	Origem desenvolvimentista da saúde e da doença	Origines développementales de la santé et de maladie
EUA			États-Unis
FID			Fédération Internationale du diabète
GI		Gaстрintestinal	
HPA		hipotalâmico-pituitário-adrenal	Hypothamo-hipophyso-



IDF	International Diabetes Federation		surrénalien
IMC		Índice de Massa Corpórea	Indice de masse corporelle
LP	Low protein		
LTP	long-term potentiation	Potenciação à longo prazo	Potentialisation à long terme
MNT			Maladies chroniques non transmissibles
NCEP ATP III	National Cholesterol Education Programme Adult Treatment Panel III		
NSC			Noyaux Suprachiasmatic Neuropeptide Y
NPY		Neuropeptídeo Y	
NSQ		Núcleo supraquiasmático	
OMS		Organização mundial de saúde	Organisation mondiale de la santé
PAR	Predictive adaptive response		Réponse adaptative prédictive
PC		Peso corporal	Poids corporelle
PEPCK		Fosfoenolpiruvato carboxiquinase	Phosphoénolpyruvate carboxykinase
POMC		Pró-opiomelanocortina	proopiomélanocortine
PVN	Paraventricular nucleus	Núcleo paraventricular	noyau paraventriculaire
SCN	Suprachiasmatic nucleus		
TG		Tolerância à glicose	Tolerance au glucose
TSH		Hormônio tireoestimulante	hormone stimulant de la thyroïde
vSPZ	Ventral subparaventricular zone		
WHO	World Health Organization		

---

## RESUMO

Indivíduos que são expostos a uma deficiência nutricional durante o desenvolvimento perinatal tem, uma vez atingida a idade adulta, um aumento do risco de desenvolvimento de obesidade, diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares, quando comparado a indivíduos da mesma idade com nutrição balanceada. Aqui nós exploramos se a restrição proteica perinatal age na capacidade de sincronização de fibroblastos de ratas e suas respectivas proles. Dietas com baixo teor de proteínas (8 g%) e normoprotéica (20 g%) foram ofertadas a ratas durante a gestação e lactação. O ritmo circadiano de consumo alimentar e glicemia dos animais controles e desnutridos durante a gestação e lactação de mães desnutridas e controles foi registrado. A cultura de fibroblastos proveniente da cauda dessas ratas e suas respectivas proles foram submetidas a um choque sérico para reinduzir as oscilações dos transcritos *bmal1*, *per1* e *per2*. A expressão gênica relativa desses transcritos foi analisada por PCRq. A curva dos níveis de glicose sanguínea total das mães desnutridas durante a gestação foi significativamente menor do que o período antes da gestação, sem apresentar, porém, alterações do ritmo de consumo alimentar. Os fibroblastos das mães desnutridas exibiram diferenças significativas nos níveis de expressão de *bmal1* no ZT6 e ZT18 em relação aos controles. Em contrapartida, os fibroblastos dos embriões desnutridos foram afetados pela desnutrição proteica durante o período perinatal para o *per1* no ZT0 e ZT24 e para o *per2* no ZT24. Além disso, foi visto que as proles não possuíam os mesmos ritmos de expressão gênica desses transcritos em relação a suas mães, tanto durante o período embrionário como também após 14 dias do desmame, exceto para o gene *per2*, que apresentou oscilações semelhantes entre os embriões e suas respectivas mães. Nossos resultados mostram que estas respostas perinatais e pós-natais refletem a plasticidade do desenvolvimento e as "decisões" feitas pela prole para otimizar o seu próprio desenvolvimento, mas com consequências duradouras

**Palavras-chave:** Gestação. Desnutrição proteica. Fibroblastos

## RÉSUMÉ

Les individus qui sont exposés à une carence nutritionnelle pendant le développement périnatal, présentent à l'âge adulte, un risque plus élevé de développer de l'obésité, un diabète de type 2 et des maladies cardiovasculaires par rapport aux personnes du même âge avec une alimentation équilibrée. Ici, nous étudions si une restriction protéique périnatale agit sur la capacité de synchronisation des fibroblastes de rates et sur leur descendance. Les régimes à faible teneur en protéines (8 g%) et à teneur normale (20 g%) ont été offerts à des rats femelles pendant la grossesse et l'allaitement. Le rythme circadien de la prise alimentaire et de la glycémie des animaux témoins et en restriction protéique pendant la grossesse et la lactation malnutrition des mères correspondantes ont été enregistrés. Des fibroblastes, provenant de l'extrémité caudale de ces rates et de leur progéniture ont été établis en culture primaire et soumis à un choc de sérum pour ré-induire les oscillations de la transcription de *bmal1*, *per1* et *per2*. L'expression génique relative de ces transcrits a été analysée par Réaction en Chaîne par Polymérase quantitative (sigle anglais qPCR). La courbe des taux du glucose sanguin total des mères en restriction protéique pendant la grossesse était significativement inférieur à celui d'avant la grossesse, sans montrer, cependant, des altérations dans le rythme de la prise alimentaire. Les fibroblastes de mères en restriction protéique ont montré des différences significatives dans les niveaux d'expression de *bmal1* à 6 après synchronisation (Zeitgeber Time6 ; ZT6) et à ZT18 par rapport aux témoins. En revanche, les fibroblastes des embryons en restriction protéique montraient des différences significatives pour la *per1* à ZT0 et ZT24 et pour *per2*. Il a été également constaté que les fibroblastes de la progéniture n'avaient pas les mêmes rythmes de l'expression des gènes de ces transcriptions par rapport à leurs mères, à la fois pendant la période embryonnaire ainsi que après 14 jours de sevrage, sauf pour le gène de *per2*, qui présentait des oscillations similaires entre les embryons et de leurs mères. Nos résultats montrent que ces réponses périnatales et postnatales reflètent la plasticité du développement et des «décisions» des descendants de première génération afin d'optimiser leur propre développement, et ce, avec des conséquences durables.

Mots-clé : Gestation. Dénutrition. Fibroblastes

## **ABSTRACT**

Individuals exposed to a nutritional deficiency during perinatal development have, once they reach adulthood, a higher risk of developing obesity, type 2 diabetes and cardiovascular

disease compared with individuals of the same age fed on a balanced nutrition. Here, we have explored whether protein restriction during the perinatal period acts on the capacity of synchronization of *in vitro* propagated fibroblasts sampled in dyads. Low Protein (8 g% of protein) or Isocaloric (18 g% protein) diets were offered during gestation and lactation. Circadian food intake and glycemia during pregnancy and lactation of Low-Protein and Control mothers were registered. High density cultures of fibroblasts from dyads [mother (Day-17 Gestation; Day-65 after fecundation) and first generation offspring (Day-17 embryo and D-35 young adult) were submitted to a serum shock to re-induce oscillations of *bmal1*, *per1*, and *per2* transcripts. Relative expression of transcripts were assayed by quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR). The curves of total blood glucose levels of Low Protein mothers during pregnancy were significantly lower than those before pregnancy with independent alterations in the rhythm of food consumption. Fibroblasts from Low Protein mothers exhibited significant differences in the expression levels of *bmal1* at ZT 6 and ZT 18 in relation to those of controls. In contrast, fibroblasts of Low Protein embryos were affected by protein restriction during early life for *per1* gene at ZT 0 and ZT 24 and for *per 2* at ZT 24. Moreover, it was observed that offspring didn't have the same gene expression rhythms than their respective mothers both during embryonic life as for 14 days after weaning, except for *Per2* gene, which presented similar oscillations between embryos and their respective mothers. Our results revealed that responses to perinatal and posnatal environment reflect the plasticity of development and the "decisions" made by the first generation offspring optimizing early development with lasting consequences.

Key words: Pregnancy. Protein malnutrition. Fibroblasts

## Sumário / Index

1	Présentation expérimentale.....	25
2	Revue bibliographique.....	29
2. 1	L'horloge circadien - Historique.....	29
2. 2	L'équilibre circadien.....	30
2. 2. 1	Les Zeitgebers (« les synchroniseurs »).....	30
2. 2. 2	Etudes expérimentales.....	32
2. 2. 3	Rôle de la mélatonine.....	35
2. 3	Rythmes circadiens chez les adultes.....	36
2. 4	Rythmes circadiens chez le foetus.....	41
2. 5	Ontogénie du système circadien central et périphérique chez le foetus...42	
2. 6	Contrôle des rythmes fœtaux par les signaux circadiens maternels.....45	
2. 7	Le système circadien maternel durant la gestation.....46	
2. 8	Le système circadien durant la lactation.....48	
2.9	Rythmes circadiens et métabolisme énergétique.....50	
2.9.1	Rythmes circadiens et métabolisme du glucose.....51	
2.9.2	Influence de l'alimentation sur la régulation circadienne du métabolisme.....55	
2.9.3	Malnutrition et rythmes circadiens.....61	
2.10	Syndrome métabolique.....63	
2.10.1	Concepts.....63	
2.10.2	Panorama épidémiologique des pays développés et en développement.....66	
2.10.3	Obésité.....67	
2.10.4	Preuves épidémiologiques.....69	
2.10.5	Preuves et modèles expérimentaux de la DOHAD.....71	

3	Objectifs.....	77
3.1	Objectif Général:.....	77
3.2	Objectifs Spécifiques:.....	77
4	Méthodes.....	78
4.1	Comité d'éthique.....	78
4.2	Animaux et diètes.....	78
4.3	Organisation expérimentale.....	80
4.4	Analyse PCR durant le développement périnatal des rats contrôles et dénutris.....	80
4.5	Consommation alimentaire et glycémie durant le développement périnatal des rats contrôles et dénutris.....	82
4.6	Mesures de la consommation alimentaire.....	82
4.7	Mesures de la glycémie.....	83
4.8	Culture cellulaire.....	83
4.9	Analyse quantitative par RT-PCR.....	84
4.10	Analyse statistique.....	85
5	Discussion Générale.....	87
6	Considérations finales.....	94
6.1	Perspectives.....	96
1	Apresentação.....	98
2	Revisão Bibliográfica.....	102
2.1	O relógio circadiano - Histórico.....	102
2.2	O balanço circadiano.....	103
2.2.1	Os <i>Zeitgebers</i> (« sincronizadores »).....	103
2.2.2	Estudos experimentais.....	104
2.2.3	Papel da melatonina.....	107
2.3	Ritmos circadianos em adultos.....	109
2.4	Ritmos circadianos em fetos.....	113

2.5 Ontogenia do sistema circadiano central e periférico em fetos.....	114
2.6 Controle dos ritmos fetais através dos sinais circadianos maternos.....	117
2.7 O sistema circadiano materno durante a gestação.....	118
2.8 O Sistema circadiano durante a lactação.....	119
2.9 Ritmos circadianos e metabolismo energético.....	121
2.9.1 Ritmos circadianos e metabolismo da glicose.....	123
2.9.2 Influência da alimentação na regulação circadiana do metabolismo .....	126
2.9.3 Má-nutrição e os ritmos circadianos.....	132
2.10 Síndrome Metabólica.....	133
2.10.1 Conceitos.....	133
2.10.2 Epidemiologia: panorama em países desenvolvidos e em desenvolvimento.....	136
2.10.3 Obesidade.....	138
2.10.4 Evidências epidemiológicas.....	139
2.10.5 Evidências e Modelos Experimentais na DOHaD.....	141
3 Objetivos.....	148
3.1 Geral.....	148
3.2 Específicos.....	148
4 Métodos.....	149
4.1 Comitê de Ética.....	149
4.2 Animais e dietas.....	149
4.3 Desenho experimental.....	150
4.4 Análise de PCR durante o desenvolvimento perinatal de ratos controle e desnutridos.....	151
4.5 Consumo alimentar e glicemia durante o desenvolvimento perinatal de ratas controles e desnutridas.....	152
4.6 Mensuração do consumo alimentar.....	152
4.7 Mensuração da glicemia.....	153

4.8 Cultura celular.....	153
4.9 Análise do RT-PCR quantitativo.....	154
4.10 Análise estatística.....	155
5. Resultados.....	157
5.1 Artigo - Effect of perinatal protein restriction on the inducibility of bmal1, per1 and per2 transcripts in fibroblast primary cultures established from mothers and first generation offspring.....	157
5.2 Article figures and subtitles.....	174
5.3 Article References.....	183
6 Discussão geral.....	190
7 Considerações Finais.....	196
7.1 Perspectivas.....	198
8 REFERÊNCIAS / Références bibliographiques.....	200



# 1 Présentation expérimentale

Les maladies chroniques non transmissibles (MNT) sont les principales causes de décès dans le monde, ce qui représente 63% des décès en 2008. Au Brésil, ces chiffres atteignent 72% des causes de décès. Parmi ces maladies sont répertoriées les risques cardiovasculaire, le diabète sucré (*diabetes mellitus*), et divers types de cancers. Au cours de ces dernières années, il a été établi que les stimuli environnementaux, tels que le stress ou une nutrition périnatale inadéquate, contribuaient de manière significative au développement de l'obésité et des MNT (Brasil, 2006).

Le style de vie moderne exigerait de grandes capacités d'adaptations physiques, mentales et sociales des individus, ce qui serait la principale cause de ces niveaux plus fréquents de stress, de symptômes d'anxiété, de tension, de perturbations du rythme du sommeil et du régime alimentaire. Cette détérioration de la qualité de vie a été associée à une incidence accrue de maladies telles que l'obésité et le diabète (Karlsson Et. Al., 2001; Knutsson, 2003).

Les maladies chroniques ont généralement de multiples facteurs de causalité. Parmi ceux-ci figurent l'association entre un faible poids à la naissance et un risque accru de développer de l'obésité, du diabète ou des maladies cardiovasculaires. La réduction de l'offre en nutriments et / ou en énergie, a été considérée comme l'un des facteurs les plus importants dans le déclenchement d'un faible poids à la naissance (Hales & Barker, 1992, 2001; Langley-Evans, 2000; Gluckman & Hanson, 2004). Le déficit du poids corporel à la naissance, à son tour, a été associé à des changements morphologiques et fonctionnels du système nerveux qui se traduisent par des déficits cognitifs et des réponses altérées au stress et à l'apport alimentaire. De même, cela favorise des perturbations dans le métabolisme énergétique entre les organes périphériques entraînant un risque élevé de maladies chroniques non transmissibles (Barros, Manhaes-De-Castro Et Al., 2006; Barreto-Medeiros, Queiros-Santos Et Al., 2007; Lopes De Souza, Orozco-Solis Et Al., 2008; Toscano, Manhaes-De-Castro Et Al., 2008; Hales and Barker, 2001; Ozanne and Hales, 2002).

Les observations épidémiologiques sont en faveur d'une association entre un faible poids à la naissance et un risque pour le futur adulte de développer de l'obésité, du diabète ou des maladies cardiovasculaires (REFE). Ces études épidémiologiques, renforcées par des expériences approfondies sur les animaux, ont conduit à la formulation de l'hypothèse de la «programmation nutritionnelle" (Lucas, 1991) qui a quelque peu évoluée sous l'influence des cliniciens en «empreinte métabolique». Selon cette hypothèse, la réduction de l'apport en nutriments au cours de la période de développement favorise une « programmation nutritionnelle» qui permet à l'organisme de survivre plus tard dans des conditions de pénurie. Toutefois, lorsque le corps est soumis à une alimentation normale ou en excès, l'incompatibilité physiologique avec son environnement nutritionnel se traduit par le développement d'un syndrome métabolique, caractérisé par plusieurs signes cliniques tels que l'intolérance au glucose, l'hypertension, et l'augmentation des triglycérides (Hales et Barker, 2001; Ozanne et Hales, 2002).

Notre hypothèse de travail soutient que cette programmation nutritionnelle due à des apports nutritionnels réduits ou déficitaires durant la période périnatale, est en partie liée à des changements dans l'horloge circadienne acquis durant la période critique du développement. L'horloge circadienne influence l'équilibre énergétique, affecte l'appétit, les activités métaboliques, le cycle veille-sommeil et la réponse au stress. L'horloge a également été impliquée dans l'homéostasie, ainsi que dans les réponses aux défis environnementaux (PIMENTA et al., 2012). Actuellement, il y a des preuves substantielles fondées sur des études expérimentales que l'environnement périnatal pourrait affecter les rythmes circadiens. Cependant, les mécanismes comportementaux et moléculaires doivent encore être élucidés.

Les rythmes circadiens sont commandés par l'horloge centrale située au niveau du noyau suprachiasmatique de l'hypothalamus (constitué par deux noyaux situés sous le plancher de l'hypothalamus antérieur, de quelques dizaines de milliers de petits neurones chacun). Les neurones de l'horloge centrale sont synchronisés par les signaux provenant des cellules rétiniennes, notamment des cellules à mélanopsine qui sont sensibles aux transitions lumineuses de l'aube ou du crépuscule. Ces neurones envoient des projections vers l'épiphyse impliquée dans la synthèse de la mélatonine. La mélatonine est une hormone du signal jour/nuit qui cible des récepteurs présents à la surface de toutes les cellules somatiques. Il est connu que certaines activités cellulaires quotidiennes telles que la synthèse des protéines, des

enzymes et des hormones répondent à une expression de gènes synchronisée. Ces gènes sont influencés principalement par le cycle lumière-obscurité. Par conséquent, la relation entre le rythme biologique, l'expression des gènes et les conséquences métaboliques pourrait être expliquée par un lien moléculaire entre les composants de l'horloge circadienne et les protéines / enzymes clés dans le métabolisme énergétique. Ainsi, une défaillance de synchronisation entre le cycle circadien et le mode d'alimentation modifierait l'expression des gènes liés au rythme circadien, avec des conséquences néfastes pour le métabolisme de l'individu, et un risque accru d'apparition de maladies chroniques. Toutefois, ce point de vue ne tient pas compte de l'extraordinaire flexibilité de la physiologie circadienne des Mammifères. Le système des gènes horloge fonctionne plutôt comme un réseau d'oscillateurs moléculaires qui sont capables de se synchroniser entre eux ou de maintenir un rythme particulier dans un organe, voire, lorsque la survie de l'individu est en jeu, d'isoler l'horloge centrale et d'imposer un rythme anormal aux horloges périphériques et au comportement veille-sommeil et au cycle de prise de nourriture.

Un régime alimentaires altéré dans la période critique du développement peut déterminer un dysfonctionnement du cerveau à l'âge adulte. Une étude publiée par notre groupe de recherche a observé que les rats nés de mères nourries avec un régime restreint en protéines ont, après le sevrage, une augmentation de l'apport alimentaire (hyperphagie) et développent à l'âge adulte des caractéristiques physiques et métaboliques caractéristiques des troubles de l'obésité, telles que l'augmentation de la graisse abdominale, une concentration élevée de triglycérides et d'acides gras libres dans le sérum. Ces anomalies sont associées à un changement dans la prise alimentaire pendant la journée, ainsi qu'à une suppression du profil circadien d'expression des gènes de l'horloge et des gènes impliqués dans la régulation de la prise alimentaire et dans les dépenses énergétiques dans l'hypothalamus et le foie (Orozco-Solis et al., 2009).

Cette relation entre les troubles des rythmes circadiens et les altérations métaboliques est étayée par des études sur des animaux présentant des mutations dans les gènes qui régulent le rythme circadien comme le gène CLOCK. Des études ont indiqué que ces animaux sont sensibles à l'obésité et au syndrome métabolique, en plus de présenter des changements dans la rythmicité circadienne dans la ration alimentaire diurne et une augmentation de l'Indice de Masse Corporelle (SHI et al., 2013). Les animaux mutants pour le gène CLOCK présentent

aussi une augmentation des niveaux de leptine, de glucose, de cholestérol et de triglycérides par rapport à la souche sauvage (TUREK et. al., 2005).

En plus de l'oscillateur central, il existe des oscillateurs dans les tissus périphériques tels que le foie, le muscle squelettique et même dans les fibroblastes qui possèdent également leur propre machinerie moléculaire permettant une rythmicité circadienne. Un exemple de cela est l'activité d'anticipation de l'alimentation chez les animaux, conformément à l'heure de la journée, lorsque la nourriture est disponible tous les jours (YOUNG e BRAY, 2007). Cette activité est caractérisée par une augmentation de l'activité locomotrice, de la température corporelle, par la libération des hormones et des enzymes impliquées dans le processus de digestion et a pour but de coordonner les processus physiologiques au moment du repas (MENDONZA, 2008; MISTLBERGER, 2009). Le manque de synchronisation du rythme circadien périphérique avec celui de l'horloge centrale a également été associé à des troubles métaboliques comme à l'accumulation de graisse viscérale et à la dyslipidémie trouvées chez les animaux qui se nourrissent durant la période diurne.

Des études montrent que, indépendamment de la désynchronisation causée par des facteurs environnementaux externes tels que le rythme de l'alimentation, la grossesse elle-même peut conduire à des changements spécifiques dans la synchronisation entre les horloges circadiennes centrale et périphériques. Chez les rates "Nil" en gestation, pendant la journée, la phase des rythmes d'activités et de température interne sont semblables à celles des animaux non gestants, mais les amplitudes sont diminuées (Schrader et al, 2009). En revanche, les rates durant la période nocturne n'ont aucune différence dans l'amplitude et la phase des rythmes d'activités et de la température interne (Kittrell et Satinoff, 1998). En suivant l'idée que la grossesse normale affecte le système circadien, une étude récente comparant les taux d'expression de *fos* et de *per2* dans les Noyaux SupraChiasmiques (NSC) et la zone ventrale subparaventriculaire chez des rates gestantes avec le temps entre deux cycles oestriques (dioestrus) a permis de détecter plusieurs différences fonctionnelles. Ces résultats ont été interprétés comme une indication d'une réorganisation fonctionnelle de ces régions cérébrales au cours de la grossesse.

En bref, une question centrale qui va au-delà de notre thèse est bien : par quels mécanismes comportementaux et moléculaires, la grossesse et la dénutrition protéique de la mère influencent-ils le contrôle de l'horloge circadienne?

## 2 Revue bibliographique

### 2.1 L'horloge circadien - Historique

Des relations écrites sur des observations de la physiologie circadienne se retrouvent depuis l'invention de l'écriture. Les premiers humains ont dû remarquer le rythme quotidien dans l'environnement et son impact sur leur propre cycle journalier de sommeil et l'éveil. L'apparition d'horloges et de calendriers est la preuve de cette prise de conscience. Le cadran solaire, qui indique le moment de la journée en fonction de la taille et de la direction de l'ombre projetée par le soleil était, peut-être, la première horloge fabriquée par l'homme. Les Egyptiens utilisaient déjà des obélisques et des cadrans solaires, il y a plus de 5500 ans (Jespersen & Fitz-Randolph, 1999). Il y a environ 3000 ans, les Babyloniens en Mésopotamie, ont créé un système non décimal sophistiqué de mesure du temps. Ce système est celui qui est à l'origine de notre propre système temporel. La Journée chaldéenne, cependant, a été divisé en 12 longues heures au lieu des 24 heures de notre système contemporain. Un décret publié en France en 1793, a créé une division décimale de la journée, mais il a été abrogé deux ans plus tard (Audoin & Guinot, 2001). Sauf pour cette brève période, la partition d'un jour en 24 heures et une heure de 60 minutes est une norme mondiale depuis des siècles.

Beaucoup de commentateurs de l'histoire de la physiologie circadienne concordent pour désigner Jean-Jacques Mairan comme la première personne qui démontra que les rythmes quotidiens étaient produits de façon endogène (Bining, 1964; Foster & Kreitzman, 2004). Mairan (1678-1771), qui était un astronome français, en observant la plante *Mimosa pudica*, avait noté que, contrairement au mouvement vertical des feuilles de l'arbre de tamarin, les feuilles de cette plante se fermaient pendant la nuit, et s'ouvraient pendant la journée. Lorsque la plante était placée dans un endroit totalement sombre, il avait remarqué que l'ouverture des feuilles se produisaient encore dans la matinée et leur fermeture dans la nuit (Mairan 1729). Ceci indique un rythme quotidien qui ne nécessite pas un rythme quotidien de la lumière du soleil. Cette observation particulière ne détermine pas l'existence de la rythmicité endogène. D'autres facteurs environnementaux au-delà de la lumière pourraient avoir causé l'ouverture des feuilles.

Après cette étude de Mairan, d'autres physiologistes ont apporté des contributions à l'étude des rythmes circadiens, mais ce n'est qu'à partir du 20<sup>ème</sup> siècle que la sophistication de la recherche a permis une percée dans ce domaine. Les chercheurs ont démontré que la température interne de singes maintenus en cycles lumière-obscurité, sous une lumière constante et une obscurité constante, suivait un rythme circadien (Simpson & Galbraith, 1906).

D'autres scientifiques, dans la seconde moitié du 20<sup>e</sup> siècle, ont mené des recherches approfondies sur les rythmes circadiens chez les animaux de laboratoire et les patients humains (Richter, 1985) et ont étudié la physiologie des rythmes circadiens du sommeil chez l'homme (Kleitman, 1963). Sans aucun doute, les années 1950 ont été les plus fécondes pour l'avancement de notre compréhension de la physiologie circadienne.

Le travail sur la physiologie circadienne au cours du vingt-et-unième siècle a été construit sur les grands progrès réalisés au cours de la seconde moitié du 20<sup>e</sup> siècle. Le nombre d'articles publiés dans la physiologie circadienne est passé de moins de 200 articles par an en 1965 à près de 2000 articles par an 2000 (Refinetti, 2006). Aujourd'hui, contrairement aux croyances antérieures, l'horloge circadienne n'est pas une propriété restreinte aux réseaux neuronaux, mais un système présent dans chaque cellule qui peut donc fonctionner bien avant la mise en place d'un système nerveux fonctionnel (Vallone et al., 2007).

## **2. 2 L'équilibre circadien**

### **2. 2. 1 Les Zeitgebers (« les synchroniseurs »)**

L'équilibre circadien varie en fonction de l'heure de l'horloge interne (qui est commandé par les informations des signes extérieurs de la journée et la nuit). Ainsi l'équilibre des fonctions homéostatiques fonctionne comme un sablier en fonction du temps passé en éveil ou endormi. Les différentes conditions de l'équilibre du système dépendent donc des besoins de sommeil de l'individu (domaine génétique) et des contraintes externes auxquelles il doit se soumettre (horaires de travail atypiques, privation de sommeil ou de repos, etc.) (Moore 1997 ; Reilly, Atkinson et Waterhouse, 2000).

Dans ce contexte, l'équilibre circadien est modulée par quatre grands facteurs externes: la lumière, la température, l'alimentation et la vie sociale. Ces facteurs aident à synchroniser la période principale de sommeil sur l'alternance du jour et de la nuit. Traditionnellement, ils ont été baptisés par les chercheurs allemands comme des "Zeitgeber" ("synchroniseurs"). Ces synchroniseurs influencent directement l'horloge circadienne. L'espèce humaine suit un rythme strictement diurne. Mais, par exemple, les souris peuvent être indifféremment nocturnes ou diurnes, car leur rythme circadien dépend aussi de la disponibilité de la nourriture, ce dernier synchroniseur étant pour toutes les espèces, un synchroniseur très puissant (Grandin, Alloy et Abramson, 2006).

Le rythme de l'équilibre circadien (mesuré par le cycle de température interne) dépend de l'action d'une hormone du cerveau : la mélatonine dont l'activité est contrôlée par la perception de la lumière au travers des yeux (Arent, 2005). La somnolence n'est pas induite par la volonté individuelle. Les périodes de plus fortes somnolences résultent d'une baisse de la température centrale. Selon que l'individu est du matin ou du soir, la courbe de la température et le pic de la mélatonine sont légèrement retardés ou avancés l'un par rapport à l'autre. Les expériences d'isolement temporel montrent que les sujets privés de sommeil, par exemple, ont les mêmes rythmes circadiens et les oscillations de la température interne restent très stables. Cependant, pour la plupart des gens, les rythmes veille-sommeil changent progressivement en présentant des périodes de sommeil en retard avec ce que l'on appelle les «portes du sommeil» (qui sont les périodes de basse température interne pendant la journée) (Guilleminault et al., 1976).

En plus de la lumière, un autre "Zeitgeber" important est l'exercice physique, ce qui interfère également avec la température et les rythmes endogènes de notre corps. L'action de la mélatonine sur la chute de température pendant la nuit est plus prononcée si le corps était "chaud" au cours de la journée. Les sports d'endurance (course à pied, football, natation, etc.) sont traditionnellement associés à un sommeil plus profond (Li et al, 2004; Guimarães et al., 2008). Ajoutant à ces deux «Zeitgebers" nous trouvons encore le contrôle des rythmes circadiens par la qualité / l'heure de l'alimentation (Grandin, (Waterhouse et al, 2003 Castro., 2004); et les contacts sociaux (le plaisir, l'amour, la tristesse) (Alloy & Abramson, 2006).

## 2. 2. 2 Etudes expérimentales

Les mécanismes de ce contrôle et du développement de l'horloge circadienne et de ses synchroniseurs ont été largement étudiés. De nombreuses similitudes entre les systèmes des mouches et des vertébrés au niveau moléculaire ont rendu possible l'identification des principaux mécanismes de ce processus (Bet-Smith & Kay, 2000; Panda et al, 2002a; Gilbert, 2003). Plusieurs lignes de preuves convergent vers un petit nombre de neurones regroupés dans le cerveau comme le lieu du stimulateur central chargé de diriger les rythmes de l'activité locomotrice chez les adultes. (Handler et Konopka, 1979).

Cependant, les demandes de l'horloge sont régies par les neurones du stimulateur central. Des études moléculaires ont identifié les rythmes circadiens d'expression des gènes de l'horloge dans la plupart des tissus périphériques. Ils persistent même dans les cultures de *Drosophila* avec leurs segments désolidarisés du corps (tête, thorax et abdomen), ainsi que dans les trompes, les antennes, les bords antérieurs des ailes et des jambes (Plautz et al., 1997;. Krishnan et al 1999 ; Tanoue et al, 2004) .Une des propriétés les plus intrigantes de ces horloges périphériques est qu'elles peuvent être contrôlées par l'exposition directe au cycle lumière-obscurité, même *in vitro*, prédisant l'expression généralisée d'un photopigment (Plautz et al., 1997).

Chez la drosophile, l'ablation génétique des yeux ou des mutations bien caractérisées des voies de la phototransduction visuelle (par exemple, *norpA*, une mutation qui affecte les voies de signalisation de la phospholipase C) bloquent complètement le contrôle de l'horloge circadienne par la lumière. L'explication de cette constatation est que le cryptochrome (Cry), exprimé dans les neurones de l'horloge circadienne joue également un rôle crucial dans le contrôle photique de l'horloge chez la mouche (Stanewsky et al, 1998). Ainsi, l'horloge circadienne est seulement «aveugle» dans les mouches dépourvues de toutes les structures externes et internes de l'œil ainsi que de l'expression de Cry (Helfrich- Forster et al., 2001).

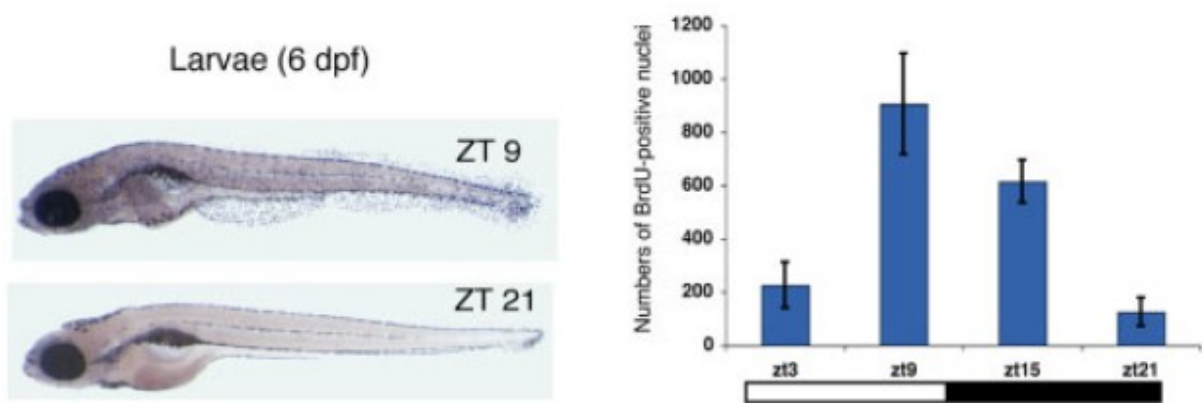
La lumière chez la drosophile et les vertébrés semble jouer un rôle important dans le développement du contrôle de l'horloge circadienne. Mais comment l'horloge percevrait-elle la lumière dans ces premières étapes? Chez la drosophile, la lumière est capable de commander l'oscillateur présent dans le cerveau au cours du premier stade larvaire. A ce stade de développement, aucune des structures photoréceptrices classiques des adultes ne sont présentes. Il semble probable que la perception de la lumière implique Cry qui est déjà



exprimé dans les neurones à ce stade précoce de développement (Klarsfeld et al., 2004). En outre, les larves ont des structures photoréceptrices simples: les organes de Bolwig (BOs). Ces structures paires, chacune constituée de 12 cellules photoréceptrices, ont été impliquées dans la capacité de la larve à montrer une réponse photobiotique (Hassan et al., 2000; Mazzoni et coll., 2005). Les nerfs de Bolwig (BNs) sont responsables de la projection de l'information des BOs jusqu'au cerveau. Au cours du développement de la drosophile, les BOs sont remplacées par des structures photoréceptrices adultes. La création de cette nouvelle entrée pour les nouvelles structures pour le cerceau de l'adulte, coïncide également avec le remodelage important des neurones du cerceau (Malpel et al., 2002).

Chez les vertébrés, l'apparition de la fonction de l'horloge circadienne a été étudiée principalement chez le poisson zèbre (Vallone et al., 2005). Les avantages offerts par cette espèce pour l'analyse génétique moléculaire du développement précoce des vertébrés font que ce modèle est idéal pour explorer les origines et les fonctions initiales de l'horloge circadienne (Nüsslein-Volhard et Dahm, 2002). Ainsi, quand les rythmes circadiens sont-ils détectés pendant le développement de poisson zèbre? Après l'éclosion, de grande amplitude des rythmes circadiens d'activité locomotrice sont évidents dès que les larves commencent à nager activement et à trouver de la nourriture (à partir de 5 jours après la fécondation). L'émergence de ces rythmes est dépendante de l'exposition à un cycle lumière-obscurité pendant les 4 premiers jours du développement (Hurd et Cahill, 2002).

L'augmentation du rythme de développement dans ces animaux en augmentant la température de leur environnement ne fait pas avancer l'heure de l'émergence de ces rythmes. Il semble donc que ce soit le nombre de cycles lumière-obscurité, plutôt que la phase du développement qui soit le facteur déterminant pour le rythme circadien du cycle cellulaire (Dekens et al., 2003, figure 1). Les rythmes circadiens de synthèse de la mélatonine apparaissent beaucoup plus tôt. En présence d'un cycle de lumière-obscurité, une augmentation significative de la mélatonine nocturne est d'abord détectée lors de la seconde nuit post-fertilisation. Ce résultat est confirmé par le motif d'expression de l'ARNm de *zfaanat2* dans la glande pinéale (Gothilf et al., 1999; Cahill et Kazimi, 1999). Un rythme circadien de la synthèse de la mélatonine persiste plus tard, après le transfert des animaux en obscurité constante.



**Figure 1 - Les rythmes circadiens de la prolifération des cellules dans les larves de poisson zèbre.** À gauche: Une imprégnation totale de bromodéoxyuridine (BrdU) décrit une amplitude élevée lors du rythme jour-nuit pour la fréquence de noyaux en phase S (coloration bleue) dans la peau des larves, six jours après fécondation (DPF) qui ont été soumises à un cycle lumière-obscurité. Larves représentatives au pic horaire (ZT9) et au temps (ZT21). À droite: la quantification du nombre de noyaux en phase S (BrdU-positif) comptés sur la peau entre la vessie et l'anus (Dekens et al, 2003).

Après le travail avec la drosophile et le poisson zèbre, la question était inévitable : comment et quand au cours du développement, le système circadien chez les mammifères est-il en mesure de répondre à la lumière ? Il a été découvert que les cellules ganglionnaires photoréceptrices de la rétine exprimant la mélanopsine sont les principales structures photoréceptrices circadiennes (Berson et al, 2002; Hattar et al., 2002). L'expression du gène de la mélanopsine est d'abord détecté à partir du 10ème jour au cours du développement embryonnaire de la rétine de souris, ce qui coïncide avec l'apparition de cellules ganglionnaires photoréceptrices de la rétine (Tarttelin et al., 2003). Celles-ci sont sensibles à la lumière à partir de la naissance et forment des connexions fonctionnelles avec le noyau suprachiasmatique de l'hypothalamus (NSC) à partir de l'induction de l'expression des gènes par la lumière.

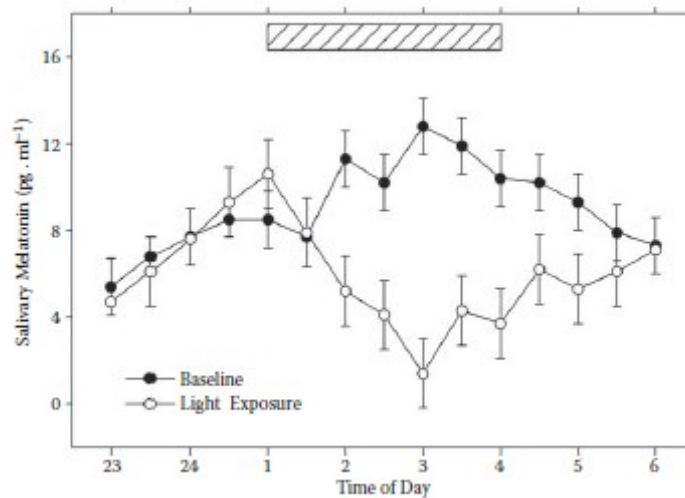
Un point intéressant, à la naissance, la densité des cellules ganglionnaires rétiniennes est 5 fois plus élevée que dans la rétine adulte (Sekaran et al., 2005). La raison pour laquelle il y a une telle quantité de cellules au cours du développement précoce reste inconnue. Une possibilité est qu'il y ait un «excédent» de cellules ganglionnaires, qui entrent en compétition pour la génération de synapses fonctionnelles avec leurs neurones cibles, ce qui serait un moyen d'assurer la «fiabilité» pour la formation des connexions (Kandel et al., 2000). Ces résultats, interprétés comme un tout, soulignent que le moment de l'apparition d'un mécanisme

d'entrée du signal lumineux coïncide avec la première apparition d'une horloge circadienne fonctionnelle.

### 2. 2. 3 Rôle de la mélatonine

La mélatonine est une hormone synthétisée principalement dans la glande pinéale et sécrétée dans la circulation sanguine. La mélatonine est une hormone qui n'est pas particulièrement importante pour les principaux systèmes physiologiques, mais elle a reçu une attention particulière des physiologistes circadiens en raison de son rôle central dans le photopériodisme. La mélatonine affecte plusieurs systèmes physiologiques dans les organismes qui dépendent des rythmes liés à la lumière jour.

La mélatonine agit également dans la modulation des rythmes circadiens et est connue comme un facteur important chez les vertébrés non mammifères. Sa sécrétion a été décrite chez les poissons (Bayarri et al., 2004), les reptiles (Jessop Limpus et Whittier, 2002), les oiseaux (Tarlow et al., 2003) et les mammifères, y compris chez les rongeurs (Nakahara et al., 2003) et les humains (Touitou et Selmaoui, 2003). Elle est sécrétée lors du passage du jour à la nuit, en particulier parce qu'elle est inhibée par la lumière pendant la journée, comme le montre la Figure 2. Ces données ont été enregistrées chez les humains, mais elles montrent clairement que l'exposition à la lumière durant la nuit peut considérablement inhiber la sécrétion de mélatonine. Déterminer la rythmicité dans la sécrétion de mélatonine n'est pas simplement le résultat de l'inhibition photique au cours de la journée, les mesures doivent être effectuées dans l'obscurité constante. Des études ont été effectuées chez les ovins et ont confirmé la persistance de la rythmicité sous obscurité constante (Johansson et al., 2001).



**Figure 2 - Suppression de la mélatonine par la lumière.** Bien que la sécrétion de la mélatonine suit un rythme circadien en l'absence d'un environnement en cycle lumière-obscurité, la lumière a un effet supprimeur sur la sécrétion de l'hormone. Les données de cette figure sont représentées sous forme de moyenne ( $\pm$  écart-type) de 7 humains maintenus en lumière constante (Baseline) ou exposés à la lumière pendant 3 heures (Light Exposure). La sécrétion de mélatonine a été mesurée comme la concentration dans la salive à des intervalles de 30 minutes. La barre hachurée horizontale indique la durée de l'exposition à la lumière. A noter que les deux courbes présentent la rythmicité circadienne, mais la courbe de la condition «exposition à la lumière/Light Exposure» montre également une suppression de la mélatonine induite par la lumière. (Source: .Hebert, M. et al (2002) The effects of prior light history on the suppression of melatonin by light in humans. *Journal of Pineal Research* 33: 198–203.).

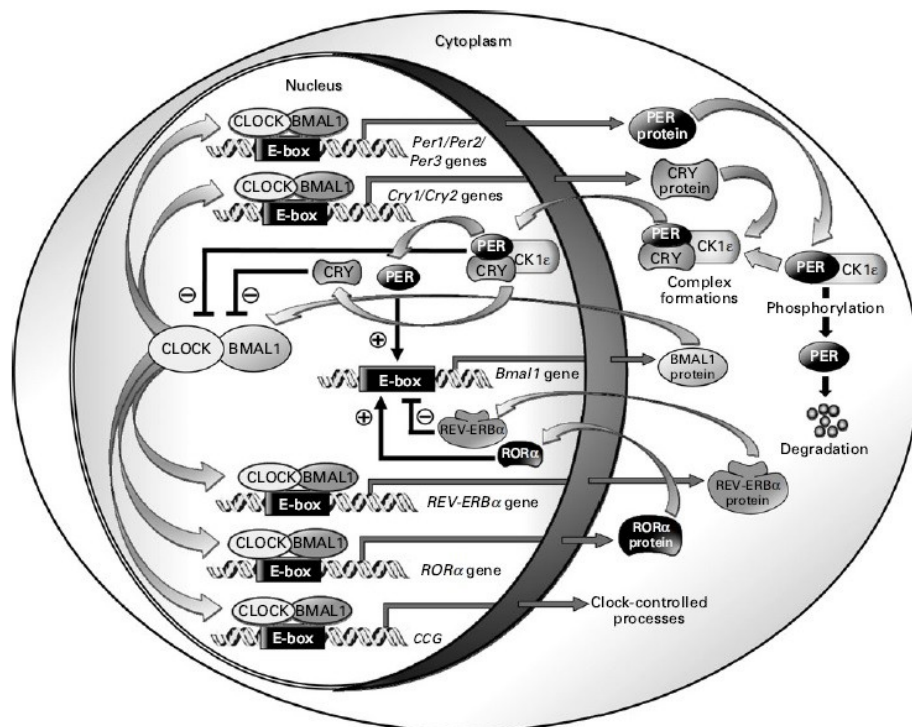
## 2. 3 Rythmes circadiens chez les adultes

Chez tous les animaux, jusqu'aux cyanobactéries et aux végétaux, les fonctions physiologiques oscillent régulièrement sur une période de 24 heures. Cette variation rythmique, appelé circadienne - Latin circa, environ, et dies, jour - est assurée par un réseau d'oscillateurs moléculaires appelés l'horloge circadienne. Grâce à ce réseau, le corps intègre les signaux environnementaux (alternance de lumière et cycles sombres, les réseaux alimentaires ...) et détermine une organisation temporelle de son homéostasie, qui chez un animal, peut être représenté par le cycle veille-sommeil, le rythme cardiaque, le catabolisme des éléments nutritifs et la sécrétion de diverses hormones.

Chez les mammifères, la localisation anatomique de l'horloge centrale est située dans les noyaux suprachiasmatiques de l'hypothalamus (SCN), une structure située à la base du cerveau. Mais les systèmes de contrôle capables de générer des variations circadiennes dans l'expression génique sont dans d'autres noyaux hypothalamiques, dans d'autres structures du cerveau et dans les organes périphériques tels que l'intestin, le muscle squelettique et le foie.

L'activité de toutes ces horloges périphériques demeure sous dépendance de l'horloge centrale en conditions normales.

Au niveau moléculaire, les éléments de base du système de l'horloge circadienne sont les facteurs de transcription CLOCK (Circadian Locomotor Output Cycles Kaput) et bmal1 (Brain and Muscle Arnt-like protein 1), qui se lient à une séquence particulière de l'ADN, la boîte E, activant l'expression des gènes des familles period (*Per1-3*) et cryptochromes (*Cry1-2*) ainsi que plusieurs gènes impliqués dans la régulation du métabolisme lipidique et du métabolisme des glucides. Lorsque l'expression des protéines PER et CRY atteint un certain niveau dans le cytoplasme, les dimères régulateurs PER-CRY sont transférés dans le noyau et les protéines PER inhibent la fixation des dimères Clock/ Bmal1 sur l'ADN, inhibant l'expression de leurs propres gènes (Sassone-Corsi et Schibler, 2002). Par la suite, l'élimination du complexe 'inhibiteur Per / Cry par le système du protéasome, libère le frein sur l'activité transcriptomique de Clock / Bmal1 (Figure 3). On estime que, grâce à ce mécanisme, l'horloge contrôle l'expression cyclique de 10% des gènes dans une cellule pendant un nycthémère (Panda et al., 2002).



**Figure 3** – Le mécanisme de base de l'horloge circadienne dans le noyau suprachiasmatique et les tissus périphériques (Cagampang and Bruce, 2012)

Le génome des mammifères code pour plus d'une douzaine de gènes associés à des mécanismes de rétroaction qui constituent l'horloge circadienne. La liste des gènes de l'horloge est toujours en expansion avec la découverte de CHRONO (Anafi et al, 2014 ; Goriki et al, 2014.). En outre, le fonctionnement des horloges dépend de nombreux phénomènes de compensation moléculaires. Ainsi, *bmal2* est clairement capable de compenser l'activité *bmal1* d'une insuliniémie induite chez la souris (Shi et al., 2013) ou le rat hypertendu (Polidarová et al., 2013). Sous un régime hyperlipidique, NPAS2 est un facteur de transcription limitant dont la défaillance chez le fœtus est induite par la diète et restauré par le retour à une alimentation normale (Suter et al., 2011). La connexion entre l'horloge circadienne et le catabolisme du glucose alimentaire, par exemple, est donnée par l'état des cofacteurs redox NAD (H) et NADP (H) qui influencent directement la capacité des complexes CLOCK: BMAL1 et NPAS2: BMAL1 à se lier à l'ADN cellulaire (Rutter et al., 2001); et principalement sur les promoteurs de gènes *Period*, où *Period2* a été associé au métabolisme lipidique (Grimaldi et al., 2010). Dans ces deux complexes multiprotéiques, les rôles de CHRONO et BMAL2 sont encore incertains. L'activité histone acétylase de CLOCK (Doi et al., 2006) fonctionne en parallèle de l'activité de désacétylase de la SIRT1 directement sur le contrôle de la fixation du NAD<sup>+</sup>. La transcription de *bmal1* est également contrôlée par le Rev-erb- $\alpha$  du récepteur nucléaire, qui module la capacité d'oxydation du muscle squelettique et la régulation de la biogenèse mitochondriale et l'autophagie (Woldt et al., 2013). Ainsi, chez la souris, l'horloge circadienne facilite les taux d'oxydation-réduction correspondant au cycle rapide de l'alimentation et maximise la production d'énergie au repos (Peek et al., 2013).

Ces événements de l'horloge moléculaire se trouvent à la fois dans les cellules neuronales qui ne font pas partie du SCN, mais aussi dans les tissus périphériques y compris le cœur (Peirson, et al, 2006 ; Young et al., 2001), le foie (Peirson et al., 2006; Davidson et al, 2004), le tractus gastro-intestinal (Konturek et al, 2011; Hoogerwerf et al, 2007) et le pancréas (Marcheva et al, 2010 ; Sadacca et al, 2011). Cependant, le rythme de l'expression génique de l'horloge dans les tissus périphériques peut être déphasé de 4 heures par rapport aux rythmes trouvés dans le SCN (Peirson et al, 2006 ; Lee et al, 2001;.. Yoo et al, 2004). Cela est dû à l'organisation hiérarchique de l'horloge centrale qui envoie des signaux aux oscillateurs périphériques pour maintenir les rythmes circadiens dans ces tissus. Le rythme circadien d'expression de gènes horloge, tels que *Per1* et Rev-erb- $\alpha$  dans les fibroblastes

d'animaux en culture, par exemple, peut être régulé par des signaux provenant du SCN (Li et al., 2008). Il est spéculé qu'il y a un retard dans la réception des signaux centraux ou que les signaux puissent être envoyés à différents moments de la journée pour les différents tissus en fonction de leur fonction. Par exemple, certaines voies métaboliques doivent être activées dans les muscles à un moment particulier de la journée tandis que simultanément il y a une réduction de l'activité du tractus gastro-intestinal (Kreier et al., 2003). Ensuite, l'effet inverse de tonus autonome dans ces tissus redirige le flux sanguin vers les tissus de l'abdomen impliqué dans le mouvement.

Les mécanismes par lesquels le noyau suprachiasmatique de l'hypothalamus peuvent réaliser cette tâche ne sont pas tout à fait clair, mais peuvent impliquer des médiateurs humoraux tels que la prokinéticine-2 (Li et al, 2006; .. Prosser et al, 2007), l'arginine vasopressine (Kalsbeek et al, 2010; Kalsbeek et al, 1992), la cytosine cardioline (Kraves & Weitz, 2006), le peptide intestinal vaso-actif (Kalsbeek & Buijs, 1992), l'orexine (Yi et al, 2009), le peptide activé par l'adénylate cyclase hypophysaire, le facteur de croissance transformant (Li, Sankrithi CF & Davis, 2002), ou la libération de l'hormone mélatonine par la glande pinéale pendant la nuit (Moore, 1996 (Yi et al., 2010); Engel et al ., 2005).

Le noyau suprachiasmatique de l'hypothalamus peut également communiquer les signaux temporels pendant la journée aux tissus périphériques par le biais de l'influx nerveux tel que le changement rythmique de la balance sympathique / parasympathique (Kalsbeek et al, 2008; .Buijs et al, 2003). La projection sympathique, en particulier, est essentielle dans le maintien des rythmes physiologiques dans les tissus périphériques tel que le foie impliqué dans l'homéostasie du glucose (Cailotto et al., 2005; Kalsbeek et al., 2006). En outre, la sélectivité dans la communication entre les noyaux suprachiasmatiques et les tissus périphériques est telle que la stimulation parasympathique et sympathique du système nerveux autonome sont capables d'innervier les différents compartiments à l'intérieur même du tissu.

Les couches de graisses sous-cutanée et intra-abdominale, par exemple, sont innervées par des neurones moteurs sympathiques et parasympathiques séparés (Kreier et al., 2002). L'entrée sympathique dans les adipocytes a été reconnue comme étant essentielle pour la régulation des rythmes quotidiens de la libération de leptine issues des dépôts graisseux (Kalsbeek et al., 2001). Ainsi, le changement de la production autonome des noyaux suprachiasmatiques peut se traduire par un rythme déséquilibré entre les différents

compartiments de la graisse, ce qui peut provoquer une augmentation de l'accumulation de lipides menant à l'obésité (Kobayashi et al., 2004).

Outre la lumière du jour, d'autres facteurs peuvent modifier l'horloge centrale et / ou celles périphériques. Ceux-ci comprennent la température du corps, le repas, la restriction alimentaire et l'exercice physique régulier (Schibler, Ripperger & Brown, 2003; Brown et al, 2002;. Buxton et al, 2003). Ces facteurs sont particulièrement importants pour l'horloge circadienne dans les tissus périphériques qui ne perçoivent pas l'alternance Jour/Nuit. En revanche, l'horloge centrale dans les noyaux suprachiasmatiques est entraînée sur le cycle lumière-obscurité (Stokan et al., 2001; van Someren et al., 2007). Les connexions intercellulaires de l'horloge des noyaux suprachiasmatiques leur permettent de maintenir la cohérence pour générer des rythmes indéfiniment *in vivo* et pendant plusieurs semaines dans des explants de cerveau (Liu et al., 2007). En revanche, les cellules de la périphérie sont moins synchronisables et perdent leur cohérence rapidement chez les animaux avec des noyaux suprachiasmatiques lésés (Guo et al., 2006) ou en culture tissulaire (Yoo et al, 2004;.. Kornmann et al, 2007). Par conséquent, les rythmes générés par des oscillateurs dans les tissus périphériques doivent être entraînés par l'horloge centrale afin qu'ils puissent être synchrones les uns par rapport aux autres.

Pour les tissus périphériques impliqués dans les processus métaboliques et nutritionnels, tels que l'estomac, l'intestin, le foie et le pancréas, les horaires de l'alimentation et la restriction alimentaire sont des régulateurs puissants de l'horloge circadienne (Schibler, Ripperger & Brown, 2003; Hirota et Fukada, 2004). Fait notable, les variations de ces synchroniseurs périphériques peuvent découpler les horloges périphériques de l'horloge centrale dans des conditions normales et de façon indirecte. Ainsi, lorsque l'alimentation d'animaux, comme des rongeurs nocturnes, est restreinte à la phase diurne du nyctémère, les rythmes de l'activité d'anticipation de recherche de la nourriture, du métabolisme énergétique et de l'expression des gènes dans les tissus périphériques sont entraînés sur la phase Jour (Davidson, Castanon-Cervantes & Stephan, 2004; Escobar et al., 2004; Mistlberger, 2011), tandis que le rythme d'expression génique dans les noyaux suprachiasmatique reste entraîné par l'alternance Jour/Nuit (Dibner, Schibler & Albrecht 2010 Stokan et al ., 2001). Cela peut être considéré comme un mécanisme d'adaptation à des changements dans la disponibilité de l'alimentation tout en maintenant la synchronisation avec le cycle jour-nuit. Plus intéressant est le fait que non seulement l'intensité de la lumière lors des transitions de cycle lumineux est



en mesure de modifier les noyaux suprachiasmatiques mais aussi les couleurs de l'environnement (Walmsley et al., 2015). Cette constatation peut révéler un nouveau mécanisme sensoriel qui rendrait compte de l'heure pour 90 % espèces de mammifères qui ont une vision di ou trichromique.

La synchronisation des horloges périphériques par l'alimentation est logique parce que le métabolisme circadien a une influence majeure sur de nombreuses cellules périphériques. Toutefois, l'exposition à long terme aux effets combinés de différents modulateurs des signaux d'horloge circadienne peut entraîner une mauvaise santé métabolique. Travailler avec des changements à long terme, traverser fréquemment plusieurs fuseaux horaires ou avoir un mode de vie irrégulier avec des troubles du sommeil, où des changements dans la structure du sommeil qui soient couplés avec des repas irréguliers, peuvent également être considérés comme des facteurs de risque dans le développement de plusieurs désordres cardiométaboliques et gastro-intestinaux (Knutsson & Boggild, 2010; Hoogerwerf, 2009; Szosland, 2010; Scheer et al., 2009).

## **2. 4 Rythmes circadiens chez le fœtus**

On connaît peu le système circadien fœtale. Ce qui est connu est le fait que le développement des rythmes circadiens fait partie du développement du fœtus et se déroule normalement en l'absence de noyaux suprachiasmatiques fonctionnels de la mère. Cela est démontré par l'acquisition normale des rythmes circadiens chez les rats nés de mères dépourvues de rythmes circadiens provenant des noyaux suprachiasmatiques lésés ou de souris doublement déficientes : souris knock-out *mPer1Brdn / mPer2 Brdn / mPer2 Brdn* ou souris *mPer2 Brdn / mCry1* (révisés par Davis et Reppert 2001 ; Jz e Albrecht, 2006). Cependant, les deux approches expérimentales montrent que des signaux maternels sont nécessaires pour synchroniser les rythmes postnataux. Les études chez l'Homme, les primates non humains, et les moutons démontrent la présence de contrôle sur 24 heures des rythmes de la fréquence cardiaque fœtale, des mouvements respiratoires, des mouvements fœtaux et des hormones (Seron-Ferre et al., 2007). En outre, chez les animaux tels que les moutons, les rats, les hamsters et les cerfs, le fœtus programme sa physiologie en fonction de son environnement après la naissance (Seron-Ferre et al, 1993;. Ebling et al., 1989; Gorman et al,

2001; . Adam et al., 1994). Chez les adultes, les rythmes circadiens et saisonniers dépendent du système circadien. Y at-il un système circadien semblable à l'adulte qui permettrait de contrôler les rythmes chez le fœtus?

## **2. 5 Ontogénie du système circadien central et périphérique chez le fœtus**

Chez les rongeurs (rats et hamsters), les moutons, les humains et les primates non humains, les noyaux suprachiasmatiques sont reconnaissables par histologie à partir du milieu de la grossesse et présentent des différences entre le jour et la nuit pour l'activité métabolique, l'expression de l'ARNm de la vasopressine (AVP) et de l'ARNm et de la protéine c-fos ARNm avant la naissance (Reppert et Schwartz, 1983, 1984; Davis et Gorski, 1985;. Constandil et al, 1995 ;. Nováková et al, 2010). Cependant, il y a des différences importantes entre les espèces sur l'âge auquel les jalons de développement, tels que l'acquisition du nombre final de neurones et l'innervation par des voies rétino-hypothalamiques sont atteintes. Bien que ces événements soient terminés dans l'utérus chez les primates et les moutons, ils ne se produisent que durant la période postnatale chez les rongeurs (Seron-Ferre et al, 2001a;. Sumová et al, 2008 ;. Weinert, 2005). D'autres différences entre les espèces sont également présentes en fonction de l'âge gestationnel où l'expression des gènes de l'horloge est détectée dans les noyaux suprachiasmatiques foetaux chez les primates non humains et les rongeurs.

L'ontogenèse des oscillations des gènes de l'horloge dans les noyaux suprachiasmatiques foetaux a été largement étudiée chez les rats, les souris et les hamsters en mesurant l'expression *in vivo* de gènes de l'horloge et également par mesure *in vitro* de l'expression d'un seul gène (ou *Per2 Per1* ) dans les coupes histologiques de noyaux suprachiasmatiques foetaux. Les informations fournies par les deux approches diffèrent. Toutes les études *in vivo* ont montré que les expressions des gènes de l'horloge dans les noyaux suprachiasmatiques du fœtus sont faibles et les oscillations en opposition de phase caractéristiques d'une horloge correctement organisée ne sont atteintes que 10 jours après la naissance (Shimomura et al, 2001;. Sladek et al 2004;. Li et Davis, 2005; Sumová et al, 2008 ;. Ansari et al, 2009). Chez les rats, comme indiqué par Sumová et al. (2008), la

démonstration des oscillations des gènes de l'horloge circadienne se produit en parallèle du développement des synapses des noyaux suprachiasmatiques fœtales. Des études *in vitro* de coupes de noyaux suprachiasmatiques chez le rat au cours des périodes foetales et néonatales diffèrent des données *in vivo*. Ohta et al. (2008) ont détecté une forte expression circadienne de *Per1* dans les coupes de noyaux suprachiasmatiques foetales chez la souris transgénique à l'âge gestationnel de 22 jours (correspondant à 23 jours). Il est difficile de savoir si les conditions de culture ont masqué l'oscillation potentielle de *Per1* dans les noyaux suprachiasmatiques fœtaux comme démontré par Dolatshad et al. (2010) pour les organes foetaux des rats. Cependant, malgré l'absence de mécanisme canonique de l'horloge, les rythmes de 24 h de l'activité métabolique et de l'expression des ARNm de *c-fos* et de *AVP* sont présents dans les noyaux suprachiasmatiques des rongeurs au stade foetal *in vivo* (Reppert et Schwartz, 1983, 1984 ; Davis et Gorski, 1985; Nováková et al, 2010).

Comme suggéré par Sumová et al. (2008), ces rythmes des noyaux suprachiasmatiques fœtaux ne peuvent pas être des rythmes endogènes et pourraient survenir en réponse aux signaux cycliques maternels. En variante, une possibilité intéressante est que, au cours du développement, ces fonctions puissent être initialement entraînées par un oscillateur ne participant pas au contrôle en retour du cycle de transcription / traduction (Cycle Feedback Transcription/Translation (CFTT)) comme chez les globules rouges (O'Neill et Reddy, 2011) avec pour conséquence que lorsque l'organisation postnatale des noyaux suprachiasmatiques des rongeurs est terminée, le CFTT devient actif.

L'ontogénie de l'expression des gènes de l'horloge dans les organes périphériques foetaux et néonataux a été largement étudiée chez les rongeurs. Les horloges circadiennes peuvent être impliquées dans le développement des six ARN messager canoniques de l'horloge (*Per1*, *Per2*, *Cry1*, *Cry2*, *Clock* et *Bmal1*), qui sont exprimés dans les ovocytes non fertilisés de souris. Après la fécondation, l'expression de ces 6 ARNm diminue du stade 2 cellules au stade 16 cellules pour être ré-initiée au stade du blastocyste (Johnson et al, 2002; .Ko et al, 2000). Après l'implantation, les gènes de l'horloge sont détectés chez les fœtus entiers et plusieurs organes périphériques. En mesurant *in vivo* par des techniques d'imagerie, des souris gravides portant des fœtus transgéniques « *Per1: luc* », il a été montré l'expression de la luciférase dans l'utérus de rates à 10 jours de gestation et une différence dans l'intensité de la luminescence à 12 jours de gestation. Dans l'ensemble, il y avait une augmentation

exponentielle de Per1: Luc dans l'utérus du Jour-10 jusqu'à la fin de la gestation et au premier jour post-natal (Saxena et al., 2007).

D'autres chercheurs se sont penchés sur l'expression des gènes de l'horloge chez les fœtus entiers et les organes du fœtus sélectionnés *in vivo* chez la souris (Dolatshad et al., 2010) et les foetus de rat. Chez les fœtus de rat entier, l'expression des gènes de l'horloge Per2, Cry1, Bmal1 et Clock ont été détectés du jour-10 de gestation au premier jour postnatal. Cependant, les mesures d'expression de Per2 et Bmal1 sur des intervalles de 4 h ont montré un motif circadien dans l'ensemble des fœtus au bout de 10, 14 et 19 jours de gestation. Des résultats négatifs similaires ont été trouvés dans le foie fœtal, les reins et le cœur dans ces deux dernières périodes de gestation. La même question a été explorée dans le foetus de rat à 16 jours de gestation, sauf que les gènes de l'horloge ont été quantifiés séparément dans toute la tête entière et dans le reste du corps. Dans cette étude, une opposition de phase de 24 h dans les oscillations de Per2 et de Bmal1 ont été observées dans ces deux compartiments. Ces oscillations ont été masquées lorsque les données obtenues sur la tête et le corps ont été combinées.

Les structures cérébrales et les organes qui contribuent aux oscillations sur 24 heures des gènes de l'horloge chez la souris ainsi que la tête et le reste du corps chez le rat pendant la période fœtale à 18 jours de gestation ont été étudiées afin de vérifier ces oscillations (Torres-Farfan et al., 2011). Chez la souris, la *pars tuberalis* foetale montre des oscillations des protéines des gènes horloge BMAL1, PER2m et CRY1m (Ansari et al., 2009). Chez le rat, les différences entre le jour et la nuit dans l'expression des ARNm Per2 et Bmal1 avec une opposition de phase sont aussi présents dans l'hippocampe et dans la glande pinéale du fœtus. D'autres structures cérébrales n'ont pas été testés. Au niveau du corps, aucune oscillation n'a été trouvée dans le foie fœtal de souris, selon les résultats d'une étude plus détaillée de Sladek et al. (2007). Une petite oscillation se trouve dans le cœur de fœtus de souris. En revanche, de fortes oscillations en opposition de phase de Per2 et de Bmal1 n'ont pas été retrouvées dans la glande surrénale de rat fœtal (Torres-Farfan et al., 2011). D'autres auteurs ont détecté l'expression postnatale circadienne de Per1: Luc à la naissance chez les rats, dans la glande pinéale, dans le foie, dans la thyroïde et les glandes surrénales (Yamazaki et al., 2009). Au total, les données disponibles soutiennent la présence des horloges circadiennes périphériques

chez les rongeurs au stade fœtal à un âge gestationnel au cours duquel les oscillations de la transcription dans les noyaux suprachiasmatiques du fœtus sont absentes.

## **2. 6 Contrôle des rythmes fœtaux par les signaux circadiens maternels**

Un aspect inconnu des horloges circadiennes est la régulation et les mécanismes qui influent directement sur ce système. Les noyaux suprachiasmatiques de l'adulte sont régulés par le cycle lumière / obscurité à travers les voies du tractus rétinothalamique, mais les mécanismes moléculaires par lesquels les neurotransmetteurs agissent sur les neurones des noyaux suprachiasmatiques en changeant l'horloge moléculaire sont inconnus. Les rythmes des gènes de l'horloge dans les noyaux suprachiasmatiques des singes capucins pendant la vie fœtale et les rythmes des ARNm de AVP et de c-Fos dans les noyaux suprachiasmatiques du fœtus de rat sont régulés par le cycle lumière / obscurité extérieur (Torres-Farfan et al, 2006; . El-Hennamy et al, 2008;. Nováková et al, 2010). La preuve discutée ci-dessus indique que pour ces macaques, la régulation peut être fournie par le rythme maternel de la mélatonine.

A ce jour, deux signaux de régulation d'origine maternelle, la mélatonine et la restriction du temps d'accès à la nourriture ont été démontrés chez les rongeurs. Une expérience récente a examiné le rôle du cycle lumière / obscurité par rapport à une alimentation restreinte sur les rythmes de AVP et de c-Fos dans les noyaux suprachiasmatiques fœtaux de rats. Nováková et al. , 2010 n'ont pas trouvé d'effet de la restriction alimentaire sur ces rythmes lorsque le cycle lumière / obscurité est maintenu. Toutefois, lors d'une exposition à une lumière constante, qui perturbe le rythme de l'activité maternelle (et éventuellement d'autres rythmes, y compris la mélatonine), les rythmes de l'AVP et de c-Fos dans les noyaux suprachiasmatiques fœtaux ont été abolis, ce qui suggère la suppression ou la désynchronisation de ces rythmes. Dans cette situation, la restriction alimentaire maternelle restaure les rythmes dans les noyaux suprachiasmatiques fœtaux, mais l'amplitude observée était plus petite et la phase a été modifiée par rapport aux foetus des mères gardées dans le cycle lumière / obscurité (Nováková et al., 2010). Les auteurs ont

conclu que les signaux maternels liés au cycle lumière / obscurité prévalent sur les signaux alimentaires pour ces rythmes spécifiques des noyaux suprachiasmatiques foetaux.

Déjà chez les rongeurs, la régulation exercée pendant la vie fœtale a une longue rémanence post-natale. Il est bien établi que la phase postnatale des rythmes circadiens du comportement qui apparaissent vers un âge de 2-3 semaines chez les hamsters et les rats sont régulés par des signaux maternels reçus pendant la grossesse. Une démonstration convaincante que le rythme de la mélatonine chez la rate gestante est impliquée dans la régulation des rythmes chez les rats, est la constatation que la pinéalectomie maternelle pendant la grossesse entraîne une désynchronisation du rythme de l'ingestion hydrique du raton. La synchronisation de ce rythme de la progéniture est restaurée par une nouvelle exposition à la mélatonine maternelle quotidienne en fin de gestation (Bellavia et al., 2006). Les mécanismes par lesquels ce contrôle est exercé sont inconnus; cependant, il y a une préoccupation croissante sur les effets à long terme sur la progéniture humaine de l'interférence entre l'alimentation et le rythme de la mélatonine maternelle en lien avec le mode de vie et les changements dans les heures de travail pendant la grossesse.

## **2. 7 Le système circadien maternel durant la gestation**

Il est clair que les signaux circadiens maternel pendant la grossesse sont importants pour les rythmes circadiens fœtaux et néonataux. Cependant, il y a peu d'informations sur les adaptations physiologiques du système circadien maternel à la grossesse et sur la réponse de ce système aux perturbations environnementales (tels que la restriction alimentaire, le stress, les changements dans le cycle lumière-obscurité, etc.). Dans des conditions normales, les études chez les humains et les souris ont montré une augmentation de l'amplitude du rythme de mélatonine de la mère (voir la revue de Tamura et al., 2008). En outre, dans les deux espèces, il ya une augmentation des glucocorticoïdes plasmatiques maternels tandis que le rythme est maintenu en glucocorticoïdes plasmatiques et la réponse de l'axe hypothalamo-surrénalien est diminuée (Weerth et Buitelaar, 2005; Brunton 2010 ). Les autres rythmes maternels tels que les changements spécifiques de l'activité et de la température montrent des profils caractéristiques de l'espèce. Chez les rates "Nil" gestantes, pendant la journée, la

phase des rythmes d'activité et de température sont semblables à celles de rates non-gravidés, avec une diminution de l'amplitude (Schrader et al, 2009). En revanche, les souris ayant une activité nocturne n'ont montré aucune différence dans l'amplitude et la phase du rythme de l'activité et de la température (Kittrell et Satinoff, 1998). En suivant le raisonnement que la grossesse normale affecte le système circadien maternel, une étude récente comparant les taux d'expression des protéines Fos dans les noyaux suprachiasmatiques et de Per2 dans la zone ventrale subparaventriculaire dans les rates gestantes et la durée entre deux cycles oestriques (dioestrus), a détecté plusieurs différences fonctionnelles. Fait à noter, le pic Per2 d'expression est avancé de quatre heures dans les noyaux suprachiasmatiques de rates gestantes et il n'y avait pas de différences dans la réponse à la lumière du centre et de la périphérie des noyaux suprachiasmatiques et des zones ventrale et subparaventriculaire. Ces résultats ont été interprétés comme une indication d'une réorganisation fonctionnelle de ces régions au cours de la grossesse.

Les conséquences à long terme chez la progéniture sont une éventuelle perturbation du système circadien maternel, cette question commence à peine à être explorée. Chez les humains et les animaux de laboratoire, la malnutrition pendant la grossesse augmente le risque de maladie cardiovasculaire et de syndrome métabolique chez la progéniture, à l'origine du concept de l'origine développementale de la santé et de la maladie (DOHAD, Developmental Origin of Health and Diseases). D'un grand intérêt est l'augmentation de l'obésité chez les enfants (Entringer et al., 2010). Les études chez les macaques japonais gestantes, lorsqu'elles sont soumises à un régime alimentaire riches en graisses ont montré une augmentation de l'adiposité de la progéniture. Une cible serait le foie foetal, qui accumule les lipides, et qui montre une expression accrue de gènes de la voie de la néoglucogenèse et une interruption de l'expression de NPAS2 due à l'augmentation du taux d'occupation des sites de l'acétylase de l'histone H3K14ac au niveau du promoteur de NPAS2 de l'horloge circadienne (McCurdy et al, 2009; Suter et al, 2011).

Une autre modification du régime alimentaire a été décrite, des souris gravidés alimentées sur un régime alimentaire à faible teneur en protéines qui se traduit chez les descendants à 20 semaines d'âge, par une résistance à l'insuline et une augmentation de l'adiposité. Fait à noter, les anomalies de comportement dans le temps du fonctionnement circadien et du comportement alimentaire et un changement dans le cycle lumière / obscurité

dans l'expression des ARNm Bmal1 et Per2 de l'horloge circadienne en zone frontale du cerveau et dans le cortex hépatique étaient présents à 8 semaines, avant l'apparition des anomalies métaboliques. Curieusement, le traitement n'a pas affecté l'expression des gènes dans l'hypothalamus, y compris les noyaux suprachiasmatiques (Sutton et al., 2010). Reste, en fait, à savoir si ces conditions pendant la gestation (composition du régime alimentaire, changement des heures de travail de la mère, etc.) pourraient affecter les horloges périphériques de leurs fœtus respectifs, conduisant à des effets métaboliques à long terme chez la descendance.

## **2. 8 Le système circadien durant la lactation**

L'allaitement maternel est l'une des demandes les plus exigeants en termes d'énergie de tous les états physiologiques de la vie d'une femme adulte. Pendant la lactation, les exigences en nutriments de la glande mammaire dépassent souvent celles du reste du corps (Vernom et al, 2002 ;. Bauman et Currie, 1980; Oftedal, 2000). Les mammifères ont trois stratégies pour répondre aux forts besoins énergétiques de la lactation : une augmentation de l'appétit, une augmentation de l'efficacité métabolique et une utilisation accrue des réserves de nutriments (lipides stockés par exemple). La plupart des mammifères utilisent les trois types de stratégies à différents degrés. Par exemple, des études sur des rongeurs ont montré que les mères se nourrissent d'autant plus que la taille de la portée est grande (2002 Vernom et al.). Cependant, l'augmentation de l'apport alimentaire seul ne peut souvent pas couvrir la demande d'énergie exigée par la production de lait, et les rongeurs pendant la lactation connaissent généralement une période de bilan énergétique négatif (Vernom et al., 2002). Le bilan énergétique négatif des mères allaitantes semble être une stratégie visant à accroître l'efficacité métabolique. Les ajustements à la malnutrition comprennent une diminution du taux du métabolisme basal, en augmentant la thermogénèse du tissu adipeux brun, et en augmentant l'activité anabolique dans le tissu adipeux et le muscle squelettique qui à son tour entraîne une baisse des besoins en éléments nutritifs et de la répartition des nutriments entre les différentes fonctions essentielles. Ces mêmes changements peuvent être observés chez les mères allaitantes et entraîner une augmentation de l'efficacité du métabolisme et une répartition préférentielle des



nutriments vers la glande mammaire pour soutenir la croissance des bébés à travers la production de lait (Vernom et al., 2002).

Des changements dramatiques dans les taux d'hormones de la reproduction et métaboliques se produisent lors de la transition de la grossesse à l'allaitement (Freeman et al., 2000; Kelly et al, 2002;. Neville et Morton, 2001; Tucker et Merkel, 1987; Augustin, et Ladyman Grattan, 2008) ce qui stimule en partie l'adaptation métabolique chez les mères (Speakman 2000; Speakman et McQueenie, 1998; Johnson, Thomson et Speakman, 2001). Des études récentes ont montré des altérations de l'expression des gènes de l'horloge circadienne dans divers tissus au cours de la période périnatale, et cela conduit à l'hypothèse que le système circadien régule également les changements physiologiques qui se produisent chez les mères pour soutenir l'allaitement (Plaut et Casey, 2012; Casey et Plaut, 2012; Casey et al, 2009).

Chez les rongeurs, la phase et l'amplitude de l'expression rythmique des principaux gènes de l'horloge sont différentes pour les glandes mammaires de souris non-gravidés ou allaitantes, ce qui est en faveur d'un rôle de ces gènes dans le développement de la glande mammaire et dans la différenciation (Metz et al., 2006). Des études ont montré que des changements dans les gènes de l'horloge dans divers tissus se sont produits au cours de la transition entre grossesse et lactation (Metz et al, 2006;. Casey et al., 2009). En outre, la progéniture de souris avec un déficit en protéine fonctionnelle Clock (Clock mutant-D19) ne prospère pas, ce qui suggère que la perturbation du rythme circadien affecte la production de lait de la mère, qui peut ne pas être adéquate pour nourrir leurs bébés (Dolatshad et al., 2006).

Chez les humains, 7% des gènes exprimés lors de la lactation dans la fraction lipidique présentent des rythmes circadiens, y compris les niveaux stationnaires des ARNm des gènes de l'horloge et des gènes impliqués dans le métabolisme (Maningat et al., 2009). Le lait maternel a été recueilli dans cette étude toutes les 3 heures pendant une période de 24 heures. Dans les études de l'UMR-1280, la collecte de lait de la mère associé avec le retrait 3 heures plus tard du résidu gastrique de son bébé pourrait permettre l'étude de la transmission de la mère à l'enfant de signaux moléculaires (Floris et al., 2014). Cubero et al (2004) a montré une rythmicité circadienne de la sécrétion de L-tryptophane dans le lait maternel. Basé sur ces résultats et sachant que des études ont montré que les problèmes de l'horloge circadienne peuvent altérer les mécanismes physiologiques de la mère pendant l'allaitement, notre groupe a examiné si la supplémentation avec un bolus tryptophane chez les bébés de la naissance au

sevrage pourrait avoir des conséquences sur leur physiologie circadienne dans la situation de malnutrition en protéines ou en régime normal (Nascimento et al., 2013). Ainsi, le signal circadien serait transmis par une mère au bébé dont la manipulation pourrait permettre une amélioration de la formulation des laits .

## **2.9 Rythmes circadiens et métabolisme énergétique**

Il est de plus en plus clair que les rythmes de 24 h dans plusieurs processus biologiques, y compris le métabolisme, sont médiés non seulement par des facteurs environnementaux (à savoir, extrinsèques), mais aussi endogènes (à savoir, intrinsèques). Le découplage de ces deux facteurs est possible lorsque les conditions environnementales sont maintenues constantes tout au long de la journée (à savoir, un éclairage constant et une disponibilité continue de l'alimentation, en absence de signaux de synchronisation de l'environnement). Dans ces conditions, le comportement (veille / sommeil, alimentation / jeûne), la régulation neuroendocrinienne et les cycles métaboliques persistent chez les humains comme dans les modèles de rongeurs (avec des fréquences légèrement plus longues et plus courtes de 24 heures, respectivement) (Aschoff, 1965; Pittendrigh et Daan 1976).

Les fluctuations dépendantes des moments de la journée, à la fois le système endocrinien et les rythmes métaboliques sont étroitement associées à, et ont donc été classiquement attribués aux fluctuations des comportements quotidiens. Cependant, plusieurs études ont directement contesté une relation obligatoire entre les deux, révélant que, sur 24 heures, les rythmes endocriniens et métaboliques pouvaient être dissociés de ceux du comportement. Par exemple, les fluctuations des taux de cortisol et d'hormone stimulant la thyroïde (TSH) persistent chez l'homme lorsque le sommeil est empêché par application d'une excitation nocturne (van Cauter et al., 1991 Van Cauter et Copinschi 1999; Van Cauter et Spiegel, 1999). Les rythmes de l'épinéphrine et l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1 persistent pendant 24 heures, semblables aux humains soumis à 20 jours ou 28 heures contiguës (appelés désynchronisation forcée ; Scheer et al.; 2010 Scheer, et al 2011 ;. Scheer et Shea 2013; Shea, et al 2011).

En ce qui concerne le métabolisme, les oscillations des niveaux de glucose dans le sang circulant persistent lors d'un protocole de désynchronisation forcée, en notant que les rythmes du métabolisme des glucides ne sont pas simplement secondaires à des changements

dans l'activité physique et / ou à la consommation de nourriture pendant la journée (Scheer, et al., 2009). Collectivement, ces observations suggèrent que des oscillations sur 24 heures des paramètres endocriniens et métaboliques spécifiques ne sont pas seulement régies par des rythmes environnementaux et / ou comportementaux, mais à la place sont médiés (au moins en partie), par des mécanismes endogènes. Le médiateur le plus probable est l'horloge circadienne.

Des études indiquent que certains de ces changements circadiens sont associés au syndrome métabolique, un état pathologique caractérisé par l'obésité, l'hypertension, des taux élevés de triglycérides et une résistance à l'insuline. En particulier, il a été montré que les souris knock-out pour le gène *Clock* développent une obésité et une intolérance au glucose et présentent une consommation alimentaire exagérée qui est associée à une altération dans l'expression circadienne de peptides dans l'hypothalamus, responsables de la régulation du système de récompense alimentaire et du métabolisme énergétique. De même, la mutation du gène négatif *Bmal1* modifie le rythme circadien de la glycémie. Des changements dans le profil circadien de l'activité locomotrice et de l'apport alimentaire ont été décrits dans plusieurs modèles animaux, y compris les rats Zucker obèses (fa / fa). Ces résultats sont similaires aux données épidémiologiques et cliniques chez les humains. Ils indiquent que, d'une part, la désynchronisation de l'horloge circadienne induit des horaires de travail inversés, un jet-lag ou des horaires de repas irréguliers ainsi que l'interruption du cycle veille / sommeil, sont associés à un risque accru de développer un syndrome métabolique et, d'autre part, le rythme circadien de la sécrétion d'insuline et la tolérance au glucose, ainsi que l'expression des gènes circadien d'horloge dans les adipocytes, sont modifiés chez des patients atteints de diabète de type II (Turek et al., 2005).

### **2.9.1 Rythmes circadiens et métabolisme du glucose**

Des oscillations spectaculaires du métabolisme du glucose sont observées dans la journée chez les humains et les rongeurs, tant au niveau systémique qu'au niveau cellulaire au sein des organes. Pendant les périodes d'activités physiques intenses, l'utilisation non-insulinique du glucose augmente; relativement à son utilisation aérobie ou anaérobie en fonction de l'intensité de l'exercice (Alberts et al 2006;. Calvo et al 2008;. Rose et Richter,

2005). De même, la prise d'aliments se traduit par une libération de glucose médiée par l'insuline (Woerle, et al., 2003). Par conséquent, il n'est pas surprenant que la calorimétrie indirecte révèle une augmentation de l'utilisation du glucose au cours de la période de veille (mais pas pour la période de sommeil). Cependant, des études récentes appuient fortement la notion que les rythmes du métabolisme du glucose ne sont pas purement médiés par des changements de comportements.

Une preuve supplémentaire comprend l'observation que les niveaux de glucose dans le sang augmentent avant le réveil chez les humains et les rongeurs, cet événement est connu sous le nom de «phénomène de l'aube métabolique» (Bolli, et al., 1984). De même, les rythmes des niveaux de glucose dans le sang persistent lorsque les rats sont mis à jeun (La Fleur et al., 1999). Collectivement, ces observations révèlent un rôle important d'un mécanisme circadien endogène dans le métabolisme général du glucose. En effet, l'ablation chirurgicale de l'horloge centrale (les noyaux suprachiasmatiques) ou une manipulation génétique des composants de l'horloge circadienne perturbent l'homéostasie du glucose (La Fleur et al 1999; La Fleur, et al., 2001). Dans le cas du phénomène de « l'aube métabolique », plusieurs études suggèrent que le système nerveux de l'axe anatomique- noyaux suprachiasmatiques - noyau paraventriculaire joue un rôle essentiel dans les rythmes quotidiens de la production hépatique de glucose, comme Kalsbeek, et al 2014 l'ont récemment examiné.

L'homéostasie du glucose est obtenue grâce à une régulation coordonnée entre l'entrée exogène (ingestion / digestion / absorption) et endogènes (néoglucogénèse) par rapport à des mécanismes d'élimination du glucose (utilisation). Il est prouvé que l'horloge circadienne des hépatocytes joue un rôle important dans divers processus impliqués dans l'homéostasie du glucose, y compris la néoglucogénèse et les réserves de glycogène. Dans ce dernier cas, les taux de glycogène hépatique montrent une variation diurne chez plusieurs espèces, telles les rats, les souris, les lapins, les cobayes, les oiseaux et les humains, en particulier (Sollberger (1964). Fait intéressant, les rythmes dépendent des heures pendant la journée et des niveaux de glycogène qui persistent chez les rongeurs à jeun (bien que dans une moindre mesure), ce qui suggère que ces rythmes ne sont pas simplement secondaires par rapport aux cycles d'alimentation / jeûne (Shimazu et Ishikawa 1976).

Non seulement les niveaux de glycogène oscillent tout au long de la journée, mais aussi les activités du métabolisme du glycogène dont l'enzyme clé; la glycogène synthase

présente des niveaux maxima pendant la phase d'obscurité (actif) chez les rongeurs, tandis que le pic de la glycogène phosphorylase se situe dans la phase de lumière (sommeil) (Ishikawa et Shimazu 1980;. Peret et al 1976). Ces résultats sur les implications de l'horloge circadienne sur ces oscillations sont corroborés par des études récentes rapportant une diminution des oscillations en glycogène et des niveaux de l'expression de la glycogène synthase chez la souris mutante *Clock*<sup>Δ19</sup> (Doi et al., 2010).

Comme pour le stockage du glycogène, la néoglucogenèse affiche une variation diurne; des taux plus élevés sont observés dans l'étape de la zone de transition entre veille et sommeil (par rapport à la transition de la veille au sommeil), qui est accompagnée par un rythme diurne de l'activité de la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK), une enzyme clé dans la régulation de néoglucogenèse (Kida et al., 1980). En utilisant des hépatocytes de souris spécifiquement invalidés pour le gène *bmal1*, Lamia et al ont trouvé que l'horloge circadienne des hépatocytes joue un rôle dans les rythmes de l'expression de la PEPCK (Lamia, et al., 2008). Récemment, Zhang et al ont rapporté que pour une composante majeure de l'horloge, CRY, la néoglucogenèse hépatique est modulée d'une manière dépendant du temps de la journée, grâce à la régulation de la signalisation  $\beta$ -adrénergique et de la réponse de la protéine CREB à la liaison par l'AMPc (Zhang et al., 2010).

Pourtant la disponibilité du glucose insulino-dépendant et indépendant de l'insuline montrent des variations diurnes chez les humains et les rongeurs (la Fleur et al 2001;. Lee, et al;. 1992 Whichelow, et al, 1974). Les tissus extra-hépatiques, tels que les muscles, contribuent de manière significative à l'homéostasie du glucose. Les variations diurnes de l'utilisation du glucose dans le muscle squelettique et cardiaque persistent *ex vivo*, suggérant que un mécanisme intrinsèque peut contribuer à ces rythmes (Leighton et al, 1988 Young et al, 2001a). Dans le cas du coeur, la modification génétique de l'horloge circadienne des cardiomyocytes abolit les rythmes cardiaques de la glycolyse, de l'oxydation du glucose et de la synthèse du glycogène et des protéines OGIcNAcylation (un marqueur indirect du flux à travers la voie de biosynthèse des hexosamines) (Durgan al., 2011), d'une manière qui dépend des moments de la journée. Plus récemment, Dyar et al ont rapporté une diminution de l'absorption du glucose dans le muscle soléaire et le diaphragme et l'oxydation dans les myocytes de rats avec l'ablation génétique de *bmal1*, concomitante avec la dérégulation de la pyruvate déshydrogénase (Dyar, et al., 2014). Collectivement, ces observations suggèrent que

les horloges circadiennes dans les myocytes cardiaques et squelettiques influent considérablement sur l'utilisation du glucose.

La régulation de l'homéostasie du glucose médiée par l'horloge circadienne implique également la régulation temporelle de la libération et de la sensibilité à des facteurs endocriniens. L'insuline et le glucagon jouent un rôle important dans le maintien de l'homéostasie du glucose dans le sang (Voet, 2004). Des études *in vitro* ont démontré que la sécrétion d'insuline des îlots pancréatiques isolés présentait un rythme circadien qui provient de l'îlot (Peschke et Peschke 1998). En outre, les concentrations d'insuline dans le plasma des rats présentent des fluctuations quotidiennes avec des incréments distinctes pour chaque repas (Kalsbeek et Strubbe 1998). Les études montrent également que les changements dans l'horloge circadienne provoquent une perte de la sécrétion d'insuline et par conséquent, une hypoinsulinémie (Coomans, et al.; 2013 MarcheVa, et al., 2010).

En utilisant des récepteurs de la mélatonine chez une souris génétiquement invalidée pour développer un modèle animal avec une horloge circadienne dérégulée, Muhlbauer et al ont montré que les rythmes circadiens de transcriptions de l'insuline et le taux d'insuline dans le plasma étaient altérés (Muhlbauer et al., 2009). La sensibilité à l'insuline souligne également une dépendance temporelle pendant la journée, ce qui semble être lié à l'horloge circadienne. Par exemple, la tolérance au glucose et à l'insuline sont altérées chez les souris ayant subi l'ablation des noyaux suprachiasmatiques, chez les souris mutantes *Clock* $\Delta$ 19 et chez des souris génétiquement invalidées pour un gène de l'horloge (*bmal1* la Fleur et al 2001; Rudic et al, 2004). En outre, la signalisation de l'insuline est altérée dans divers tissus isolés de l'ablation de la lignée germinale de souris invalidées pour *bmal1*, mutantes pour *PER2* et sur des cardiomyocytes isolés de souris mutantes spécifique pour *Clock* $\Delta$ 19 (Anea, et al.; 2009 Carvas, et al 2012; . Durgan et al 2010).

En plus de l'insuline, le glucagon joue également un rôle crucial dans la régulation de l'homéostasie du glucose dans le sang. De même, le glucagon présente également des modes de libération quotidienne (Gagliardino, et al.; 1978 Tasaka et al 1980). Une étude a démontré que les concentrations de glucagon plasmatique pendant 24 heures sont régulées par l'alimentation et l'horloge circadienne (Ruiter et al., 2003). Dans ce contexte Bahr et al suggèrent que la mélatonine (importante dans la synchronisation des rythmes circadiens) influence l'expression du glucagon pancréatique, ainsi que l'action périphérique du glucagon (Bahr et al., 2011). Lorsqu'elles sont prises ensemble, ces observations soulèvent la possibilité

que des rythmes circadiens cellulaires autonomes des horloges contribuent à la régulation de l'homéostasie du glucose par la libération et / ou la sensibilité à des facteurs endocriniens (par exemple, l'insuline et glucagon).

### **2.9.2 Influence de l'alimentation sur la régulation circadienne du métabolisme**

En fait, les relations entre l'horloge circadienne et le métabolisme ne sont pas unidirectionnelles. En dépit de la synchronisation par la lumière, l'activité de l'horloge peut être ajustée par les schémas et la qualité de la prise de nourriture (figure 4). Lorsque des animaux nocturnes tels que les rats et les souris ont accès à une alimentation uniquement pendant la phase de lumière du cycle lumière / obscurité, les changements dans le profil circadien de l'expression de gènes de l'horloge se produisent dans le foie et d'autres tissus périphériques, mais pas dans les noyaux suprachiasmatiques. En revanche, lorsque les animaux ne reçoivent que de 50 à 60% de leur ration alimentaire quotidienne, une fois par jour durant le cycle de lumière, le rythme circadien de l'horloge centrale est également affectée (Challet et al., 1997; Mendoza et al., 2005; Mendoza, Pévet e Challet, 2007). En outre, la consommation d'un régime alimentaire riche en lipides modifie le rythme de l'horloge circadienne chez le rat (Kohsaka et al., 2007).

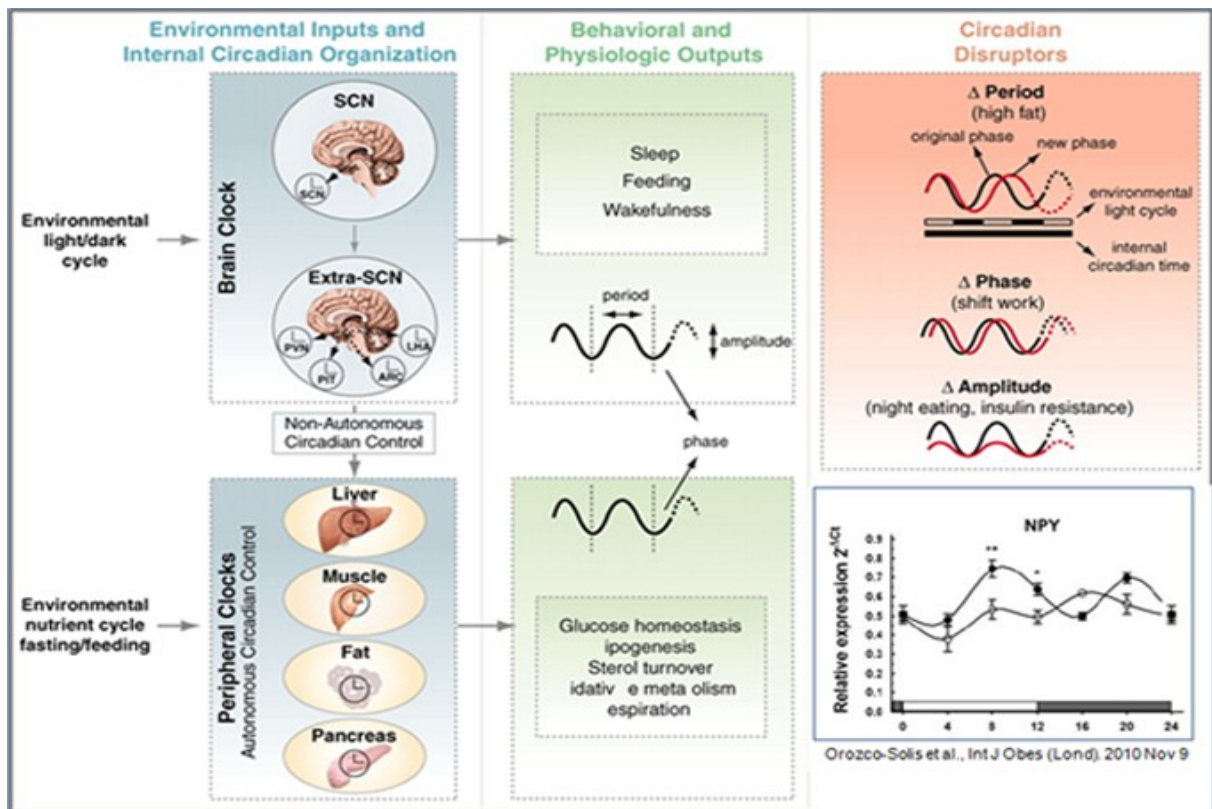


Figure 4. De part sa capacité à synchroniser son activité en réponse à un signal, tel une transition lumineuse ou une prise de nourriture, qui agissent comme des signaux "entrant" ; l'horloge circadienne coordonne les activités métaboliques d'un individu en contrôlant l'expression cyclique d'un grand nombre de gènes, qui forment des signaux "sortant". Des altérations dans le rythme des gènes horloge sont associées à l'apparition du syndrome métabolique. Les résultats de nos laboratoires présentés dans la figure en bas à droite montrent que la restriction protéique périnatale modifie le profil d'expression circadien du neuropeptide Y, un gène impliqué dans la régulation de la prise alimentaire et du métabolisme (Adapté de Bass et Takahashi, Science 330: 1349-1354, 2,010 et de Orozco-Solis et al., 2010).

Les principales régions de l'hypothalamus de mammifères impliqués dans la régulation de la prise alimentaire comprennent l'hypothalamus latéral et le noyau ventromédian, le premier étant associé à la faim et le second à la satiété (Wynne et al., 2005; Funahashi et al, 2003 ). En outre, les neurones dans d'autres régions de l'hypothalamus, y compris le dorsomédial, les noyaux arqués et paraventriculaires, sécrètent des peptides qui sont impliqués dans la faim et la satiété. Ces neuropeptides peuvent stimuler l'appétit, comme le neuropeptide Y et la protéine liée au gène agouti, tandis que d'autres, y compris les transcriptions régulées par l'amphétamine et la cocaïne, et la proopiomélanocortine et ses dérivés (par exemple, l'hormone de stimulation des mélanocytes, mélanocortine) , se traduisent par une diminution de l'appétit (Funahashi et al 2003;.. Valassi et al, 2008).



Les profils de gènes et l'expression des protéines de ces neuropeptides présentent un rythme circadien dans le cerveau de rongeurs (Lu et al, 2002 ;. Stutz et al, 2007; .. Xu et al, 1999) et peuvent donc influencer les signaux qui affectent la rythmicité circadienne de l'appétit. Dans une étude, il a été montré que l'augmentation de la prise alimentaire chez les rats au début du cycle sombre est réduite chez les animaux dépourvus de neuropeptide Y (Sindelar et al., 2005). Cette étude a également montré que les mécanismes impliqués dans l'augmentation de la prise alimentaire causée par la privation de nourriture sont distincts de ceux qui sont impliqués dans la réponse lors de la première période de l'obscurité du cycle lumière-obscurité. Les rythmes circadiens des gènes de l'horloge et des protéines ont été étudiés dans ces régions du cerveau chez le rat par immunohistochimie (Feillet et al, 2008; .. Wyse et al, 2010), ou par hybridation *in situ* (Asal et al., 2001) ou en surveillant l'expression de la luciférase régulée par des gènes promoteurs d'horloge (Abe et al, 2002 ;. Kriegsfeld et al 2003;.. Guilding et al, 2009). Actuellement, il est difficile de distinguer la rythmicité circadienne autonome dans ces régions du cerveau à l'extérieur des noyaux suprachiasmatiques de l'hypothalamus de celles imposées par ces mêmes noyaux. On peut donc supposer que les rythmes circadiens de ces peptides dépendent des noyaux suprachiasmatiques. Cependant, un couplage différentiel des horloges supplémentaires du SCN avec leurs homologues du SCN en raison des multiples effets zeitgeber peut entraîner des changements dans la phase, l'amplitude et dans la cinétique de réajustement de la phase sur leurs oscillations, permettant ainsi la plasticité des systèmes de l'horloge circadienne à intégrer un large éventail d'informations temporelles.

Les rythmes circadiens des neuropeptides impliqués dans la régulation de l'appétit peuvent expliquer la prise de trois repas par jour chez l'homme. Ce modèle d'alimentation a été observé chez des individus isolés des signaux temporels externes, tels que le temps de transition jour-nuit et jour (Aschoff et al., 1996). Des heures régulières pour les repas aident à maintenir une structure temporelle interne stable du système de l'horloge circadienne. L'abandon de modèles alimentaires réguliers en raison des exigences des sociétés contemporaines peuvent désorganiser les processus nutritionnels et métaboliques avec des retentissements profonds sur la santé et le bien-être à long terme (Fonken et al, 2010;.. Lowden et al ., 2010; Morikawa et al, 2007).

L'état métabolique d'un individu est également transmis de façon dépendante des cycles circadiens par des signaux hormonaux en provenance des tissus périphériques et ciblant les régions du cerveau qui contrôlent l'appétit (Kalra et al., 2003). La leptine, une hormone qui supprime l'appétit, est principalement produite dans les adipocytes et sécrétée sur un mode circadien (Lecoultre, Ravussin & Redman 2011 ; Wong et al, 2004). Il a donc été suggéré que cette hormone était sous le contrôle de l'horloge centrale à travers sa libération sympathique par les adipocytes (Kalsbeek et al., 2001). Chez les humains, les niveaux plasmatiques de leptine sont élevés au cours de la nuit, quand l'appétit diminue, favorisant le jeûne et le repos nocturne, et bas pendant la journée, quand la faim augmente. Chez les individus obèses, les niveaux de jour et de nuit de la leptine sont beaucoup plus élevés par rapport à des sujets sains maigres, indiquant un état de résistance à la leptine (Yildiz et al., 2004). Cependant, le rythme diurne de leptine circulante est maintenu. La leptine est également exprimée à l'extérieur du tissu adipeux, tels que dans l'estomac (Cinti et al., 2000; Bado et al., 1998). Les niveaux de leptine gastriques fluctuent de façon circadienne, étant élevé au cours de la nuit, mais faible au cours de la journée (Cinti et al., 2001). Cela suggère que la leptine gastrique est impliqué dans la régulation de l'appétit, induisant la satiété.

Une autre hormone qui contribue à l'action de la leptine sur l'appétit est la ghréline. La ghréline est produite dans l'estomac et dans d'autres tissus, y compris l'hypothalamus et le pancréas (Kojima et Kangawa, 2002; Cowley et al., 2003). La ghréline stimule l'appétit par son action sur le neuropeptide Y dans l'hypothalamus latéral. (Chen et al., 2004 ; Hagemann et al, 2003) et peut également modifier la fonction de l'horloge dans les noyaux suprachiasmatiques *in vitro* (Yi et al, 2008; Yannielli et al, 2007). La ghréline oscille avec l'alimentation (Cummings et al., 2001), ce qui en fait un peptide candidat pour la régulation des signaux associés à l'alimentation. En outre, des niveaux élevés de ghréline ont été trouvés au cours de la première partie de la nuit chez l'homme, avec une diminution le matin avant l'éveil (Cummings et al., 2001). La privation de sommeil peut augmenter les niveaux de ghréline circulante, ce qui s'accompagne d'une sensation de faim élevée (Schmid et al., 2008). Ainsi, la ghréline pourrait être impliquée dans une connexion croisée entre les signaux des horloges centrale et périphériques. Cependant, les taux circulants de ghréline sont plus faibles chez les sujets obèses (Tschop et al., 2001), alors que chez les patients anorexiques, les niveaux de ghréline dans l'état de jeûne sont significativement plus élevés que chez les témoins (Otto et al., 2001 ). La relation temporelle entre la ghréline et la leptine indique que,

malgré l'augmentation des niveaux de ghréline sérique lors de la première partie de la nuit, le rythme diurne de la ghréline est vraiment apparié avec les taux circulants de leptine. Ainsi, l'élévation nocturne des niveaux de ghréline en circulation peut compenser l'effet coupe-faim produit en augmentant la leptinémie. Curieusement, cette relation temporelle est évidente chez les rongeurs et les êtres humains, dont les habitudes alimentaires sont complètement différents (Cummings et al., 2001 ; Sanchez et al, 2004).

Parallèlement aux variations circadiennes dans les niveaux de neuropeptides et des signaux humoraux de tissus périphériques, il existe également un rythme circadien dans la sélection des macronutriments. Chez la plupart des mammifères, l'heure du jour peut influencer sur le choix et la quantité des éléments nutritifs qui sont consommés. Il a été montré que chez les souris au début de leur phase d'activités nocturnes, lorsque leurs réserves de glycogène sont faibles, une préférence pour les hydrates de carbone augmente avec une croissance en parallèle du niveau des neuropeptides Y dans le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus (Tempel & Leibowitz, 1989 ; Leibowitz, 1992). À la fin de la phase d'activité et en début de matinée, les préférences alimentaires évoluent en faveur du gras par rapport aux protéines et aux glucides, qui libèrent de l'énergie plus lentement au cours de la phase de repos (Lax et al., 1998).

De même chez les humains, une alimentation riche en glucides est favorisée pendant le petit déjeuner et les régimes riches en graisses sont préférés pour les repas du soir (Westerterp-Plantenga, Ijedema & Wijckmans-Duijsens, 1996). Les glucides sont mieux métabolisés pendant le petit déjeuner parce que le corps est métaboliquement prêt à répondre à un stimulus de glucose (Dos Santos et al., 2006). Par conséquent, il est recommandé d'ingérer une quantité suffisante d'énergie qui permettra à l'individu de devenir plus alerte et ainsi de briser la léthargie au réveil. D'autre part, les niveaux de glucose dans la circulation sont plus bas pendant le sommeil, lorsque le transit gastro-intestinal diminue, de sorte qu'il serait logique de penser que le repas du soir ne doit pas contenir trop de glucides. Cependant, il reste mal élucidé si la distribution des macronutriments dans la journée est associée à l'obésité.

Les changements temporels de l'alimentation des rongeurs nocturnes peuvent modifier l'expression rythmique des gènes de l'horloge circadienne dans le tractus gastro-intestinal, dans le foie et le pancréas, sans changer le rythme de l'horloge centrale exprimé au sein des noyaux suprachiasmatiques (Hoogerwerf et al, 2007 ; Stephan 2002 ). Donc, la nourriture est

un Zeitgeber (Donneur de temps) très puissant pour les horloges périphériques. Si les rongeurs ont accès à la nourriture seulement durant la période de lumière quand ils dorment normalement, ils vont s'adapter à ce programme d'alimentation en quelques jours en développant une activité anticipée de recherche de nourriture, une augmentation de l'activité des enzymes digestives, de la motilité gastro-intestinale, et de la température corporelle, quelques heures avant que la nourriture ne devienne disponible (Stephan, 2002; Comperatore & Stephan, 1987). En outre, les rythmes d'expression des gènes de l'horloge dans ces organes se déplacent pour se réaligner avec le nouveau programme d'alimentation (Schibler, Ripperger & Brown, 2003; Stokkan et al, 2001). Ces activités circadiennes sont normalement régies par l'horloge centrale dans les noyaux suprachiasmatiques. Ainsi, il apparaît que l'expression des gènes de l'horloge dans ces organes sont intimement impliqués dans l'alimentation, et dans des changements dans la durée et l'heure de l'alimentation. Toutefois, lorsque les animaux retrouvent l'accès à la nourriture au cours de la période sombre, l'horloge centrale, dont les rythmes sont restés affectés par les changements dans les horaires d'alimentation, tend à reprendre le contrôle sur la régulation des horloges périphériques.

Il est encore difficile de savoir quels signaux associés à la nourriture provoquent un changement dans l'expression des gènes de l'horloge dans les tissus périphériques. La nutrition parentérale totale qui contourne le tractus gastro-intestinal, change le pic d'expression des gènes de l'horloge dans le foie au cours de la période de lumière chez les rats (Miki et al., 2003). Ceci suggère que les facteurs directement liés à l'alimentation, tels que le goût des aliments, la distension de l'estomac, ou le contact physique direct avec la muqueuse gastro-intestinale de la nourriture, ne sont pas impliqués dans la régulation de l'horloge circadienne. En effet, la disponibilité des nutriments au niveau cellulaire a la plus grande influence sur les changements moléculaires dans l'horloge du système périphérique. En outre, d'autres auteurs ont suggéré que la saveur et la valeur nutritive de l'alimentation jouaient un rôle dans la régulation de l'activité anticipée de recherche de la nourriture (Mistlberger et al, 1987; Hsu et al., 2010).

Il reste un point de discordance, à savoir si l'activité d'anticipation de recherche de la nourriture nécessiterait un oscillateur entraîné par l'alimentation, car il est peu probable que l'horloge dans les noyaux suprachiasmatiques soit responsable des changements dans l'expression des gènes des horloges périphériques en réponse à des calendriers d'alimentation

(Storch & Weitz, 2009). Chez les rats ayant des noyaux suprachiasmatiques lésés, l'activité anticipée de recherche de nourriture est encore évidente (Stephan, 1989). Alors la question demeure sur l'existence d'un deuxième système circadien neuronal qui puisse être modifié par programmation nutritionnelle et, si il aurait une influence sur les rythmes circadiens dans les tissus périphériques. L'emplacement exact de cet oscillateur hypothétique reste inconnu. Initialement, on le situait dans le tractus gastro-intestinal, mais des études récentes ont suggéré que des composants moins importants pour cet oscillateur, selon le calendrier alimentaire sont situés dans le noyau hypothalamique dorsomédial (Mieda et al, 2006 ;. Gooley, Schomer & Saper CB 2006) . L'ablation du noyau a abouti à l'abolition de l'activité d'anticipation et à une hausse "pré-repas» de la température corporelle (Gooley, Schomer & Saper CB, 2006). Cependant, il peut être soutenu que l'horloge centrale peut également synchroniser les horloges dans les tissus périphériques indirectement par l'intermédiaire de son influence sur les cycles de repos-activité, qui à son tour déclenchent des réponses humorales, résultant des rythmes alimentaires.

D'un point de vue adaptatif, l'activité anticipée de recherche de nourriture permet à l'organisme d'activer l'excitation, de l'appétit, du métabolisme et des sécrétions digestives juste avant de recevoir la nourriture, ce qui lui permet d'avoir l'avantage de l'anticipation sur la disponibilité de la nourriture. Ainsi, lorsque la nourriture est abondante, l'oscillateur dépendant de la lumière situé dans les noyaux suprachiasmatiques devient responsable de l'entraînement des rythmes circadiens, mais quand la nourriture est rare, ou indisponible à certains moments, l'oscillateur dépendant de l'alimentation, entraîne un sous-ensemble de rythmes, améliorant ainsi l'accès à la nourriture, sans interférer avec d'autres processus rythmiques qui continuent à être contrôlé par les noyaux suprachiasmatiques (Stephan, 2002; Fuller, Lu & Saper, 2008).

### **2.9.3 Malnutrition et rythmes circadiens**

Il est clair que le système de l'horloge circadienne est profondément influencé par l'apport en nutriments. Il n'est donc pas surprenant que les régimes excessifs ou déséquilibrés puissent avoir des effets néfastes sur l'orchestration des gènes de l'horloge dans le noyau de la cellule et des conséquences sur la transcription. Une étude récente sur des rats a montré que l'expression rythmique du gène Rev-erb alpha de l'horloge reliant les rythmes circadiens et le

métabolisme dans les tissus périphériques, est interrompu dans les cellules  $\beta$  pancréatiques en réponse à un régime alimentaire riche en matières grasses (Vieira et al., 2012) . En outre, le motif rythmique altère la la sécrétion d'insuline, ce qui suggère que Rev-erba jouerait un rôle important dans l'adaptation des cellules  $\beta$  aux stimuli nutritionnels. Ainsi, la plasticité du système de l'horloge circadienne semble devenir un procédé inadapté lorsque l'organisme est exposé à un régime obésogène.

Dans une autre étude chez les rats, l'exposition à une forte teneur en graisses a entraîné à long terme, une horloge circadienne anormale, avec des profils d'expression de gènes de l'horloge modifiés dans certains tissus périphériques tels que le foie (Hsieh et al., 2010). Des observations similaires ont été faites dans le tissu adipeux et l'hypothalamus, où la nutrition avec un contenu riche en graisses non seulement induit des changements moléculaires dans le système de l'horloge, mais a aussi changé des rythmes comportementaux (Kohsaka et al., 2007). Collectivement, ces données impliquent que les régimes peuvent provoquer un déséquilibre dans les deux composants moléculaires que sont les l'horloges centrale et périphérique.

Comme bon nombre des gènes contrôlés par l'horloge circadienne ont des liens directs avec le métabolisme, les troubles induits par un régime alimentaire sur tel ou tel gène horloge peuvent directement conduire à une altération du métabolisme et à un risque accru de maladie métabolique. Cette notion est soutenue par des études chez le rat dans laquelle l'inactivation du gène *Bmal1* a abouti à des troubles métaboliques comme l'obésité, la stéatose hépatique, l'hyperinsulinémie, l'hyperglycémie, l'hyperlipidémie et l'hyperleptinémie (Fukagawa et al, 1992 ;. Mistlberger, Lukman et Nadeau, 1998; Kuriyama et al., 2004; Kudo et al, 2004 ; Sunnan et Turek, 2014).; ces pathologies qui ont une ressemblance frappante avec le syndrome métabolique humain. L'augmentation spectaculaire de la prévalence du syndrome métabolique ces derniers temps, rend nécessaire la compréhension des mécanismes pathologiques. Par conséquent, le système de l'horloge circadienne est en train d'émerger comme un mécanisme hypothétique liant les régimes alimentaires à la susceptibilité à une maladie métabolique.

## 2.10 Syndrome métabolique

### 2.10.1 Concepts

En 1923, lorsque le médecin suédois Eskil Kylin associa l'hypertension et l'hyperglycémie, ce fut la première description du syndrome métabolique (Kylin 1923). Des années plus tard, un résumé présenté à la réunion annuelle de l'Association européenne d'études sur le diabète, a décrit le syndrome métabolique comme un ensemble de caractéristiques cliniques impliquant l'hypertension artérielle, l'hyperglycémie et l'obésité (Avogaro et Crepaldi 1965). C'est seulement en 1988, qu'il y a eu des progrès significatifs dans l'étude du syndrome métabolique. A cette époque, les chercheurs ont réuni un groupe de facteurs de risque pour le diabète et les maladies cardiovasculaires sous le terme de "syndrome X" (Reaven 1988). Quelques années plus tard, la combinaison de l'obésité, de l'intolérance au glucose et de l'hypertension / hypertriglycémie a été nommée «syndrome de résistance à l'insuline» (Haffner, Valdez et al, 1992;. Zimmet 1992).

**Tableau 1. Critères permettant de définir le Syndrome Métabolique selon diverses organisations**

Organisation	Signes cliniques				
	Résistance à l'Insuline	Poids corporel	Pression artérielle	Glucose	Autres
<b>WHO</b>	Pertes de TG, glycémie à jeun, DM type2 plus de 2 signes cliniques	M: >0.90 F: >0.85 (a) ou IMC>30Kg/m <sup>2</sup>	≥140/90mmHg	Perte de glucose à jeun ou DM type 2	Créatinine>30mg/g
<b>NCEP ATPIII</b>	----	PC≥102cm (H) ou ≥80cm (M)	≥135/85mmHg	>110mg/dL (incluant DM)	----
<b>AACE</b>	Pertes de TG , glycémie à jeun, 1 signe clinique	IMC≥25Kg/m <sup>2</sup>	≥130/85mmHg	Perte de TG ou de glucose à jeun (n'incluant pas DM)	Autres signes de résistance à l'insuline
<b>FDI</b>	----	↑ PC plus de 2 signes cliniques	≥130/85mmHg ou hypertension avec traitement	≥100mg/dL (incluant DM)	----

a): rapport taille-hanche. Acronymes: OMS - Organisation mondiale de la Santé; NCEP ATPIII - National Cholesterol Education Programme Adult Treatment Panel III; AACE - Association américaine des endocrinologues cliniques; FDI - Fédération internationale du diabète; TG - tolérance au glucose; DM - Diabète; IMC - indice de masse corporelle; PC - Le poids corporel; M -Male; F – Female (Wilson, D'Agostino et al 2005;. Kaur, 2014 ; Alberti et Zimmet 1998 ; Cleeman 2001 ; Einhorn, Reaven et al., 2003 ; FID, 2006 ; Grundy, Brewer et al., 2004)

Actuellement, le terme «syndrome métabolique» est utilisé pour l'ensemble des facteurs métaboliques, cliniques, biochimiques et physiologiques interconnectés qui augmentent le risque de maladie cardiovasculaire, l'athérosclérose et le diabète de type 2 (Wilson, D'Agostino et al 2005;. Kaur 2014). Les critères de sélection des paramètres pour définir le syndrome métabolique sont variés selon les diverses organisations telles que l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) (Alberti et Zimmet 1998), National Cholesterol Education Programme Adult Treatment Panel III (NCEP ATP III) (Cleeman 2001), Association américaine des endocrinologues cliniques (AACE) (Einhorn, Reaven et al., 2003), et la Fédération internationale du diabète (FID, 2006) (Tableau 1).

L'Organisation mondiale de la santé (WHO 1999) dit que le syndrome métabolique se caractérise par l'apparition d'une intolérance au glucose ou par un diabète sucré et / ou par une résistance à l'insuline. Selon la National Cholesterol Education Programme Adulte Treatment



Panel (NCEP ATPIII), la résistance à l'insuline n'est pas nécessaire pour un tel diagnostic (Grundy, Brewer et al., 2004). Toutefois, également en conformité avec le NCEP ATPIII, lorsque les individus présentent au moins trois des six critères énumérés dans le tableau 1, le diagnostic du syndrome métabolique peut être posé. L'altération de la tolérance au glucose est l'un des critères pour le diagnostic de ce syndrome, selon l'Association américaine d'endocrinologie clinique (AACE). Enfin, selon la nouvelle définition de la FDI, pour qu'une personne puisse être définie comme ayant ce syndrome, elle doit présenter principalement une obésité centrale. Il est à noter que chaque organisation juste au-dessus constituera le diagnostic précis du syndrome métabolique si la personne a au moins deux ou plusieurs des symptômes énumérés dans le tableau 1.

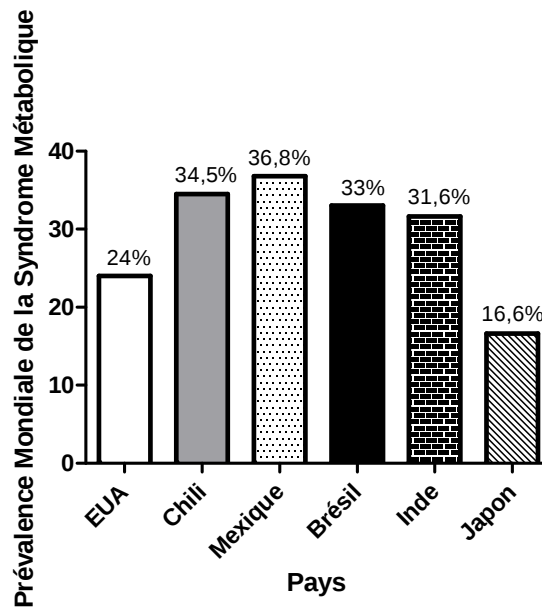
Les variations de l'environnement nutritionnel dans les périodes précoces de la vie ont été associées au développement du syndrome métabolique chez l'adulte (Bertram et Hanson, 2001). La dénutrition périnatale favorise l'hyperinsulinémie liée au jeûne, l'hyperleptinémie, l'hyperphagie, l'obésité centrale (Vickers, Breier et al 2000 ; Vickers Breier et al., 2003)? et la réduction de la masse musculaire à l'âge adulte (Vickers, Krechowec et al., 2003a)?. L'augmentation de la consommation alimentaire est associée à l'apparition tardive de la satiété (Orozco Solis et al., 2009), à une réduction de l'action inhibitrice de la sérotonine sur la consommation alimentaire (Lopes de Souza et al., 2008), à des changements dans l'expression des gènes impliqués dans la signalisation de l'insuline et des capteurs de nutriments dans l'hypothalamus (Orozco-Solis, Matos et al., 2010a). Aussi des changements ont été observés dans l'expression circadienne hypothalamique des gènes impliqués dans le contrôle de la prise alimentaire, dans la malnutrition des organes durant la période périnatale (Orozco-Solis, Matos et al., 2010b). La malnutrition périnatale favorise l'augmentation de l'expression des peptides orexigènes, du neuropeptide Y (NPY) et du gène de protéine apparentée à agouti (AGRP) et à la réduction anorexigène, la proopiomélanocortine (POMC) et la transcription liés à la cocaïne et à l'amphétamine (CART) dans l'hypothalamus de rats adultes (Orozco-Solis, Lopes de Souza et al, 2009 ; Orozco-Solis, Matos et al, 2010a).

La résistance à l'insuline à l'âge adulte, dans un corps qui a été sous-alimenté durant la période périnatale, peut conférer des avantages durant la nutrition postnatale mais cela reste faible. Ces réponses adaptatives du corps peuvent réduire la consommation d'énergie, favorisant ainsi la survie (Hales et Barker 1992). D'autre part, lorsque les conditions

alimentaires changent, ces réponses prédictives peuvent prédisposer les individus au développement du syndrome métabolique, révélant des réponses métaboliques inadaptées (Hales et Barker 1992). Ce phénotype de survie est un exemple pour l'appellation proposée "réponse adaptative prédictive» (PAR). Cela peut être défini comme l'ensemble des réponses à des stimuli environnementaux qui donne de futurs avantages adaptatifs (Gluckman et Hanson, 2004). Il est à noter que ces changements dans les traits phénotypiques deviennent permanents, ce qui augmente la survie et le succès reproducteur de l'espèce (Wets-Eberhard 2003).

### **2.10.2 Panorama épidémiologique des pays développés et en développement**

La prévalence mondiale du syndrome métabolique varie en fonction de la région, de la population étudiée et des définitions attribuées au syndrome métabolique par les organisations citées (OMS, NCEP ATP III, AACE, IDF). Aux États-Unis, par exemple, selon l'Enquête nationale sur la santé et la nutrition, 24% des adultes présentaient des facteurs de risque de développer un syndrome métabolique. En revanche, au Mexique la prévalence monte à 36,8% (Ford, Giles et al, 2002; .. Villalpando, Shamah-Levy et al 2010). Au Chili, selon des critères de NCEP ATPIII et la FID, la prévalence du syndrome métabolique chez les hommes était de 37% (Valenzuela, Maiz et al., 2010). Au Brésil, il a été observé une prévalence du syndrome métabolique de 33% (Rodrigues, Baldo et al., 2010). Le NCEP ATPIII a montré que la prévalence dans la population urbaine de l'Inde était de 31,6% (Gupta, Deedwania et al., 2004). Ces chiffres sont inférieurs au Japon, où seulement 20,9% des hommes et 12,3% chez les femmes sont affectées par le syndrome métabolique (Uemura, Katsuura-Kamano et al. 2014) (Figure 5).



**Figure 5. Prévalence du Syndrome Métabolique dans les pays développés et en développement.** (Ford, Giles et al, 2002; .. Villalpando, Shamah-Levy et al 2010 ; Valenzuela, Maiz et al., 2010 ; Rodrigues, Baldo et al., 2010 ; Gupta, Deedwania et al., 2004 ; Uemura, Katsuura-Kamano et al. 2014)

Comme indiqué précédemment, les individus qui ont été soumis à un environnement pauvre en nutriments pendant la vie fœtale et postnatale précoce et, dans leur vie ultérieure, qui ont été exposés à une source d'énergie importante, sont susceptibles de développer une résistance à l'insuline et à l'hyperglycémie, ces deux paramètres signent les facteurs de risque pour l'apparition du syndrome métabolique et le diabète sucré de type 2. Ainsi, le modèle de la réponse adaptative prédictive, proposé par Gluckamn et collaborateurs, ne peut justifier l'émergence accrue du syndrome métabolique dans les pays qui sont en industrialisation rapide (Gluckman et Hanson 2004a; Gluckman, Hanson et al 2005).

### 2.10.3 Obésité

L'obésité est considérée comme la cinquième cause de décès dans le monde selon l'OMS. La plus forte prévalence de surpoids et d'obésité pour les deux sexes, sont concentrés dans les pays développés, bien que dans ceux en voie de développement, il existe déjà des taux élevés (WHO 2012). On estime qu'en 2030, pour le monde entier, environ 700 millions

de personnes seront diagnostiquées « obèse » (Shaw, Sicree et al., 2010). Actuellement, nous observons une augmentation considérable dans la fourniture et la consommation d'aliments transformés, riches en graisses et en sucres simples et à faible contenu nutritionnel concomitant avec une diminution de l'activité physique. Cette combinaison de facteurs augmente la prévalence du surpoids ou de l'obésité à un âge de plus en plus précoce. Cette augmentation est également associée à une incidence élevée de co-morbidités telles que la résistance à l'insuline, le diabète de type 2 et le syndrome métabolique (Greenberg et Obin 2006). Selon l'OMS (WHO 1996), L'obésité est définie comme une accumulation anormale ou excessive de tissus adipeux, ce qui affecte ensuite la santé. Considérée comme maladie multifactorielle, en plus de l'inactivité physique et de la mauvaise alimentation (Han, Lawlor et al., 2010). D'autres facteurs contribuent au développement de l'obésité, tels que les facteurs génétiques (O'RAHILLY et Farooqi, 2006) et à travers l'environnement périnatale (enfants nés de mères atteintes de diabète gestationnel, faible poids de naissance, la fluctuation de poids au début de la vie) (Taylor, Grant et al 2005 ;. Ong et Loos 2006; Lawlor, Fraser et al 2010).

Les stress ou les stimuli inadéquats subis au cours de la période critique du développement (période périnatale), provoquent des changements permanents dans le développement de plusieurs tissus et organes, conduisant à des changements morphologiques et physiologiques irréversibles pour notre organisme (Barker et Bull al 1990 ;. Hales et Barker 1992). Ainsi, la malnutrition maternelle entraîne des changements dans le métabolisme du fœtus. Pour corroborer ces informations, des études expérimentales ont montré que la restriction calorique au cours de la grossesse favorise l'obésité chez des rats après sevrage, ainsi que l'hyperphagie et l'accumulation de tissu adipeux de ces animaux (Vickers, Breier et al., 2000). Des études expérimentales ont montré que la fourniture de l'alimentation à faible teneur en protéines pour les rats à l'allaitement maternel, favorise un retard de croissance de la progéniture. Ces manipulations visant à réduire la disponibilité des nutriments aux ratons nouveaux nés pour une réduction permanente de l'appétit et du poids corporel (Cripps, Gronert-Martin et al., 2009), Plus tard, il peut se développer une hyperphagie, une hyperleptinémie, une hyperinsulinémie et une augmentation des dépôts de graisse (Plagemann, Harder, et al., 1999).

Au cours de nos investigations, afin de déterminer les effets de la nutrition dans les premières périodes de la vie de la fonction cérébrale chez les adultes, nous avons constaté que

les petits nés et allaités par des mères qui ont été soumises à un régime faible en protéines après le sevrage, ont montré une augmentation de l'apport alimentaire (hyperphagie) et ont développé à l'âge adulte, les caractéristiques métaboliques de l'obésité y compris l'augmentation de la graisse abdominale, et de la teneur en triglycérides et des acides gras libres élevés dans le sang (Lopes de Souza et al., 2008 ; Orozco-Solis et al., 2009).

Ces anomalies sont associées à un profil altéré de l'apport alimentaire quotidien ainsi que de l'abolition du profil d'expression circadien des gènes de l'horloge et des gènes impliqués dans la régulation de la prise alimentaire et de la dépense énergétique dans l'hypothalamus et le foie (Orozco-Solis et al., 2010b). Par conséquent, la malnutrition périnatale peut être le principal facteur de risque pour le développement du syndrome métabolique. Des études épidémiologiques chez l'homme et de nombreux animaux avec des études expérimentales ont montré que les individus exposés à une carence nutritionnelle pendant le développement périnatal ont, à l'âge adulte, plus de problèmes d'obésité, de diabète de type II et de maladies cardiovasculaires, comparativement à ceux qui sont exposés au même âge à une alimentation équilibrée pendant leur développement intra-utérin et néonatal (Hales e Barker, 2001).

#### **2.10.4 Preuves épidémiologiques**

A partir de constatations épidémiologiques, la corrélation de certains facteurs environnementaux dans la première période de la vie et l'émergence d'un modèle particulier de la santé et de la maladie a été faite à l'âge adulte (Silveira, Portella et al., 2007). Ces données épidémiologiques indiquent que les enfants ayant un faible poids de naissance ont un risque accru pour le développement de l'obésité, le diabète et les maladies cardiovasculaires (Barker, Eriksson et al, 2002;. Gluckman et Hanson 2004). Récemment, il est devenu évident que non seulement la malnutrition, mais, surtout, le surpoids pendant les premières périodes de la vie favorisent également le développement du syndrome métabolique à l'âge adulte, avec des conséquences morphologiques et et dans une moindre mesure, fonctionnelles (Mühlhäusler, 2007).

Ces observations épidémiologiques, largement étayées par des expériences avec des animaux, conduisent à l'élaboration de l'hypothèse de "programmation métabolique" (Lucas, 1991), qui fut modifiée peu de temps après le terme de "programmation nutritionnelle » (Lucas, 1994). Dans la première étude, il a été observé que des dommages ou des stimuli appliqués au cours de la période dans laquelle les tissus sont en prolifération cellulaire et en différenciation rapide, peuvent avoir des effets persistants ou durables sur la structure ou le fonctionnement d'un organisme. En d'autres termes, ces périodes critiques du développement correspondent aux fenêtres de temps où les tissus sont plus vulnérables aux lésions (Dobbing (1965)).

Les premières études sur la programmation nutritionnelle ont eu lieu dans le Hertfordshire, en Angleterre. Sur des bébés nés en 1911, on a mesuré les poids à la naissance et après une année de vie. Cette étude a révélé une corrélation entre un faible poids de naissance et durant la première année de vie, avec le développement du diabète de type 2 à l'âge adulte (Barker, Osmond et al., 1989). Plus tard, dans la ville de Preston (Angleterre), Barker et al (1993) ont analysé des informations telles que la date de la dernière période menstruelle du poids de la mère du bébé et de la naissance, le poids du placenta, la longueur la tête aux pieds et la circonférence de la tête entre les années 1935 à 1943 (Barker, Hales et al., 1993). Cette étude a confirmé les coefficients de corrélation observés sur les bébés de Hertfordshire, ajoutant des informations sur la perte de la tolérance au glucose, l'hypertension et l'élévation des triglycérides sériques à jeun (Barker, Hales et al., 1993).

Un autre exemple de programmation nutritionnelle concerne les effets de la pénurie alimentaire sur les enfants des femmes enceintes durant le siège d'Amsterdam pendant. Les enfants de ces femmes montraient des différences dans la composition corporelle, en fonction de l'âge d'exposition à la malnutrition intra-utérine. Ceux qui ont souffert de malnutrition dans la première moitié de la grossesse avaient une incidence élevée d'obésité parvenu à l'âge adulte, comparativement à ceux qui ont souffert de malnutrition dans la dernière moitié de la grossesse (Ravelli, Stein et al., 1976).

Dans les dernières décennies, on a produit un grand nombre de preuves que les influences nutritionnelles au début de la vie affectent le taux de croissance fœtale et postnatale contribuant à l'apparition de profonds effets sur la santé à l'âge adulte (Barker 1998). Dans ces études, on donne actuellement le terme « Origines Développementales de la Santé et de la

Maladie (en Anglais, DOHaD ; Prentice 2005). Le début des études DOHaD a été fondé sur de grandes cohortes européennes, tels que les observations de Hertfordshire, où l'association entre un faible poids à la naissance avec les maladies cardiovasculaires étaient significatifs, même en faisant abstraction de l'IMC actuel des individus.

Les mécanismes qui conduisent à la programmation métabolique ne sont pas tout à fait clairs. On sait, cependant, que l'alimentation maternelle est directement liée au développement et à la croissance du fœtus. Des études épidémiologiques ont identifié que la manipulation alimentaire, comme la malnutrition périnatale est l'un des facteurs environnementaux les plus étudiés pour induire la plasticité phénotypique (Barker, Eriksson et al, 2002;. Bellinger Lilley et al 2004;. Gluckman et Lillycrop al., 2007). L'inadéquation entre la demande de nutriments offerts *in utero* et l'environnement postnatal, ajouté aux coutumes et aux styles acquis tout au long de la vie tels que les changements dans les habitudes alimentaires et le mode de vie associé à la sédentarité peuvent causer de forts impacts métaboliques et physiologiques chez l'individu, ce qui augmente le risque de la charge de l'expression phénotypique acquis pendant la vie intra-utérine.

### 2.10.5 Preuves et modèles expérimentaux de la DOHAD

Depuis l'étude de Barker (Barker et Osmond 1986; Barker, Osmond et al 1989; Barker, Hales et de al 1993), il y a de plus en plus de preuves montrant clairement que les influences nutritionnelles tôt dans la vie, sont capables d'affecter le rythme de la croissance fœtale et postnatale, et ont des effets profonds à l'âge adulte (Barker 1998; Langley-Evans 2006;. Gluckman, Lillycrop et al 2007). Ces associations justifient l'intitulé «origines développementales de la santé et de la maladie» ou DOHaD (Prentice 2005). L'obésité chez les adultes est un élément important qui caractérise la DOHaD et la tendance ou l'apparition de l'obésité devient une condition nécessaire qui révèle les défauts sous-jacents programmés (Prentice, 2005). Bien que l'influence de l'environnement périnatal sur l'émergence de maladies plus tard dans la vie est bien établi dans la littérature, l'identification des mécanismes moléculaires est toujours un défi pour les chercheurs qui étudient la DOHaD.

Pendant des années, la recherche sur les animaux de laboratoire a été une partie intégrante et indispensable pour essayer de montrer les effets de l'association de la nutrition sur le développement et la santé foetale et néonatale dans la vie ultérieure. Les modèles animaux sont largement utilisés pour souligner que les facteurs internes et externes influencent la force de la relation santé / maladie. Dans l'environnement de l'enfant lors des stades précoces de la vie, plusieurs situations sont contre-indiquées pour un développement fœtal harmonieux (par exemple, la malnutrition et la suralimentation), les situations de stress, l'exposition aux glucocorticoïdes, le tabac, l'alcool, sont associées à des effets permanents sur le développement cognitif, le métabolisme, et sur les systèmes cardio-vasculaires et neuro-endocrines (Meaney et al, 2007 ;. Seckl et Meaney, 2006). Pour de nombreuses questions éthiques, l'étude expérimentale chez l'homme a plusieurs limites. Cela interdit la manipulation diététique et pharmacologique visant à développer des phénotypes physiopathologiques, tels que ceux qui sont développés dans des modèles animaux.

Au fil des ans, les modèles animaux représentent toujours l'outil principal pour fournir des informations sur le fonctionnement de l'organisme dans son ensemble (Heywood 1987; Ribeiro, Campos et al 1995 ;. Salen 1995). Il en résulte diverses lésions ou manipulations. Ces modèles animaux sont admissibles selon le phénomène étudié, la réponse biologique prévue et sa similitude avec le résultat chez l'homme.

En outre, les animaux de plusieurs espèces ont été utilisés dans les études expérimentales, comme les moutons (Hawkins et al Steyn 2000; .. Williams, et al Kurlak 2007), les porcs (Poore, forhead et al., 2002; Poore et Fowden 2004), les primates non humains (Cox et al 2006 ;. Nijland Nijland, Schlabritz-Loutsevitch et al 2007) et les rongeurs. Un autre groupe d'études porte sur des lapins (Mapara, Thomas et al. 2012), des chèvres, des bovins, des porcs et dans une moindre mesure, les chiens, les chats et certaines espèces de primates (Andreollo, Santos et al. 2012). Selon les informations de la littérature, la plupart des recherches dans ce domaine de base sont entreprises avec de petits animaux tels que la souris, le rat, le hamster, comprenant près de 80% de toutes les espèces utilisées dans les laboratoires (Schanaider et Silva 2004). Parmi les autres, 10% sont des poissons, des amphibiens, des reptiles et des oiseaux. Sans doute, la souris est l'un des modèles le plus utilisé et l'un des plus reconnu scientifiquement pour sa physiologie et sa biologie. Un autre facteur important pour l'utilisation généralisée de la souris comme un modèle animal est que ce genre d'animal est un excellent modèle pour la recherche impliquant des manipulations diététiques, en raison de sa



grande capacité d'adaptation à diverses manipulations nutritionnelles. Toutefois, une grande partie des bases scientifiques qui sous-tendent l'étude des recommandations nutritionnelles, telles que l'apport en protéines, nécessaires à la croissance et à l'entretien, sont fondées sur la croissance et le développement des rats sevrés (McDonald 1997). Grâce à ces travaux, des informations telles que la qualité des des protéines, le renouvellement des acides aminés, et l'utilisation des deux facteurs devraient permettre d'améliorer l'ingestion quotidienne en préconisant une nutrition adéquate.

L'étude des maladies de la malnutrition sur l'organisme en développement était et est toujours l'objet de nombreux travaux. Les séquelles liées à ces régimes peuvent atteindre divers organes et systèmes et s'étendre depuis des modifications temporaires jusqu'à un état chronique, avec un impact individuel et collectif, car une mauvaise santé publique crée aussi des difficultés au niveau national. Actuellement beaucoup de recherches pour l'étude des manipulations et / ou des facteurs nutritionnels qui se traduisent par une modification de l'état nutritionnel et de ses effets corporels, ont été destinés à clarifier les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans les effets de la plasticité pendant les premières périodes de la vie. Le régime alimentaire à faible teneur en protéines est un des plus utilisés, ce qui contribue depuis quelques années à l'étude des effets de la programmation métabolique sur l'état de santé d'un organisme adulte.

Dans les études expérimentales, le modèle nutritionnel le plus utilisé pour restreindre la promotion de la croissance périnatale, avec des implications futures pour l'émergence de maladies telles que les maladies cardiovasculaires et le diabète, est l'induction de la malnutrition en réduisant la teneur en protéines de l'alimentation maternelle (Desai, Crowther et al., 1996). Dans certains pays en développement, la carence en protéines dans le régime alimentaire se classe toujours comme l'un des facteurs les plus importants de la malnutrition infantile (Symonds, Sebert et al., 2009). L'ampleur de la restriction protéique maternelle, ainsi que la quantité et la qualité, qui caractérisent les régimes faibles en protéines (Low proteinen anglais) causent des dommages à la descendance. Nous donnerons comme exemple les maladies du développement et de la morphologie des îlots pancréatiques, les tissus sensibles à l'insuline, tels que les muscles, le foie et les adipocytes, ainsi que les troubles dans les reins et le cerveau (Langley-Evans 2000). Au niveau métabolique, ces effets peuvent se traduire par une augmentation de la pression artérielle (Langley-Evans, 1996), l'émergence du diabète de

type II à l'âge adulte (Grace, Swenne et al 1990 ; Ozanne, Wang et al., 1996), la dyslipidémie et l'excès de tissu adipeux (Orozco-Solis, Lopes de Souza et al., 2009). L'apparition du diabète de type II et de la résistance à l'insuline ont été observées chez les souris âgées de 17 mois, à partir de mères nourries avec un régime faible en protéines pendant la période périnatale (Petry, Dorling et al., 2001). En accord avec ces résultats, il a été constaté que ce modèle favorise les troubles de l'ontogenèse du pancréas endocrine, induisant une réduction des cellules bêta du pancréas (Snoeck, Remacle et al 1990; Petrik, Reusens et al 1999).

Ce bref exposé des preuves expérimentales suggère que la consommation d'un régime faible en protéines pendant la grossesse et / ou lors de la période d'allaitement favorise divers troubles endocriniens résultant en une pression artérielle élevée, une intolérance au glucose, une résistance à l'insuline (Dahri, Snoeck et al. 1991; Kwong, Wild et d'al 2000) (Drake et al, 2005), ainsi que des changements de comportement, cellulaires et moléculaires, augmentant le risque de développer des lésions métaboliques à l'âge adulte. Les autres effets pertinents de la restriction protéique dans la vie périnatale sont démontrés par des changements dans le contrôle central du comportement alimentaire. Dans les études expérimentales, il a été constaté que le régime alimentaire faible en protéines pendant la grossesse est de préférence alimentaire, chez les souris adultes, pour les aliments riches en graisses (Bellinger Lilley et al., 2004)? (Bellinger et al 2005). En outre, pendant la période périnatale, les animaux souffrant de malnutrition ont développé une hyperphagie après le sevrage (Lopes de Souza, Orozco-Solis et al 2008; Orozco-Solis, Lopes de Souza et al 2009), ainsi que la réduction de l'effet anorexigène de la sérotonine par désensibilisation du récepteur de la sérotonine 5-HT<sub>1B</sub> (Lopes de Souza, Orozco-Solis et al., 2008). Il est intéressant de noter que l'hyperphagie augmente quand on offre aux animaux un régime riche en graisses (Breier, Krechowec et al., 2004). Dans d'autres études, les animaux souffrant de malnutrition précoce ont montré des changements dans l'expression des gènes hypothalamiques liés au métabolisme du glucose et des lipides, ainsi que des capteurs qui détectent l'état nutritionnel de l'organisme (Orozco-Solis, Matos et al., 2010a). Corroborant ces données, Plagemann, Harder, et al., (2000) ont suggéré que les animaux exposés à un régime alimentaire pauvre en protéines durant la période prénatale, présente des changements dans la structure hypothalamique ainsi que dans l'expression de neuropeptide connexes du comportement alimentaire.

Les modèles de programmation fœtale avec le régime hypoprotéique ont été largement utilisés pour analyser les mécanismes de l'association entre la nutrition maternelle avec des pertes dans la croissance fœtale, l'apparition du diabète et des maladies cardiovasculaires dans les périodes ultérieures de la vie (Bertram et Hanson, 2001). Cependant, malgré les nombreuses études concernant ce type de régime, sa composition ne présente pas un seul standard (comme le montre les études citées dans le tableau 2). En outre, la source de protéine utilisée dans les régimes peut varier entre les études, en particulier la source de caséines qui peut être naturelle.

**Tableau 2. Compositions des regimes à faible teneur en protéines (low protein) et témoins**

Diète (g/Kg)	Protéine	Fibres	Amidon de ma	Sacch arose	Vitamines	Minerau x	Méthionin e	Cholin e	Huile	Ref.
LP6%	60,00	67,16	153,52	511,74	10,00	35,00	3,70	-	151,80	a
CTRL										
25%	250,00	50,00	114,52	381,72	10,00	35,00	3,70	-	150,00	a
LP8%	90,00	50,00	80,00	666,70	69,50	69,50	0,80	-	43,00	b
CTRL										
20%	220,00	50,00	80,00	536,50	68,50	68,50	2,00	-	43,00	b
LP9%	90,00	50,00	485,00	243,00	5,00	20,00	5,00	2,00	100,00	c
CTRL										
18%	180,00	50,00	425,00	213,00	5,00	20,00	5,00	2,00	100,00	c
LP 10%	100,00	50,00	373,40	316,60	10,00	50,00	1,50*	1,65	50,00	d
CTRL										
20%	200,00	50,00	317,60	317,60	10,00	50,00	3,00*	1,65	50,00	d

Références : a - (Galler and Tonkiss 1991) ; b - (Snoeck, Remacle et al. 1990) ; c - (Langley-Evans, Gardner et al. 1996) ; d - (Zambrano, Rodriguez-Gonzalez et al. 2005). Siglas: LP – Low Protein; CTRL – Controles. \*L'acide aminé utilisé a été la cystine.

Parmi les modèles de régimes hypoprotéique, le plus largement utilisé est le modèle développé sur la malnutrition de Snoeck, Remacle et al., (1990) qui ne prévoit que 8% de protéines au lieu de 20% dans le régime témoin. Dans cette étude, nous avons observé un retard de croissance intra-utérin associé à un faible poids de naissance. Ce résultat expérimental est similaire à l'étude sur population humaine rapportée par Barker.

Un autre sujet qui devrait être pris en compte en plus de la quantité et de la qualité de la protéine dans les régimes expérimentaux est le rapport protéine: glucides: lipides entre les régimes témoins et hypoprotéiques. Selon (Reeves 1997), le régime témoin est composé de macronutriments protéines, glucides et lipides dont le ratio est de 2,8: 9,0: 1,0 (respectivement). En revanche, la plupart des régimes hypoprotéiques contiennent des niveaux élevés d'hydrates de carbone, avec un taux excessif de saccharose, déséquilibrant la relation entre macronutriments (Cherala, Shapiro et al., 2006). Du, Higginbotham et al., (1999) utilisent différentes concentrations pour leur régime alimentaire à faible teneur en protéines au cours de la période de 2 semaines. Dans la première semaine, les rats ont augmenté leur ingestion d'aliments pour le groupe en restriction protéique, il y avait une diminution de l'ingestion d'aliments avec des restrictions plus sévères. Enfin, la prise alimentaire des animaux qui ont été nourris avec le régime alimentaire à 5% de protéine se traduit par une prise alimentaire plus faible par rapport à ceux nourris avec 8% (Du, Higginbotham et al., 1999). Ceci suggère que les taux de protéines dans le régime alimentaire provoquent différentes réponses métaboliques, tels que la fluctuation de la quantité d'aliments consommés.

Donc, ayant établi un lien entre la gestation et l'influence de l'alimentation sur l'horloge circadienne, nous nous sommes demandé si, en termes comportementaux et moléculaires, la gestation et la dénutrition périnatale pourraient- affecter les rythmes circadiens ? Cette question est pertinente puisque si les changements des rythmes apportent des effets comportementaux et moléculaires négatifs pour le corps au cours et après la période critique du développement, cette recherche pourrait contribuer à améliorer la prévention et le traitement des maladies chroniques.

## **3 Objectifs**

### **3.1 Objectif Général:**

Analyser, en termes comportementaux et moléculaires, l'influence de la gestation et de la dénutrition périnatale maternelle sur l'horloge circadienne.

### **3.2 Objectifs Spécifiques:**

Analyser sur des mères et leurs fœtus/ratons durant et après la gestation :

- la biométrie;
- le rythme circadien de l'expression de certains gènes clés de l'horloge;
- La consommation et la courbe glycémique circadienne des mères avant, au cours et après la gestation;

## 4 Méthodes

### 4.1 Comité d'éthique

Les protocoles expérimentaux ont été approuvés par le "Comité d'éthique Pour l'expérimentation animale, Pays de la Loire, France" sous le numéro 06 (de 20 Mars, 2013; CEEA.2010.38) et par le Comité d'éthique pour la recherche sur les animaux de conduite Centre des sciences de la vie de l'Université fédérale de Pernambuco (UFPE, protocole - 23076.018780/2014-70). Les études chez le rat ont été réalisées selon les normes de l'unité de l'expérimentation animale Nantes (conformément à la Directive des Communautés européennes du 24 Novembre 1986 (86/609 / CEE) et les Principes de soins des animaux de laboratoire (NIH publication no. 85-23, révisé 1985).

### 4.2 Animaux et diètes

Pour les expériences, nous avons utilisé des rates **Wistar** vierges, âgées de 90 jours et pesant  $210 \pm 20$  g, provenant du fournisseur Charles-River (France) et du Fonds de nutrition animale de l'Université fédérale de Pernambuco. Les femelles ont été accouplées avec des mâles du même âge, de la même souche et du même fournisseur. Les animaux ont été maintenus à une température ambiante expérimentale de  $22 \pm 2$  ° C, et le cycle Lumière / Obscurité était de 12/12 heures (lumière 7h00-19h00, obscurité 19:00-07h00). L'accès à l'eau était totalement libre et l'alimentation de base était fourni par : vivarium standard (Ration SAFE® - A04, 18% de protéine et Purina do Brasil, 18% protéine). Le diagnostic de l'état de grossesse a été réalisé par prélèvement vaginal. La grossesse confirmée, les rats ont commencé à recevoir les rations expérimentales conduisant à deux groupes: contrôle (C), les rats ont reçu une alimentation protéique normal (18%) ou insuffisante (régime hypoprotéique ; PR - Protéines restreintes à 8 %). Les régimes étaient isocaloriques, et ont suivi les recommandations de l'AIN-93G ; REEVES, Nielsen et Fahey, (1993) comme décrits dans le Tableau 1. Les régimes expérimentaux ont été maintenus tout au long de la grossesse

et l'allaitement. Un jour après la naissance, les rats ont été pesés et choisis, en formant la litière avec 8 rats et la mère (5 males et 3 femelles). Après sevrage, les rats ont commencé à recevoir un régime d'entretien (Ration SAFE® - A04, protéine 18%) et ont été logés dans des cages avec un maximum de quatre animaux.

**Tableau 1. Composition des diètes à faible teneur protéique ou témoin**

<b>Composé</b>	<b>Diète Témoin</b>	<b>Diète Hypoprotéique</b>
<b>g%</b>	100,00	100,00
<b>Protéine (Caseïne)</b>	18,00	8,10
<b>Carbohydrates</b>	65,20	75,10
<b>Lipides</b>	7,00	7,00
<b>Cellulose</b>	5,00	5,00
<b>Vitamines</b>	1,00	1,00
<b>Minéraux</b>	3,50	3,50
<b>Méthione</b>	0,30	0,30
<b>% Kcal</b>	3,6 Kcal/g	3,6 Kcal/g

Pendant la grossesse, l'allaitement et après la lactation, le poids des rats a été mesuré chaque semaine. Pendant la lactation et après la lactation, le poids des rats a été mesuré tous les 4 jours (Balance Sartorius, sensibilité 0,01). Pour toutes les expériences, nous avons utilisé 12 rats du groupe témoin et 12 rats du groupe malnutris. Toutes les procédures ont été effectuées en conformité avec les directives de la Communautés européennes et du Conseil du 24 Novembre 1986 (86/609 / CEE) en relation avec le soin et l'utilisation des animaux dans des procédures expérimentales. Les animaux ont été sacrifiés par dislocation cervicale.

### 4.3 Organisation expérimentale

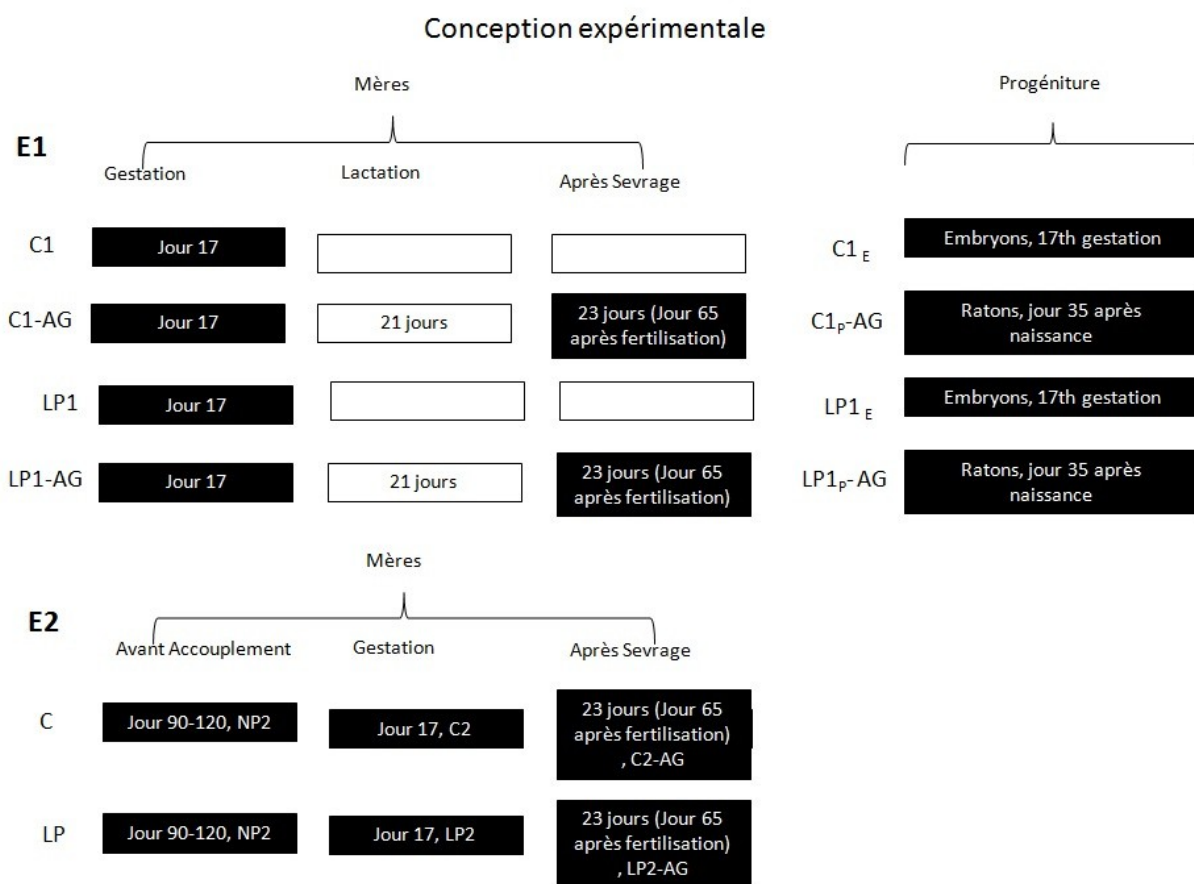
Des rates ont été utilisées dans cette étude (âgées d'environ huit semaines, 200 - 224g). A leur arrivée, elles ont été logées sous cycle lumière / obscurité de 12 heures chacun (Lumière de 8h00 à 20h00) ou sous cycle inversé (Lumière de 20h00 à 8h00). Toutes les manipulations chez les rats au cours de la période d'obscurité ont été effectuées sous une lumière rouge (<2 lux) et sous climatisation contrôlée ( $21 \pm 2$  ° C, humidité relative:  $60 \pm 10\%$ ). Les animaux ont été maintenus sans manipulations pendant les deux premières semaines d'adaptation. Après confirmation de l'accouplement par affichage de sperme sur frottis vaginal, les rates ont été logées individuellement dans des cages, au hasard, comme le groupe pauvre en protéines (LP) et le groupe de contrôle (C). Un jour après la naissance, la taille de la portée a été ajustée à 8 rats par mère, avec un rapport de 4 mâles et 4 femelles. Le sevrage des animaux a eu lieu à 21 jours, seuls les rats qui restaient dans l'étude et les deux groupes (C et LP) ont commencé le régime standard de laboratoire jusqu'à la fin des expériences. Au jour de la naissance, la taille de la portée et le poids des petits ont été mesurés .

### 4.4 Analyse PCR durant le développement périnatal des rats contrôles et dénutris

Les rates gravides (24), pesant 220 - 250 g sous cycle de lumière sombre de 12 heures chacune (lumières 08:00-à-20:00) ont été réparties au hasard en quatre groupes (deux contrôles et deux hypoprotéiques) pour les études de la biologie moléculaire: 1 ) mères contrôle jusqu'à ce que le 17<sup>e</sup> jour de gestation (C1, alimenté par le régime de contrôle pendant la grossesse, n = 6) et de leurs embryons au même âge gestationnel (C1<sub>E</sub>, n = 6); 2) les mères contrôles jusqu'à 23 jours après le sevrage (C1-AG, alimenté par le régime de contrôle pendant la grossesse et l'allaitement, n = 6) et de leur progéniture jusqu'à 14 jours après le sevrage (C1<sub>P</sub> nourris régime de contrôle pendant la grossesse et l'allaitement, n = 6); 3) les mères souffrant de malnutrition jusqu'au 17<sup>ème</sup> jour de gestation (LP1, nourris avec un régime faible en protéines pendant la grossesse, n = 6) et de leurs embryons au même âge gestationnel (LP1<sub>E</sub>, n = 6); 4) mères souffrant de malnutrition jusqu'à 23 jours après le sevrage



(LP1-AG, nourris avec un régime faible en protéines pendant la grossesse et l'allaitement, n = 6) et de leur progéniture jusqu'à 14 jours après le sevrage (LP1<sub>p</sub> nourris avec un régime faible en protéines au cours de la la grossesse et l'allaitement, n = 6). Le dispositif expérimental est représenté sur la Figure 1 (article).



**Figure 1. Plan d'Expériences (Expériences 1 - E1 and 2 - E2).** C1, C2 = Control mothers (n=6 et 10, respectivement) d'expériences 1 et 2; C1E = Control embryos (n=6); LP1, LP2 = Low-Protein mothers (n=6 et 10, respectivement); LP1E = Low-Protein embryos; C1-AG = Control mothers After Gestation (23 jours après le sevrage, n=6), C1P-AG = Control pups After Gestation (rats de 35 jours, n=6); LP1-AG = Low-Protein mothers After Gestation (23 jours après le sevrage, n=6); LP1P-AG = Low-Protein pups After Gestation (rats de 35 jours, n=6). NP2 = Non-pregnant rats (C - n=10; LP - n = 10); C2-AG = Control mothers After Gestation (23 jours après le sevrage, n=10); LP2 - AG = Low-Protein mothers After Gestation (23 jours après le sevrage, n=10). Boîtes noires = jour de l'analyse moléculaire ou de la consommation/glycémie circadienne.

Nous avons effectué une analyse comparative par PCR quantitative, pour suivre le rythme circadien de l'expression de certains gènes clés de l'horloge. Les expériences ont été effectuées dans des cultures primaires de cellules de fibroblastes de mères au 17ème jour de la grossesse (les mères et leur embryon- C1, C1E, LP1, LP1E) et aussi des mères entre 15 -25

jours après le sevrage (mères et leurs ratons - C1-AG, C1P, LP1-AG, LP1<sub>p</sub>), qui avaient ou non subi une restriction protéique pendant le développement périnatal.

## **4.5 Consommation alimentaire et glycémie durant le développement périnatal des rats contrôles et dénutris**

Les rats Wistar élevés cycle inversé (lumière de 20H00 à 8H00), pesant 220-250g, de l'élevage expérimental de l'Université fédérale de Pernambuco, Brésil ont été divisés en un groupe qui n'a pas été soumis au protocole de l'accouplement, c'est-à-dire des rates non gravides, qui ont été nourris avec un régime standard (Purina du Brésil) jusqu'à 90-100 jours d'âge (NP2, n = 20). Ces rats, après la confirmation de la gestation, ont été répartis au hasard en groupe témoin (C, n = 10) et hypoprotéique (LP, n = 10). Les mères ont été analysées au 17<sup>ème</sup> jour de gestation (C2, nourris avec un régime alimentaire de contrôle pendant la grossesse, n = 10) et 23 jours après le sevrage (C2 AG, nourris avec un régime alimentaire de contrôle pendant la grossesse et l'allaitement, n = 10). Le même protocole a été utilisé pour le groupe sous-alimenté, soit des rates gravides hypoprotéiques ont été examinées au 17<sup>e</sup> jour de gestation (LP2, nourris avec un régime faible en protéines pendant la grossesse, n = 10) et 23 jours après le sevrage (LP2-AG, régime hypoprotéique alimentation pendant la grossesse et l'allaitement, n = 10). Les mères contrôles et les mères sous-alimentées ont été sacrifiées par dislocation cervicale au dernier point de temps (Figure 1).

## **4.6 Mesures de la consommation alimentaire**

Les rates avant (NP2, n=20), pendant (C2, n=10 et LP2, n=10) et 23 jours après le sevrage (C2-AG, n=10 et LP2-AG, n=10) ont été logées individuellement dans des cages. Tous les régimes ont été proposés *ad libitum*. Les rates ont été nourries avec un régime d'abord de laboratoire standard (Purina du Brésil) avant la gestation et après le sevrage. Pendant la gestation et l'allaitement, les mères ont été nourries avec un régime faible en protéines (de 8% de protéines) ou avec un taux de protéines normal (18% de protéine). L'accès à la nourriture a été posé dans la partie supérieure de la grille métallique qui fermait la

cage. L'eau a été placée dans un ballon fixé à l'avant de la cage. Après une durée d'habituation de 7 jours, pour que l'animal acquiert un profil alimentaire stable, la consommation alimentaire a été évaluée toutes les 4 heures pendant 3 jours consécutifs. Nous avons déterminé les créneaux horaires suivants (Zeitgeber) pour une journée: ZT0 = 08-12h; ZT4 = 12-16h; ZT8 = 16-20h; ZT12 = 20-24h; ZT16 = 24-04h; ZT20 = 04-08h; ZT24 = 08-12h.

## 4.7 Mesures de la glycémie

Les rates avant (NP2, n=20), pendant (C2, n=10 et LP2, n=10) et 23 jours après le sevrage (C2-AG, n=10 et LP2-AG, n=10) ont été prélevées d'une goutte de sang à la queue (10 µL) pour déterminer l'oscillation circadienne de la glycémie totale (Accu Check, Roche -Diagnostics GmbH, Mannheim, Allemagne). La collecte a eu lieu toutes les 4 heures au 2ème jour de la mesure de la prise alimentaire (ZT0 - ZT24).

## 4.8 Culture cellulaire

Six rats de chaque groupe expérimental (mères/embryons/ratons contrôles et dénutris) ont été utilisés. La culture cellulaire a été faite à partir de l'extrémité non innervée de la queue du rat selon la méthode décrite par Nascimento et al (2013). Les biopsies de 10 à 100 mg ont été exposées à de l'eau de Javel, rapidement rincées dans un grand volume de solution tampon phosphate salin avant l'exposition à la trypsine - EDTA pendant 15 min à 37 C. Les culots cellulaires ont été resuspendus mécaniquement par pipettages vigoureux (20 fois). Les suspensions cellulaires ont été réalisées avec 3 ml de DMEM + 20% de sérum de veau foetal et on centrifuge à 1.300 tours par minute (190 x g) pendant 3 minutes à température ambiante. Le culot cellulaire a été remis en suspension dans 10 ml de DMEM + 10% sérum de veau foetal, de l'amphotéricine-B (1/1000) et de la gentamicine (100 mg / 50 ml) et ensemencées dans 25 cm<sup>2</sup> ballon (Nunch) dans un incubateur humidifié (37 C, 5% CO<sub>2</sub>). Dans les trois à cinq jours, des colonies de cellules ont été vues en prolifération active. Après trypsinisation, le flacon a été inoculé avec des cellules à croissance rapide, la confluence a été atteinte dans la

semaine. Les cellules ont été remises en suspension par traitement à la trypsine et utilisées pour préparer une ampoule conservée à -70°C (95% de sérum de veau foetal à 5% de DMSO, stocké dans une boîte Nalgen avant d'être maintenu à 270uC) et un ensemencement dans des plaques de culture tissulaire (LabTek P-96 ou 25 cm<sup>2</sup>). La ré-induction des transcrits de l'horloge circadienne des cellules a été réalisée par un choc sérique (DMEM avec 50% Dulbeco®).

## 4.9 Analyse quantitative par RT-PCR

Les animaux ont été sacrifiés par dislocation cervicale. Une petite section de la queue a été retirée pour effectuer la culture des fibroblastes. Après le choc sérique, les cellules ont été recueillies toutes les 6 heures pour une durée totale de 30 heures (6 points temporel, y compris le premier point de deux heures après le choc). L'ARN total a été extrait en utilisant le réactif Trizol (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), traité à la DNase (exempte de RNases) pendant 30 minutes à 37 ° C et ensuite purifié par le kit de purification de minicolonne NucleoSpin de Macherey-Nagel (Hoerd, France) selon les instructions du fabricant. La qualité de l'ARN a été vérifiée sur des gels d'agarose et la quantité déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre NanoVue™ plus GE Healthcare à 260 et 280 nm. Ensuite, 1 mg d'ARN purifié a été transcrit en ADN complémentaire (ADNc) en utilisant l'enzyme Superscript II RNaseH- transcriptase inverse (Invitrogen) dans un volume total de 20 µl. L'ADNc résultant a été dilué 40 fois dans de l'eau. Ensuite, 5 µL de chaque échantillon d'ADNc dilué a été utilisé comme matrice pour l'amplification par PCR en utilisant pour la révélation le colorant fluorogène SYBR Green (Biorad, Marnes la Coquette, France) et l'appareil CFX de BioRad Laboratories (Hercules, CA, USA). Les paramètres de la PCR en temps réel étaient: une dénaturation initiale de 5 minutes à 95 ° C suivie par 45 cycles de 30s à 95 C et 30s à 60 C. Nous avons dessiné les amorces directe et inverse avec le logiciel Beacon Designer. Les ARNm ciblés ont été confirmés de façon indépendante avec le logiciel Blast. Les amorces ont été utilisées pour l'amplification: Sens Bmal1 5'GACTTCGCCTCCACCTGTTC3 ', 5'CATTGTCTGGTTCACCTGTCTTCG3 anti-sens »; Per1 5'GCCGTGCTGCCTGCTCATTG3 Sens »de 5'AACTTGGTGTGTGCCGTGTGG3 anti-sens»; Per2 5'GCACGCTGGCAACCTTGAAG3 Sens»de

5'GGCTGGCTCTCACTGGACATTAG3 anti-sens»; et b-2-microglobuline sens 5'GATGGCTCGCTCGGTGAC3 », anti-sens 5'CG Sens CAGTTGAGGAAGTTGG3 '. L'expression relative des niveaux d'expression de Bmal1, Per1 et Per2 ont été calculées en utilisant la méthode comparative dite du delta-Ct et delta-delta-Ct (Livak & Schmittgen 2001).

## 4.10 Analyse statistique

Les résultats des expériences ont été exprimés en moyenne  $\pm$  erreur standard de 4-6 rats (des mères et de leurs embryons / ratons) par point temporel. Les niveaux d'expression relatifs des ARNm dans les différentes cultures de fibroblastes ont été calculés en utilisant la méthode comparative  $\Delta$ Ct et nous avons sélectionné la bêta-2-microglobuline comme gène de référence. L'applicabilité de la méthode a été validée en déterminant l'efficacité d'amplification des différents produits de transcription, y compris la bêta-actine par gamme en raison de dilution des échantillons. Les expériences ont montré que l'efficacité de l'amplification a été la même pour tous les gènes étudiés et que l'expression de la bêta-2-microglobuline n'a pas été influencée par l'âge ou par le régime alimentaire des mères.

Pour tester la présence de rythmes circadiens dans les gènes étudiés, dans la prise alimentaire et dans la glycémie, la série de données temporelles a été analysée par une première ANOVA à un facteur. L'existence d'un effet significatif du facteur Temps, de la consommation de nourriture ou de l'expression des gènes dans deux intervalles de temps distincts ont été utilisés en tant que preuve de la présence d'un rythme circadien. Nous avons également mené une analyse Cosinor pour confirmer ces hypothèses et pour déterminer les effets de l'alimentation maternelle dans les paramètres du rythme circadien de chacun des gènes (mesor, acrophase, pourcentage du rythme, etc – résultats non-publiés).

Pour vérifier les différences dans les niveaux d'expression des gènes (1<sup>er</sup> expérience) ou dans la glycémie et la consommation (2<sup>ème</sup> expérience) entre les groupes pour les différents points temporels, les données ont été analysées par ANOVA à deux voies avec le régime alimentaire expérimental (contrôle et low-protein) et le ZT comme facteurs. Lorsque des effets significatifs ont été trouvés, le test de Bonferroni pour les comparaisons

multiple a été utilisé. Les différences statistiques entre le poids des animaux LP et C ont été calculées par le test t de Student. Le niveau de signification statistique a été fixé à  $p < 0,05$ .

## 5 Discussion Générale

Dans notre étude, le choix des fibroblastes est pleinement justifié par le fait que ce sont des cellules qui ont un oscillateur circadien auto-entretenu et autonome dont la fonction continue, même pendant la division cellulaire (Brown et al., 2005). Nous avons montré que les fibroblastes de l'extrémité de la queue de rat peuvent être recueillis de manière non invasive en provenance du même animal et que ces cellules peuvent être utilisées pour étudier les changements du mécanisme de l'horloge circadienne par rapport à l'alimentation des rats (Nascimento et al. , 2013). Après propagation dans la culture, les fibroblastes perdent leur capacité de synchronisation et les oscillations des transcrits de l'horloge circadienne peuvent être ré-induits par un choc sérique appliqué pendant 1-2 heures (Balsalobre et al, 1998 ;, 2000). O'Neill et al (2008) ont indiqué que les cultures de fibroblastes matures seront très utiles pour le dépistage à haute performance de drogues et de mutations de l'horloge circadienne. Récemment, Noguchi et al (2013) a utilisé des fibroblastes transgéniques pour le gène *Per2* afin de démontrer que la rythmicité circadienne dans une culture tissulaire dépend de la densité cellulaire. En plus de cela, ces auteurs ont montré que les fibroblastes ont besoin des signaux paracrines des cellules adjacentes pour l'expression d'un rythme normal, et que ces signaux sont spécifiques des fibroblastes. L'isolement non-invasif de fibroblastes permet d'évaluer la capacité de ré-induction des gènes de l'horloge circadienne dans les cellules cultivées. La restriction protéique au cours de la période périnatale semble agir comme une pression de sélection importante dans la capacité de synchronisation des fibroblastes *in vitro*.

Dans cette étude, nous avons d'abord trouvé que les oscillations rythmiques de la transcription de *bmal1*, *per1* et *per2* dans les fibroblastes ont été modifiées pendant la grossesse par rapport à ceux de la même mère pour une période après la gestation / allaitement (23 jours après le sevrage). Cette observation suggère fortement que tous les aspects de la physiologie des mammifères, y compris la reproduction, sont contrôlés par le système circadien (Dibner et al., 2010). Nous avons donc testé une adaptation aux changements quotidiens de l'environnement. Chez les femelles gestantes pendant la lactation et la gestation, la survie de la progéniture devient une priorité, et les changements dans les rythmes circadiens du comportement et de la physiologie au cours des états de reproduction lors du cycle oestral, reflètent généralement une réponse à ces demandes. Par exemple, des

études en laboratoire sur des animaux ont montré que la phase du rythme de la température du corps a été avancée et l'amplitude diminuée pour compenser les hausses de température minimales quotidiennes pendant la grossesse (Kittrell et al., 1988). Ajouté à cela, pour tenir compte de l'augmentation du sommeil nécessaire en début de grossesse, les habitudes de sommeil sont également altérées chez les rongeurs (Kimura et al, 1996;. Schrader et al, 2012.).

De nombreuses adaptations physiologiques et comportementales surviennent chez la mère afin qu'elle puisse répondre à la demande de nutriments pour leur bébé, y compris une augmentation de la capacité d'absorption de l'intestin et de la capacité métabolique du foie (Williamson, 1980) ainsi que l'augmentation spectaculaire de la consommation de nourriture et de changements dans la structure temporelle des repas (Smith & Grove, 2002;. Augustin et al, 2008). Nos données montrent que la transition entre la fin de la gestation et un état ultérieur après le sevrage ne sont pas associés à des changements dans le régime alimentaire des mères. Cependant, nous avons trouvé plusieurs changements moléculaires dans l'horloge périphérique, en particulier dans l'expression de l'ARNm *bmal1* dans les fibroblastes de mères. Cette conclusion est étayée par des études qui montrent que la transition entre la fin de la grossesse pour la lactation est associée à des changements tant au niveau central (SCN), que au niveau périphérique (foie et glandes mammaires) de l'horloge circadienne et que ces changements se produisent d'une manière dépendant du tissu en cours d'évaluation. L'augmentation de l'expression de l'ARNm *Per2* dans les noyaux suprachiasmatiques des mères pendant l'allaitement est en faveur de l'hypothèse que les changements dans l'horloge centrale située dans les noyaux suprachiasmatiques se produit pendant les transitions entre les états de reproduction et peuvent résulter de changements coordonnés du métabolisme spécifique des organes qui sont nécessaires pour la production de lait pour les ratons (Casey et al., 2014).

Dans notre étude, la possibilité de ré-induire une oscillation de l'ARNm *bmal1* dans les fibroblastes cultivés a été fortement affectée par la transition de la gestation à une période après la gestation et l'allaitement (23 jours après le sevrage). Il est bien connu que le métabolisme du glucose est lié à l'évolution du rythme circadien de l'expression d'ARNm de *Bmal1* (Marcheva et al., 2010). Cela a été confirmé dans notre étude, nous avons constaté que lorsque les mères en fin de grossesse avaient un rythme différent de la glycémie par rapport à



la fin de 23 jours de lactation / sevrage. Ces changements sont devenues plus évidents quand ils ont été soumis à une restriction protéique pendant le développement périnatal. Des études effectuées par immunofluorescence pour confirmer la perte d'expression de la protéine *bmal1* spécifiquement dans les îlots pancréatiques et pas dans des régions cérébrales telles que les noyaux suprachiasmatiques (SCN), le noyau arqué (ARC), l'hypothalamus dorsomédial (DMH), et le noyau paraventriculaire (PVN) ont montré des modifications spécifiques confirmant la spécificité de la mutation de *Bmal1* sur les îlots (Marcheva et al., 2010). Plus important encore, les souris *knockout* pour *Bmal1* qui ont été utilisées dans cette étude ont montré une activité circadienne, des rythmes d'alimentation et un poids corporel normaux ce qui correspond aux données de notre étude. Par conséquent, vu que l'expression de l'ARNm *bmal1* dans les fibroblastes des rats durant la gestation et après la période gestation/lactation et l'activité alimentaire sont normales de même que le poids corporel, les phénotypes métaboliques du glucose qui se développent devraient être induits par une rupture dans le mécanisme moléculaire de l'horloge circadienne périphérique au lieu de changements mineurs dans l'activité ou le comportement de l'animal.

Un autre point à prendre en considération lorsque l'on étudie le système circadien chez la mère pendant la grossesse est sa capacité à contrôler les horloges circadiennes de leurs enfants, en particulier pendant le développement fœtal. Ici, nous avons remarqué que la capacité des fibroblastes de la mère est différente de la progéniture, ce qui suggère que la programmation nutritionnelle sélectionne des rats avec de nouvelles capacités de synchronisation. Nous savons peu de choses sur le système circadien fœtal. Ce que nous savons est que le développement des rythmes circadiens dans la progéniture et le développement se déroulent normalement en l'absence des noyaux suprachiasmatiques maternels fonctionnels. Cela est démontré par l'initiation des rythmes circadiens normaux dans les rats nouveaux-nés avec l'absence des rythmes circadiens maternels suite à des lésions des noyaux suprachiasmatiques ou une double invalidation chez les souris *mPer1Brdn / mPer2Brdn /* ou *mPer2Brdn mPer2Brdn / mCry1* souris (Davis & Reppert, 2001 ; Jud & Albrecht, 2006). Cependant, ces études montrent que de nouvelles approches expérimentales sont nécessaires pour comprendre comment se synchronisent les signaux des rythmes maternels postnatals. Dans notre étude, nous n'avons observé aucune synchronisation entre les rythmes circadiens de la mère et le fœtus, en particulier pour le gène *Per1*. Cette

désynchronisation a été renforcée par une restriction protéique pendant le développement fœtal de ces animaux pour tous les gènes étudiés.

En outre, l'ontogénie de l'expression de gènes de l'horloge dans les organes périphériques chez les fœtus et les nouveau-nés a été largement étudiée chez les rongeurs. Les chercheurs se sont penchés sur l'expression des gènes de l'horloge chez les fœtus entiers et les organes du fœtus sélectionnés *in vivo* chez la souris et sur le fœtus de rat (Dolatshad et al., 2010). Chez les fœtus de rat entiers, l'expression des gènes de l'horloge *Per2*, *Cry1*, *Bmal1* et *Clock* ont été détectées depuis le jour 10 de la gestation jusqu'au premier jour postnatal. Cependant, les mesures de l'expression de *Per2* et *Bmal1* avec des intervalles de 4 h ne présentent pas de rythmes sur 24 h chez le fœtus à 10, 14 et 19 jours de gestation. Des résultats négatifs similaires ont été trouvés dans le foie, les reins et le cœur des fœtus (Torres-Farfan et al., 2011). Peut-être ces différences entre les études peuvent expliquer nos résultats avec les fœtus. Nous travaillons avec des queues d'embryons sur le 17<sup>e</sup> jour de gestation. Nous avons pensé que le système circadien dans notre fœtus n'était pas correctement organisé à cet âge gestationnel pour le gène *Bmal1*. En revanche, les oscillations dans le gène *Per1* et *Per2* ont été observés dans les deux contrôles de l'embryon comme dans malnutrition. La même question a été étudiée dans une autre étude qui a travaillé avec les fœtus de rat au jour 16 de gestation, avec la différence que les gènes de l'horloge ont été quantifiés séparément dans toute la tête et tout le corps. Une anti-phase de 24 h d'oscillation des ARNm de *Per2* et de *Bmal1* a été observée dans la tête et aussi dans le corps. Chez le rat, les différences dans le cycle lumière-obscurité de l'expression de *Per2* et *Bmal1* et en opposition de phase sont présents dans l'hippocampe du fœtus et dans la glande pinéale du fœtus. Les autres structures cérébrales n'ont pas été testées. Au niveau du corps, il n'a pas été trouvé d'oscillation dans le foie fœtal de souris, ce qui est cohérent avec les résultats d'autres études (Sladek et al., 2007). En revanche, une forte oscillation en opposition de phase à *Per2* et *Bmal1* n'a pas été trouvée dans la glande surrénale de fœtus de rat (Torres-Farfan et al., 2011). D'autres auteurs ont observé une expression postnatale circadienne de *Per1*: luc au jour de naissance dans la glande pinéale, le foie, la thyroïde et les glandes surrénales de rats (Yamazaki et al., 2009). Au total, nos données et les données disponibles dans d'autres études amènent deux conclusions: 1) les organes du fœtus ont des oscillateurs circadiens périphériques, qui peuvent être entraînés par des signaux circadiens maternels à très faible âge gestationnel; 2) les horloges circadiennes périphériques sont fonctionnels chez les fœtus de rongeurs à un âge gestationnel

où les oscillations des gènes de l'horloge circadienne du fœtus horloge sont absents dans les neurones des noyaux suprachiasmatiques.

En effet, malgré des signaux de synchronisation maternels et la lumière, l'activité de l'horloge circadienne peut également être modifiée par le temps et la qualité de la prise alimentaire (Damiola et al., 2000; Mendoza et al., 2007). Les résultats présentés ici montrent de fortes différences dans l'expression des ARNm de gènes de l'horloge circadienne pour des mères souffrant de malnutrition pendant et après la gestation / allaitement (65 jours après le début de la grossesse, ce qui correspond, à 23 jours après le sevrage lorsque le régime standard était re-distribué) entre les embryons et les rats témoins et leurs correspondants en régime hypoprotéique et surtout entre et 35 jours d'âge. Nous fournissons un accès *ad libitum* à la nourriture. Par conséquent, les changements dans les rythmes circadiens, n'ont pas été imposés par la consommation le rythme d'accès à la nourriture, mais probablement à cause du régime en faible teneur en protéines.

Nous devons faire une mention spéciale sur les rats vieux de 35 jours. Les effets de la restriction périnatale en protéines sur l'horloge circadienne étaient encore présents deux semaines après le remplacement du régime à faible teneur en protéines avec le régime standard du laboratoire. La signification de cette observation réside dans le fait que la malnutrition périnatale est un facteur de risque majeur pour le développement du syndrome métabolique. Des études épidémiologiques chez l'homme et des études expérimentales chez l'animal ont montré que les individus exposés à une carence nutritionnelle pendant le développement périnatal ont, une fois qu'ils atteignent l'âge adulte, plus de problèmes d'obésité, de diabète de type 2 et de maladies cardiovasculaires par rapport aux individus du même âge qui sont exposés à une alimentation équilibrée au cours de leur développement intra-utérine et néonatale (Hales et Barker, 2001).

Nos résultats ont d'autres implications intéressantes. Nous avons observé que les changements des niveaux du glucose dans le sang des mères pendant la grossesse (G17) se fait sans un changement en parallèle de l'ingestion alimentaire. Ces changements se sont produits à la fois chez les mères témoins et en régime hypoprotéique. Nascimento et al (2013) ont montré que le taux global de la glycémie n'est pas circadien mais a une période de 16,2h, qui correspond à la valeur de notre étude. Cela signifierait que les changements dans les rythmes circadiens des gènes étudiés chez les embryons et les rats souffrant de

malnutrition ne sont pas contrôlées par la mère, mais par le régime à faible teneur en protéines alimentaires. Un deuxième point intéressant est le fait que la restriction en protéines pendant la grossesse et l'allaitement ont modifié de façon permanente le rythme des différents transcrits dans les fibroblastes, ce qui constitue une preuve solide que l'horloge circadienne a été programmée sur le plan nutritionnel. Cette proposition est également soutenue par nos récents résultats montrant que la programmation de l'horloge circadienne en raison de la malnutrition dans la période critique du développement peut contribuer à modifier le métabolisme énergétique, en particulier dans les organes périphériques, ce qui peut favoriser les troubles du développement l'âge adulte métabolique (Orozco -Sólis et al., 2010).

Après toutes ces analyses et le fait que les embryons adaptent en permanence leur programme de développement pour optimiser l'utilisation des nutriments maternels pendant la gestation (Fleming et al., 2015), nous pensons que les réponses sur les mères observés dans les rythmes de glucose sans changement de leur consommation alimentaire signifieraient que le changement dans les rythmes circadiens des gènes étudiés chez les embryons et les rats souffrant de malnutrition ne sont pas induits par la mère, mais par la faible teneur en protéines du régime de ces mères. En outre, plusieurs changements observés dans nos embryons provenant de mères nourries sur le régime à faible teneur en protéines pendant la grossesse (G17) pourraient être de protéger le jeune durant sa vie postnatale et probablement contribuer à une remise en forme compétitive de la descendance. Cependant, la croissance résultante, d'autant plus chez nos rats alimentés sur un régime faible en protéines, affecte négativement la santé à long terme avec un risque élevé de maladie de l'adulte. Nous soutenons que ces réponses reflètent la plasticité du développement périnatal de l'environnement et des «décisions» prises par embryons pour optimiser leur propre développement, mais avec des conséquences durables. Cet arrangement après la naissance serait postnatal par intégration des horloges circadiennes périphériques fœtales dispersées dans un système circadien adulte contrôlé par les noyaux suprachiasmatiques et contrôlé par le cycle lumière-obscurité. Lorsque des situations particulières pendant la gestation (composition du régime alimentaire, par exemple) peuvent être ciblées spécifiquement sur des horloges périphériques fœtales, cela conduit à des effets métaboliques à long terme dans la descendance, ce champ nouveau d'investigations commence tout juste à être exploré, en particulier au niveau des voies moléculaires.

De futures études pourraient intégrer la description de Brown et al (2005) dans des fibroblastes humains qui est en faveur d'une seule horloge circadienne par fibroblaste et nos résultats qui sont clairement en faveur d'une capacité altérée de ré-induction de l'horloge circadienne dans une population de fibroblastes ayant une histoire périnatale qui dépend du donneur. La transcription de l'ARNm Per2 a été associée à l'initiation du cycle circadien. Nos résultats suggèrent clairement que la survie des petits soumis à une restriction protéique pendant la vie périnatale a un coût, une forte dérégulation de l'initiation du cycle circadien.

## 6 Considérations finales

On croit que le style de vie moderne, qui exige de grandes capacités de conditions physiques, mentales et sociales des individus, est la principale cause des niveaux élevés de stress, des symptômes d'anxiété, du stress, des perturbations du rythme de sommeil et de l'alimentation. Cette détérioration de la qualité de vie a été associée à une incidence accrue de maladies telles que l'obésité et le diabète.

Ces maladies chroniques ont généralement de multiples facteurs de causalité. L'une est la malnutrition périnatale, qui contribue de manière importante à des problèmes dans la régulation du métabolisme de l'énergie associée à l'obésité, l'augmentation de la susceptibilité à développer des changements qui favorisent les dommages au métabolisme tels que les changements dans la tolérance au glucose, la pression artérielle et l'augmentation du taux des triglycérides. Actuellement beaucoup de recherches sur les manipulations nutritionnelles précoces et leurs répercussions à l'âge adulte, ont utilisé comme modèle principal la restriction protéique maternelle (Snoeck, Remacle et al., 1990).

On croit que cette «programmation nutritionnelle» en raison d'un apport protéique réduit ou déficitaire est causée par des changements dans l'horloge circadienne lors la période critique du développement (**REF**). L'horloge circadienne influence la balance énergétique, affecte l'appétit, le niveau du métabolisme, les profils d'activité, le sommeil et la réponse au stress. Cette programmation a été également impliquée dans l'homéostasie du corps, ainsi que dans les réponses aux défis environnementaux. Désormais, nous avons des preuves substantielles fondées sur des études expérimentales que l'environnement périnatale peut affecter les rythmes circadiens. Cependant, les mécanismes comportementaux et moléculaires impliqués dans les mères et leurs jeunes doivent encore être élucidés. Donc, nous considérons comme pertinentes les investigations de cette thèse qui s'intéresse à la relation entre le régime alimentaire et les rythmes comportementaux, métaboliques et moléculaires chez les rates gravides et leur progéniture.

Dans une première étape expérimentale (Expérience 1), nous avons supposé que la restriction protéique périnatale chez les rats modifiait les rythmes circadiens des principaux gènes de l'horloge circadienne dans les fibroblastes des mères et leur progéniture. En outre,

nous avons émis l'hypothèse qu'il y aurait une induction maternelle des rythmes circadiens de leur foetus. En effet, on observe de fortes différences entre les groupes Hypoprotéique / Témoin pour les mères et leurs embryons. Plus intéressant, était la réalisation que les rythmes de gènes de l'horloge, *Bmal1* principalement dans toutes temps expérimentaux, étaient très différents entre l'état « gestation » et après l'allaitement à la fois dans les témoins et les animaux souffrant de malnutrition. En outre, nous avons observé que la capacité de ré-induction des transcrits de l'horloge circadienne des fibroblastes des mères et de leur progéniture sont très différents, ce qui suggère que la programmation nutritionnelle serait de sélectionner les rats avec de nouvelles capacités de synchronisation. Cependant, cette capacité n'est pas la même pour certains gènes étudiés, ce qui suggère également que la ré-induction des rythmes des fibroblastes du foetus dépend de l'âge gestationnel.

Les résultats liés aux différences moléculaires entre les rythmes circadiens pendant et après la gestation / allaitement nous ont amenés à examiner si cette différence dans l'expression des gènes entre ces états physiologiques pourrait être causée par différents taux d'alimentation au cours de ces périodes. Le taux de glucose a également été modifié, on voit que *bmal1* est un gène essentiel pour le métabolisme du glucose. Par conséquent, dans la seconde étape (expérience 2), nous avons supposé que le rythme circadien de la prise alimentaire et la glycémie des mères avant et après la gestation / lactation serait sur un rythme similaire mais différent pendant la gestation. En effet, la consommation d'aliments, avant et après le sevrage étaient similaires, mais ils l'étaient également pendant la gestation. Bien que les rythmes alimentaires soient similaires au cours des phases des expériences, le rythme de la glycémie a été fortement changé au cours de la gestation par rapport à la période pré-conceptuelle, en particulier chez les animaux souffrant de malnutrition. Ce phénotype métabolique nous amène à croire qu'il est causé par un changement moléculaire dans l'horloge périphérique et non pas par un changement dans le comportement de la rate, comme initialement supposé.

En bref, notre thèse est clairement en faveur d'une capacité altérée de ré-induction de l'horloge circadienne d'une population de fibroblastes qui dépend de l'histoire nutritionnelle périnatale du donneur. En outre, divers changements observés dans nos embryons souffrant de malnutrition pendant la grossesse peuvent signifier une tentative de protéger la descendance pendant la vie postnatale. Cependant, la croissance résultante, et ce d'autant plus dans nos

ratons alimentés sur un régime à faible concentration en protéines pendant la période périnatale, affecte négativement la santé à long terme avec un risque élevé de maladie chez l'adulte. Le type de régime alimentaire pendant la grossesse et l'allaitement semblent se concentrer sur les horloges circadiennes périphériques fœtales, conduisant à des effets métaboliques à long terme dans la descendance, cependant, les mécanismes sous-jacents doivent encore être clarifiés.

## 6.1 Perspectives

Nous avons observé dans cette thèse que la réduction de l'apport de protéine chez la mère pendant la gestation et l'allaitement induit des modifications moléculaires et métabolique chez les mères et leurs progéniture. Nous avons aussi observé que le taux de glucose sanguin total des mères en restriction protéique pendant la grossesse était significativement inférieur à celui d'avant la grossesse, sans montrer, cependant, des altérations dans le rythme de la prise alimentaire.

Ces résultats nous amènent à réfléchir sur plusieurs voies d'études futures, surtout pour savoir quels sont les mécanismes moléculaires de la dénutrition qui affectent le métabolisme. Par exemple, savoir les interactions entre le complexe Clock/Bmal1 et les co-régulateurs de la transcription PGC-1alpha PRC avec les gènes régulant le métabolisme énergétique afin d'identifier des marqueurs moléculaires du risque de développement de l'obésité et du syndrome métabolique. Puis, compte tenu du rôle pivot de Sirt1 et de PGC-1-alpha dans les interactions entre le métabolisme énergétique et l'horloge circadienne, nous proposons que les altérations de l'horloge consécutives à la dénutrition périnatale résulteraient de la « programmation » de ces deux senseurs nutritionnels. Afin de tester cette hypothèse, nous pourrions évaluer le niveau d'expression et d'activité de Sirt1 au cours du cycle circadien chez les animaux contrôles versus les animaux dénutris.

En plus, nous pourrions poser une question de santé plus générale. Pourtant, il reste à établir comment compenser les altérations induits par la programmation métabolique précoce. En vue des ces question, nous proposons trois perspectives pour ce travail :

- Définir la participation de la voie de signalisation Sirt1/PGC-1alpha dans la programmation nutritionnelle de l'horloge circadienne



- Préciser en termes moléculaires les interactions entre Clock et le co-régulateur de la transcription PRC et définir le rôle de ces interactions dans la régulation de l'horloge circadienne;
- Proposer une stratégie pour compenser les altérations induites par la dénutrition périnatale.

# 1 Apresentação

As doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) são as principais causas de morte no mundo, correspondendo a 63% dos óbitos em 2008. No Brasil, esses números alcançam 72% das causas de morte. Entre estas doenças, estão as cardiovasculares, o diabetes mellitus, vários tipos de cânceres, entre outros. Nos últimos anos, tem sido estabelecido que estímulos ambientais, como a nutrição perinatal e o estresse, contribuem de maneira importante para o desenvolvimento de obesidade e das DCNT (Brasil, 2006).

Acredita-se que o estilo de vida moderno, por exigir grande capacidade de adaptação física, mental e social dos indivíduos, seja o principal causador destes níveis mais frequentes de estresse, sintomas de ansiedade, tensão, alteração do ritmo do sono e do padrão alimentar. Este agravo da qualidade de vida tem sido relacionado a uma maior incidência de doenças como a obesidade e diabetes (KARLSSON et. al., 2001; KNUTSSON, 2003).

As doenças crônicas em geral, possuem múltiplos fatores causais. Dentre estes figuram a associação entre o baixo peso ao nascer e o aumentado risco para desenvolvimento de obesidade, diabetes e doenças cardiovasculares. O reduzido aporte de nutrientes e/ou energia, tem sido considerado um dos fatores mais relevantes no desencadeamento do baixo peso ao nascer (Hales & Barker, 1992, 2001; Langley-Evans, 2000; Gluckman & Hanson, 2004). O déficit de peso corporal ao nascimento por sua vez se associa a alterações funcionais e morfológicas no sistema nervoso que resultam em déficits cognitivos e alteradas respostas ao estresse e ingestão alimentar. Igualmente, promovem desorganização no metabolismo energético entre os órgãos periféricos resultando em elevado risco de ocorrência de doenças crônicas não comunicáveis (Barros, Manhaes-De-Castro Et Al., 2006; Barreto-Medeiros, Queiros-Santos Et Al., 2007; Lopes De Souza, Orozco-Solis Et Al., 2008; Toscano, Manhaes-De-Castro Et Al., 2008; Hales and Barker, 2001; Ozanne and Hales, 2002).

Observações epidemiológicas sustentam a associação entre baixo peso ao nascer e risco futuro do desenvolvimento de obesidade, diabetes e doenças cardiovasculares (REFE). Estes estudos epidemiológicos, reforçados extensivamente por experimentações com animais, conduziram a formulação da hipótese da "programação metabólica". (LUCAS, 1991), depois modificada para "programação nutricional". De acordo com essa hipótese, a redução do

aporte nutricional durante período de desenvolvimento promove uma “programação nutricional” que permitirá ao organismo sobreviver em condições nutricionais restritas posteriormente. No entanto, quando o organismo é submetido à nutrição normal ou em excesso, a incompatibilidade entre sua programação fisiológica e o novo ambiente nutricional gera a síndrome metabólica, caracterizada por 3 ou mais sinais como a intolerância à glicose, hipertensão arterial e taxas aumentadas de triglicérides (HALES and Barker, 2001; OZANNE and HALES, 2002)

Acredita-se que esta “programação nutricional” devido ao aporte nutricional reduzido ou deficitário perinatal seja causada por alterações no relógio circadiano no período crítico do desenvolvimento. O relógio circadiano influencia o balanço energético, afetando o apetite, a taxa metabólica, os padrões de atividade, sono e as respostas ao estresse. Ele também estaria implicado na homeostase corporal, assim como nas respostas aos desafios ambientais (PIMENTA et. al., 2012). Atualmente, já há evidências substanciais de estudos experimentais que o ambiente perinatal pode afetar os ritmos circadianos, porém, os mecanismos comportamentais e moleculares ainda necessitam ser melhor elucidados.

Os ritmos circadianos são controlados pelo relógio biológico central localizado no núcleo supraquiasmático do hipotálamo. As células osciladoras desse relógio são sincronizadas pela luz captada pela retina e regulam o metabolismo energético, influenciando processos como a ingestão alimentar e a expressão, secreção e atividade de hormônios e enzimas metabólicas através de sinais neuronais e endócrinos (BARCLAY et. al, 2012; OISHI e ITOH, 2013).

Sabe-se que o ritmo diário de atividades das células como a síntese de proteínas, enzimas e hormônios responde a uma expressão de genes sincronizada. Estes genes são influenciados, sobretudo, pelo ciclo luz-escurecimento. Sendo assim, o que explicaria a relação entre o ritmo biológico, a expressão dos genes e as repercussões metabólicas seria a ligação entre as bases moleculares do relógio central e das proteínas/enzimas chaves do metabolismo energético. Desta forma, a falta de sincronização entre o ciclo circadiano e o padrão alimentar levaria a alterações na expressão dos genes relacionados ao ritmo circadiano, trazendo consequências para o metabolismo do indivíduo, além de uma maior propensão ao aparecimento de doenças crônicas (FROY, 2010; REZNICK et. al., 2013).

Um padrão alimentar alterado no período crítico do desenvolvimento pode determinar disfunções cerebrais na vida adulta. Estudo prévio publicado pelo nosso grupo de pesquisa observou que ratos nascidos de mães que foram alimentadas com uma dieta restrita em proteínas apresentam, após o desmame, um aumento da ingestão alimentar (hiperfagia) e desenvolvem na idade adulta alterações corporais e metabólicas características de obesidade, como aumento do tecido adiposo abdominal concentração elevada de triglicerídeos e ácidos graxos livres no soro. Estas anormalidades são associadas a uma alteração no consumo alimentar durante o dia além de uma abolição do perfil circadiano de expressão dos genes do relógio e dos genes envolvidos com a regulação da ingestão alimentar e do despêndio energético no hipotálamo e no fígado (Orozco-Solis et al., 2009).

Essa relação entre o ciclo circadiano alterado e desordens metabólicas é sustentada por estudos com animais com mutações em genes que regulam o ritmo circadiano como o gene Clock. Estudos relataram que esses animais são susceptíveis a obesidade e síndrome metabólica, além de apresentar alterações na ritmicidade circadiana, na ingestão alimentar diurna e aumento do IMC (SHI et. al., 2013). Animais mutantes do gene Clock também apresentam níveis aumentados de leptina, glicose, colesterol e triglicerídeos em relação a seus controles (TUREK et. al., 2005).

Além dos osciladores centrais, os tecidos periféricos como o fígado, o músculo esquelético e também as células fibroblásticas também possuem sua maquinaria molecular de ritmicidade circadiana. Um exemplo disso é a atividade antecipatória da alimentação que os animais apresentam de acordo com o horário do dia em que o alimento é diariamente disponibilizado (YOUNG e BRAY, 2007). Essa atividade se caracteriza por aumento da atividade locomotora, da temperatura corporal, da liberação de hormônios e enzimas envolvidos no processo digestivo e tem como objetivo coordenar processos fisiológicos com o horário da alimentação (MENDONZA, 2008; MISTLBERGER, 2009). A falta de sincronização do ritmo circadiano periférico com o ritmo central também estaria associada às desordens metabólicas como acúmulo de gordura visceral e dislipidemias encontradas nos animais que se alimentam no período claro.

Estudos evidenciam que, independentemente da dessincronização causada por fatores ambientais externos, como o ritmo da alimentação, a gestação por si própria, pode levar a mudanças específicas nesta sincronização entre o relógio circadiano central e os periféricos.

Em ratas gestantes diurnas “Nile”, a fase dos ritmos de atividade e temperatura foram semelhantes aos de animais não-gestantes, porém a amplitude estava diminuída (SCHRADER et al, 2009). Em contrapartida, ratos com atividade noturna não apresentavam diferença na amplitude e na fase do ritmo de atividade e temperatura (KITTRELL and SATINOFF, 1998). Seguindo a linha que a gestação normal afeta o sistema circadiano materno, um estudo recente comparando os ritmos de expressão proteica de Fos e Per2 no núcleo supraquiasmático na zona ventral subparaventricular de ratas gestantes e no período entre dois ciclos estrais (diestrus), detectou várias diferenças funcionais. Estes resultados foram interpretados como uma indicação de uma reorganização funcional destas regiões durante a gestação.

Assim, questiona-se: Através de quais mecanismos a gestação e a desnutrição proteica materna influenciam, em termos comportamentais e moleculares, o controle do relógio circadiano?

## 2 Revisão Bibliográfica

### 2.1 O relógio circadiano - Histórico

Registros escritos de observações em fisiologia circadiana são encontrados desde a invenção da linguagem escrita. Os primeiros seres humanos devem ter reconhecido a ritmicidade diária no ambiente e seu impacto sobre seu próprio ciclo diário de sono e vigília. O estabelecimento de relógios e calendários é uma evidência dessa consciência. O relógio de sol, que indica a hora do dia em função do tamanho e da direção da sombra projetada pelo sol foi talvez o primeiro relógio feito pelo homem. Os egípcios usavam obeliscos como relógios de sol há mais de 5500 anos atrás (Jespersen & Fitz-Randolph, 1999). Cerca de 3000 anos atrás, os caldeus na Mesopotâmia criaram um sistema de medição de tempo não-decimal sofisticado. Este sistema foi o que gerou o nosso próprio sistema. O Dia Caldeu, no entanto, foi dividido em 12 longas horas em vez das 24 horas que são adotadas hoje. Um decreto emitido na França, em 1793, estabeleceu uma divisão decimal do dia, mas foi revogado dois anos depois (Audoin & Guinot, 2001). Exceto por este breve acontecimento, a partição de um dia em 24 horas e de uma hora em 60 minutos é um padrão global por séculos.

Muitos comentaristas da história da fisiologia circadiana apontam para Jean-Jacques Mairan como a primeira pessoa a demonstrar que os ritmos diários são talvez gerados endogenamente (Bining, 1964; Foster & Kreitzman, 2004). Mairan (1678-1771), que era um astrônomo francês, observou a planta *Mimosa pudica* e observou que ao contrário do movimento vertical das folhas da árvore de tamarindo, as folhas desta planta dobravam-se ao longo da noite, e abriam-se durante o dia. Quando ela era colocada em um lugar totalmente escuro, ele notou que a abertura das folhas ainda acontecia na parte da manhã e dobrava-se à noite (Mairan, 1729). Isto indicava um ritmo diário que não requeria um ritmo diário de luz solar. Esta observação particular não determina a existência de ritmicidade endógena. Outros fatores ambientais além da luz poderiam ter causado a abertura das folhas.

Após esse estudo de Mairan, outros fisiologistas trouxeram algumas contribuições para os ritmos circadianos, porém foi a partir do século 20 que a sofisticação das pesquisas permitiu um grande avanço nessa área. Pesquisadores demonstraram o ritmo da temperatura corporal de macacos mantidos em ciclos claro-escuro, luz constante e escuridão constante (Simpson & Galbraith, 1906). Outros da segunda metade do século 20 realizaram uma extensa

pesquisa nos ritmos circadianos em animais de laboratório e pacientes humanos (Richter, 1985) e estudaram a fisiologia do sono e ritmos circadianos em humanos (Kleitman, 1963). Sem dúvidas, a década de 1950 foi a mais promissora para o avanço da fisiologia circadiana.

O trabalho em fisiologia circadiana durante o século 21 foi construído a partir do grande progresso feito durante a segunda metade do século 20. O número de artigos publicados em fisiologia circadiana cresceu de menos de 200 artigos por ano em 1965 para quase 2000 artigos por ano em 2000 (Refinetti, 2006). Hoje, em contraste com as crenças anteriores, o relógio circadiano não é uma propriedade restrita a redes neuronais, mas um sistema em cada célula e pode, portanto, operar bem antes do estabelecimento de um sistema nervoso funcional (Vallone et al., 2007).

## **2.2 O balanço circadiano**

### **2.2.1 Os *Zeitgebers* (« sincronizadores »)**

O balanço circadiano oscila em função da hora do relógio interno (que é controlado pelas indicações dos sinais externos do dia e noite). Já o balanço homeostático funciona como uma ampulheta em função do tempo que se passa acordado ou dormindo. As diferentes condições do equilíbrio do sistema dependem, então, das necessidades do sono do indivíduo (campo genético) e das restrições externas a que ele deve se submeter (horários atípicos de trabalho, privação do sono, descansos, etc.) (Moore, 1997; Reilly, Atkinson and Waterhouse, 2000).

Neste contexto, o balanço circadiano é modulado por quatro fatores externos importantes: a luz, a temperatura, a alimentação e a vida social. Eles ajudam a sincronizar o período principal de sono sobre a alternância entre dia e noite. Tradicionalmente eles foram batizados pelos alemães como os “Zeitgeber” (“sincronizadores”). Influenciam diretamente o relógio interno. A espécie humana obedece a um ritmo estritamente diurno. Já os ratos são indiferentemente diurnos ou noturnos, visto que o ritmo circadiano deles depende da disponibilidade de comida que é, em cada espécie, um fator externo do relógio muito potente (Grandin, Alloy and Abramson, 2006).

O ritmo do balanço circadiano (mensurado pelo ciclo da temperatura) é dependente da ação de um hormônio cerebral: a melatonina, secretada sobre o efeito de enzimas cuja atividade é comandada pela percepção da luz através dos olhos (Arent, 2005). A sonolência não é, então, induzida pela voluntariedade do indivíduo. Os períodos mais fortes de sonolência resultam da baixa de temperatura central. A depender se o indivíduo é matutino ou vespertino, a curva de temperatura e o pico de melatonina são ligeiramente retardados ou avançados um em relação ao outro. As experiências de isolamento temporal mostram que os sujeitos privados de sono, por exemplo, apresentam o mesmo ritmo circadiano e as oscilações da curva de temperatura permanecem muito estáveis. Porém, para a maioria das pessoas, o ritmo sono-vigília muda gradualmente apresentando períodos de sono em defasagem com as chamadas “portas do sono” (que são os períodos de menor temperatura durante o dia) (Dément, 1976).

Além da luminosidade, outro “Zeitgeber” importante é o exercício físico, que também interfere na temperatura e nos ritmos endógenos do nosso corpo. A ação da melatonina sobre a queda de temperatura durante a noite é mais pronunciada se o organismo estava “quente” durante o dia. Os esportes de endurance (corrida, futebol, natação, etc) são tradicionalmente associados a um sono mais profundo (Li et al., 2004; Guimarães et al., 2008). Somando-se a estes dois “Zeitgebers”, encontramos ainda controlando os ritmos circadianos: a qualidade/horário das alimentações (Waterhouse et al., 2003; de Castro, 2004) e os contatos sociais (prazer, amor, tristeza) (Grandin, Alloy & Abramson, 2006).

## 2.2.2 Estudos experimentais

Os mecanismos deste controle e desenvolvimento do relógio circadiano e seus sincronizadores têm sido estudados extensivamente. Muitas semelhanças entre os sistemas de moscas e vertebrados ao nível molecular tornaram possível a identificação dos mecanismos-chaves deste processo (Apostol-Smith & Kay, 2000; Panda et al., 2002b; Gilbert, 2003). Diversas linhas de evidência apontam para um pequeno número de neurônios agrupados no cérebro como o local de marcapasso central responsável por dirigir os ritmos de atividade locomotora em adultos. (Handler e Konopka, 1979).



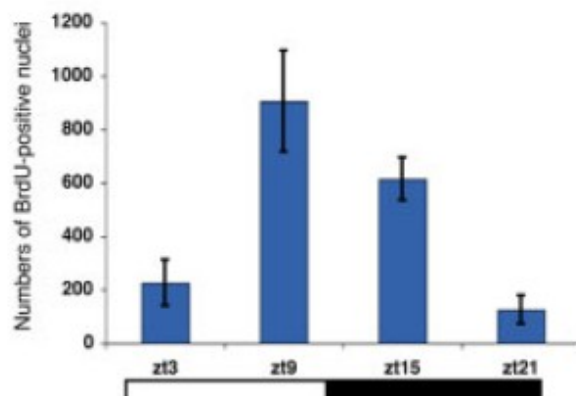
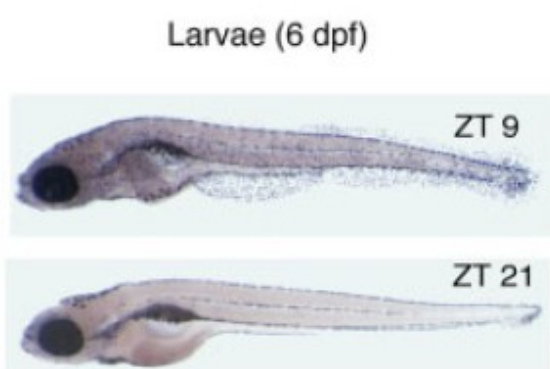
No entanto, nem toda a demanda do relógio é regida pelos neurônios do marcapasso central. Estudos moleculares identificaram ritmos circadianos de expressão dos genes do relógio na maioria dos tecidos periféricos. Eles persistem mesmo em cultivos de *Drosophila* com seus segmentos dissociados do corpo (cabeça, tórax, ou abdômen), bem como na probóscide, antenas, margens da asa anterior e as pernas (Plautz et al., 1997; Krishnan et al., 1999; Tanoue et al., 2004). Um das mais intrigantes propriedades desses relógios periféricos é que eles podem ser controlados por exposição direta ao ciclo claro-escuro, mesmo *in vitro*, prevendo a expressão generalizada de um fotopigmento (Plautz et al., 1997).

Na *Drosophila*, nem a ablação genética de olhos nem as mutações bem caracterizadas das vias de fototransdução visuais (por exemplo, *norpA*, uma mutação que afeta a via de sinalização da fosfolipase C) bloqueiam completamente o controle do relógio circadiano pela luz. A explicação para este achado é que o criptocromo (Cry), expresso nos neurônios do relógio, também desempenha um papel crucial no controle fótico do relógio da mosca (Stanewsky et al., 1998). Assim, o relógio circadiano só é "cego" em moscas que carecem de todas as estruturas oculares externas e internas bem como a expressão de Cry (Helfrich-Forster et al., 2001).

A luz em *Drosophila* e vertebrados parece desempenhar um importante papel no desenvolvimento do controle do relógio circadiano. Porém, como o relógio perceberia a luz nestes estágios iniciais? Na *Drosophila*, a luz é capaz de controlar o oscilador presente no cérebro na primeira fase larval. Nesta fase de desenvolvimento, nenhuma das estruturas fotorreceptoras clássicas dos adultos estão presentes. Parece provável que a percepção de luz envolve o Cry que já está expresso nos neurônios do relógio nesta fase precoce do desenvolvimento (Klarsfeld et al., 2004). Além disso, as larvas possuem estruturas fotorreceptoras simples: os Órgãos de Bolwig (BOs). Estas estruturas emparelhadas, cada uma composta por 12 células fotorreceptoras, têm sido implicadas na capacidade da larva em montar a resposta fotobiótica (Hassan et al., 2000; Mazzoni et al., 2005). Os Nervos de Bolwig (BNs) são os responsáveis por projetar as informações dos BOs até o cérebro. Durante o desenvolvimento da *Drosophila*, os BOs são substituídos por estruturas fotorreceptoras do adulto. O estabelecimento desse novo *input* dessas novas estruturas do adulto para o cérebro também coincide com remodelação significativa dos neurônios do cérebro (Malpel et al., 2002).

Já nos vertebrados, o surgimento da função do relógio foi estudado mais amplamente no peixe-zebra (Vallone et al., 2005). As vantagens oferecidas por esta espécie para a análise genética molecular do desenvolvimento precoce dos vertebrados fazem com que este modelo seja ideal para explorar as origens e funções iniciais do relógio circadiano (Nüsslein-Volhard e Dahm, 2002). Porém: quando os ritmos circadianos são detectados pela primeira vez durante o desenvolvimento do peixe-zebra? Após a eclosão, ritmos circadianos de alta amplitude da atividade locomotora são evidentes assim que as larvas começam a nadar ativamente e procurar comida (a partir do dia 5 pós-fertilização). O aparecimento destes ritmos é dependente da exposição ao ciclo claro-escuro durante os primeiros 4 dias de desenvolvimento (Hurd e Cahill, 2002).

O aumento da taxa de desenvolvimento nesses animais através do aumento da temperatura não avança o tempo de aparecimento desses ritmos. Assim, parece que o número de ciclos claro-escuro em vez do estágio de desenvolvimento é o fator determinante para o aparecimento do ritmo circadiano do ciclo celular (Dekens et al., 2003, Figura 1). Os ritmos circadianos da síntese de melatonina surgem muito antes. Na presença de um ciclo claro-escuro, um aumento significativo de melatonina noturna é detectado pela primeira vez na segunda noite pós-fertilização. Este é um resultado confirmado pelo padrão de expressão do ARNm de *zfaanat2* na glândula pineal (Gothilf et al., 1999; Kazimi e Cahill, 1999). Um ritmo circadiano da síntese de melatonina persiste posteriormente após a transferência para escuridão constante



**Figura 1 - Os ritmos circadianos de proliferação celular em larvas do peixe-zebra.** Esquerda: Uma impregnação total de bromodeoxiuridina (BrdU) revela um ritmo dia-noite de alta amplitude na frequência de núcleos na fase S (azul manchado) na pele de larvas após seis dias de fertilização (DPF) submetidas a um ciclo claro-escuro. Larvas representativas no pico de tempo (ZT9) e durante o tempo (ZT21). Direita: A quantificação de números de núcleos em fase S (BrdU-positivo), contados na pele entre a bexiga e o ânus (Dekens et al., 2003).

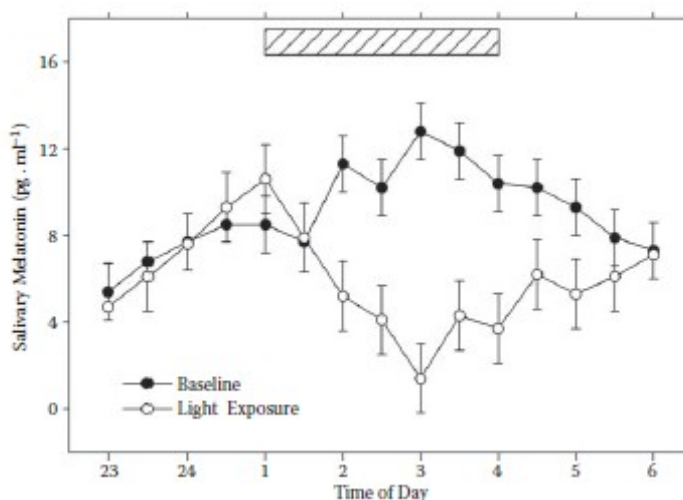
Após o trabalho com a *Drosophila* e com o peixe-zebra, foi inevitável a pergunta: como e quando durante o desenvolvimento do mamífero o sistema circadiano é capaz de responder à luz? Já se sabe que as células ganglionais fotorreceptivas da retina que expressam melanopsina são consideradas como as principais estruturas fotorreceptoras circadianas (Berson et al. 2002; Hattar et al., 2002). A expressão do gene da melanopsina é detectada pela primeira vez a partir do 10º dia embrionário durante o desenvolvimento da retina de camundongos, que coincide com o surgimento das células ganglionais fotorreceptivas da retina (Tarttelin et al., 2003). Estas são responsivas à luz a partir do momento do nascimento e forma conexões funcionais com o núcleo supraquiasmático do hipotálamo (NSQ) a partir da indução da expressão de genes pela luz.

De interesse, ao nascimento, a densidade de células ganglionais da retina é 5 vezes maior do que na retina adulta (Sekaran et al., 2005). O porquê de tantas células durante desenvolvimento precoce continua indefinido. Uma possibilidade é que haja "excesso" de células ganglionais, que então competiriam para a geração de sinapses funcionais com os seus neurônios-alvo, um meio de garantir uma "confiança" para a formação das conexões (Kandel et al., 2000). Tomados em conjunto, esses resultados apontam para o momento do aparecimento de um mecanismo de entrada de luz funcional coincidindo com o primeiro surgimento de função de relógio circadiano.

### 2.2.3 Papel da melatonina

A melatonina é um hormônio sintetizado principalmente na glândula pineal (nos olhos também) e secretada na circulação. A melatonina não é um particularmente um hormônio importante para os principais sistemas fisiológicos, porém ela tem recebido uma atenção especial dos fisiologistas circadianos por causa do seu papel central no fotoperiodismo, o que afeta múltiplos sistemas fisiológicos nos organismos que são dependentes desses ritmos relacionados à luz do dia.

A melatonina também atua na modulação dos ritmos circadianos e é conhecida como um importante controlador nos vertebrados não-mamíferos.. Sua secreção já foi descrita em peixes (Bayarri et al., 2004), répteis (Jessop, Limpus and Whittier, 2002), pássaros (Tarlow et al., 2003) e mamíferos, incluindo roedores (Nakahara et al., 2003) e humanos (Selmaoui and Toutou, 2003). Ela é secretada na alternância do dia para noite, particularmente porque ela é inibida pela luz durante o dia, como mostrado na Figura 2. Estes dados foram registrados em humanos, mas eles claramente mostram que a exposição à luz durante a noite pode inibir dramaticamente a secreção de melatonina. Para determinar se a ritmicidade na secreção de melatonina não é meramente o resultado na inibição fótica durante o dia, medidas deveriam ser conduzidas em escuridão constante. Estudos em ovelhas foram realizados e confirmaram a persistência de ritmicidade em escuridão constante (Johansson et al., 2001).



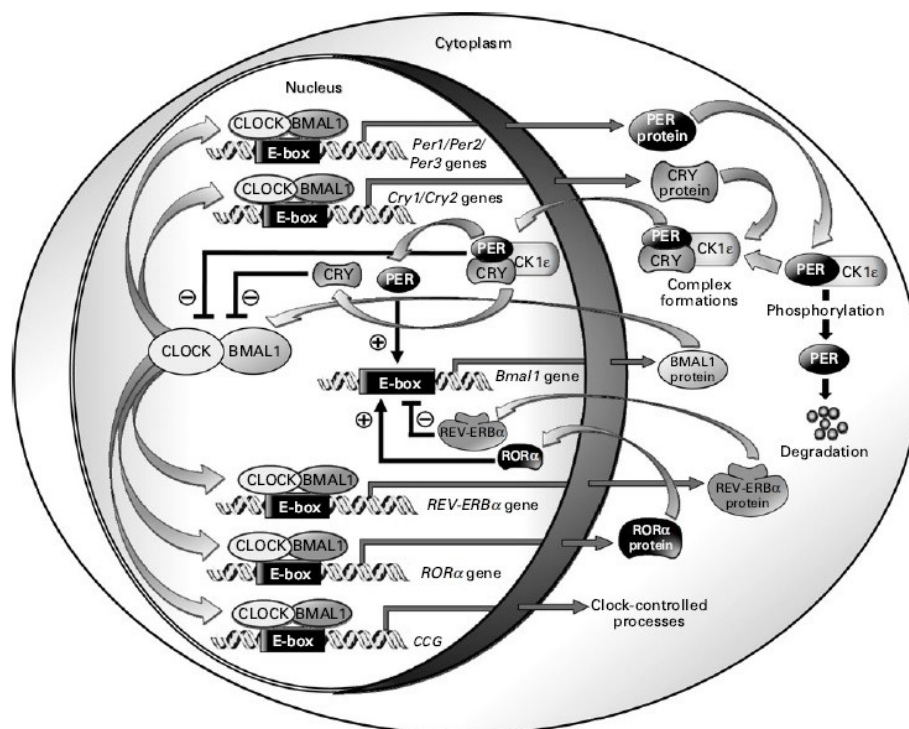
**Figura 2 - Supressão da melatonina pela luz.** Embora a secreção da melatonina segue um ritmo circadiano na ausência de um ambiente luz-escuridão, a luz tem um efeito supressivo na secreção dela. Os dados desta figura são representados como média ( $\pm$  DP) de 7 humanos mantidos em luz constante (baseline) ou exposto a luz por 3 horas (light exposure). A secreção de melatonina foi medida como a concentração de melatonina na saliva em intervalos de 30 minutos. A barra hachurada horizontal indica a duração da exposição à luz. Note que ambas as curvas exibem ritmicidade circadiana, mas a curva da condição "Light exposure" também exibe uma supressão da melatonina induzida pela luz. (Fonte: Hébert, M. et al. (2002). The effects of prior light history on the suppression of melatonin by light in humans. *Journal of Pineal Research* 33: 198-203.)

## 2. 3 Ritmos circadianos em adultos

Em todos os animais, desde as plantas até as cianobactérias, as funções fisiológicas oscilam regularmente em um período de 24 horas. Essa variação rítmica, dita circadiana - do latim *circa*, em volta, e *dies*, dia – é assegurada por uma rede de osciladores moleculares chamado de relógio circadiano. Através dessa rede, o organismo integra os sinais do ambiente (alternância dos ciclos claro-escuro, ciclos alimentares...) e determina uma organização temporal de sua homeostase que, em um animal, pode ser representada pelo ciclo sono-vigília, frequência cardíaca, catabolismo de nutrientes e secreção de vários hormônios.

Em mamíferos, a localização anatômica do relógio se encontra no núcleo supraquiasmático do hipotálamo (NSQ), uma estrutura localizada na base do cérebro. Mas os sistemas de controle capazes de gerar as variações circadianas na expressão gênica estão também em outros núcleos hipotalâmicos, em outras estruturas cerebrais e em órgãos periféricos, como o intestino, músculo esquelético e fígado. A atividade de todos estes relógios periféricos é, entretanto, dependente do controle do relógio central.

À nível molecular, os elementos fundamentais do sistema do relógio são os fatores transcripcionais Clock (Circadian Locomotor Output Cycles Kaput) e bmal1 (Brain and Muscle Arnt-like protein 1), que se ligam a uma sequência particular do DNA, E-box, ativando a expressão de genes da família *period* (Per1-3) e *cryptochrome* (Cry1-2), assim como vários genes envolvidos na regulação do metabolismo lipídico e dos carboidratos. Quando a expressão das proteínas Per e Cry atingem um determinado nível no citoplasma, elas são transferidas para o núcleo e, prevenindo a união do dímero Clock/Bmal1 sobre o DNA, elas inibem a expressão dos seus próprios genes (Schibler & Sassone-Corsi, 2002). Subsequentemente, a eliminação do complexo inibitório Per / Cry pelo sistema proteossômico, libera o freio na atividade transcriptômica de Clock/Bmal1 (Figura 3). É estimado que através desse mecanismo, o relógio controla a expressão cíclica de 10% dos genes em uma célula durante um dia [Panda et al., 2002].



**Figura 3 – Mecanismo molecular central do relógio circadiano no núcleo supraquiasmático e tecidos periféricos (Cagampang and Bruce, 2012)**

O genoma dos mamíferos codifica mais de uma dúzia de genes associados à mecanismos de retroalimentação que constituem o relógio circadiano. A lista de genes do relógio é ainda em expansão com a descoberta de CHRONO (Anafi et al., 2014; Goriki et al., 2014). Além disso, o funcionamento dos relógios dependem de inúmeros fenômenos de compensação moleculares. Assim, BMAL2 é nitidamente capaz de compensar a atividade de BMAL1 a partir de uma insulinemia induzida em camudongos (Shi et al., 2013) ou em ratos hipertensos (Polidarová et al., 2013). Sobre um regime hiperlipídico, NPAS2 é um fator transcripcional limitante em fetos cuja *défaillance* é induzida pela dieta e restaurada pelo retorno à alimentação normal (Suter et al., 2011). A ligação entre o relógio circadiano e o catabolismo da glicose alimentar, por exemplo, é dada pelo estado *Redox* dos cofatores NAD(H) e NADP(H) que influenciam diretamente a capacidade dos complexos CLOCK:BMAL1 e NPAS2:BMAL1 se ligarem ao DNA celular (Rutter et al., 2001); principalmente sobre os promotores dos genes *Period*, onde o PERIOD2 foi associado ao metabolismo lipídico (Grimaldi et al., 2010). Nestes dois complexos multiprotéicos, os papéis de CHRONO e BMAL2 são ainda incertos. A atividade histona-acetil transferase de CLOCK (Doi et al., 2006) funciona em paralelo com a atividade deacetilase de SIRT1 diretamente

sobre o controle da fixação de NAD<sup>+</sup>. A transcrição de *bmal1* é também controlada pelo receptor nuclear Rev-erb- $\alpha$ , que modula a capacidade oxidativa do músculo esquelético regulando a biogênese mitocondrial e a autofagia (Woldt et al., 2013). Assim, em camundongos, o relógio circadiano facilita os ritmos de oxidação-redução que correspondem ao ciclo jejum-alimentação e maximizam a produção de energia durante o repouso (Peek et al., 2013).

Estes eventos moleculares do relógio são encontrados tanto dentro das células neuronais que não fazem parte do NSQ como também em tecidos periféricos, incluindo o coração (Peirson, et al., 2006; Young et al., 2001), fígado (Peirson, et al., 2006; Davidson et al., 2004), trato gastrintestinal (Konturek et al., 2011; Hoogerwerf et al., 2007) e pâncreas (Marcheva et al., 2010; Sadacca et al., 2011). Entretanto, a ritmicidade da expressão gênica do relógio em tecidos periféricos pode estar até 4 horas fora de fase em relação aos ritmos encontrados no NSQ (Peirson et al., 2006; Lee et al., 2001; Yoo et al., 2004). Isto se deve à organização hierárquica do relógio central, que envia sinais aos osciladores periféricos para manter os ritmos circadianos nestes tecidos. O ritmo de expressão circadiana de genes como *Per1* e *Rev-Erb* –  $\alpha$  em fibroblastos de animais em cultura, por exemplo, pode ser regulada pelos sinais enviados pelo NSQ (Li et al., 2008) Especula-se que há um atraso na recepção destes sinais centrais ou os sinais podem ser enviados em diferentes horários durante o dia para os diferentes tecidos dependendo da sua função. Por exemplo, algumas vias metabólicas têm que ser ativadas nos músculos em um horário particular do dia enquanto simultaneamente ocorre uma redução da atividade do trato gastrintestinal (Kreier et al., 2003). Então, o efeito oposto do tônus autonômico nestes tecidos redireciona o fluxo sanguíneo do abdômen para os tecidos envolvidos com o movimento.

Os mecanismos pelos quais o núcleo supraquiasmático do hipotálamo consegue alcançar essa tarefa não estão totalmente esclarecidos, mas pode envolver mediadores humorais como a prokineticina-2 (Li et al., 2006; Prosser et al., 2007), a vasopressina arginina (Kalsbeek et al., 2010; Kalsbeek et al., 1992), a citocina cardioplipina (Kraves & Weitz, 2006), o polipeptídeo intestinal vasoativo (Kalsbeek & Buijs, 1992), a orexina (Yi et al., 2009), o peptídeo ativado adenilato ciclase da hipófise (Yi et al., 2010), o fator de transformação do crescimento (Li, Sankrithi & Davis FC, 2002), ou a liberação do hormônio melatonina pela glândula pineal durante a noite (Moore, 1996; Engel et al., 2005).

O núcleo supraquiasmático do hipotálamo também pode comunicar os sinais temporais durante o dia com os tecidos periféricos através de impulsos neurais como a mudança rítmica no balanço simpático/parassimpático (Kalsbeek et al., 2008; Bujis et al., 2003). A projeção simpática, em particular, é crítica em manter os ritmos fisiológicos nos tecidos periféricos, como a homeostase da glicose pelo fígado (Cailotto et al., 2005; Kalsbeek et al., 2006). Além disso, a seletividade na comunicação entre o NSQ e os tecidos periféricos é de tal forma que os estímulos parassimpáticos e simpáticos do sistema nervoso autônomo são capazes de inervar diferentes compartimentos dentro do mesmo tecido.

As camadas de gordura subcutânea e intra-abdominais, por exemplo, são inervadas por neurônios motores simpáticos e parassimpáticos separados (Kreier et al., 2002). A entrada simpática nos adipócitos tem sido relatada ser essencial para a regulação dos ritmos diários de liberação de leptina dos depósitos de gordura (Kalsbeek et al., 2001). Assim, a alteração da saída autonômica a partir do NSQ pode resultar em um ritmo de desequilíbrio entre os diferentes compartimentos de gordura, e isto pode provocar o aumento do acúmulo de gordura e consequente obesidade (Kobayashi et al., 2004).

Além da luz do dia, outros fatores podem modificar o relógio central e / ou periférico. Estes incluem a temperatura corporal, refeições, alimentação restrita e exercícios físicos regulares (Schibler, Ripperger & Brown, 2003; Brown et al., 2002; Buxton et al., 2003). Estes fatores são particularmente importantes para o relógio circadiano em tecidos periféricos que não podem perceber sinais de luz do dia. Em contraste, o relógio central no NSQ é largamente sensível à luz e pode ser modificado pelo ciclo claro-escuro (Stokan et al., 2001; van Someren et al., 2007). Além disso, as conexões intercelulares dos relógios do NSQ permitem-lhes manter a coerência na geração de ritmos de forma indefinida *in vivo* e por várias semanas em explantes cerebrais (Liu et al., 2007). Em contraste, as células na periferia são menos comunicativas e rapidamente dessincronizam em animais com lesões no NSQ (Guo et al., 2006) ou em cultura de tecido (Yoo et al., 2004; Kornmann et al., 2007). Portanto, os ritmos gerados por osciladores nos tecidos periféricos devem ser regulados pelo relógio no NSQ de modo que eles possam ser sincrônicos um com o outro.

Para tecidos periféricos envolvidos em processos nutricionais e metabólicos, como o estômago, intestino, fígado e pâncreas, os horários de alimentação e a restrição desta alimentação tornam-se poderosos reguladores do relógio circadiano (Schibler, Ripperger & Brown, 2003; Hirota & Fukada, 2004). É importante ressaltar que as alterações nesses



sincronizadores periféricos poderiam desacoplar as fases dos relógios periféricos e centrais em condições normais e de forma indireta. Assim, quando a alimentação de animais, tais como roedores noturnos, são restringidas apenas para a fase clara do dia, os ritmos de atividade antecipatória para alimentação, para o metabolismo energético e para a expressão de genes em tecidos periféricos será regulada pela fase clara (Davidson , Castanon-Cervantes & Stephan, 2004; Escobar et al., 2004; Mistlberger, 2011), enquanto que o ritmo de expressão gênica do NSQ permanece regulado pelo ciclo claro-escuro (Dibner, Schibler & Albrecht, 2010, Stokan et al., 2001). Isto pode ser visto como um mecanismo adaptativo às mudanças na disponibilidade de alimentos, mantendo sincronia com o ciclo dia-noite. Mais interessante é o fato que não somente a transição de intensidade luminosa é capaz de modificar o NSQ, mas também a mudança de cores do ambiente (Walmsley et al., 2015). Esse achado pode revelar um novo mecanismo sensorial que informaria o horário do dia para quaisquer espécie de mamíferos que tenha uma visão cromática.

A sincronização dos relógios periféricos através da alimentação faz sentido porque o metabolismo circadiano tem uma grande influência em muitas células periféricas. No entanto, a exposição em longo prazo aos efeitos combinados de diferentes sinais moduladores do relógio circadiano pode resultar em má saúde metabólica. Trabalhos com turnos de longa duração, passagem frequente de vários fusos horários ou estilo de vida irregular com má qualidade de sono, onde as mudanças no padrão de atividade do sono são acoplados com as refeições alteradas, também podem ser consideradas como fatores de risco no desenvolvimento de várias patologias cardiometabólicas e gastrintestinais (Knutsson & Boggild, 2010; Hoogerwerf, 2009; Szosland, 2010; Scheer et al., 2009).

## 2.4 Ritmos circadianos em fetos

Sabe-se pouco sobre o sistema circadiano fetal. O que é conhecido é o fato que o desenvolvimento de ritmos circadianos é parte do desenvolvimento da prole e prossegue normalmente na ausência de um NSQ materno funcional. Isso é demonstrado pela iniciação normal dos ritmos circadianos natais em proles de ratos de mães sem ritmos circadianos por lesão no NSQ ou por duplo *knockout* em camundongos *mPer1Brdn / mPer2 Brdn / mPer2 Brdn* ou camundongos *mPer2 Brdn / mCry1* (revisito por Davis e Reppert, 2001; Jz e

Albrecht, 2006). No entanto, ambas as abordagens experimentais demonstram que são necessários sinais maternos para sincronizar esses ritmos pós-natais. Estudos em humanos, em primatas não-humanos e em ovinos demonstram a presença de 24h de controle nos ritmos da frequência cardíaca fetal, movimentos respiratórios, movimentos fetais e hormônios (revisto em Seron-Ferre et al., 2007). Além disso, em animais como ovelhas, ratos, hamsters e veados, o feto programa sua fisiologia para o meio ambiente encontrado após o nascimento (Seron-Ferre et al, 1993;. Ebling et al, 1989;. Gorman et al, 2001;. Adam et al., 1994). Em adultos, ritmos circadianos e sazonais são dependentes do sistema circadiano. Existiria um sistema circadiano semelhante ao do adulto que controlaria os ritmos no feto?

## **2.5 Ontogenia do sistema circadiano central e periférico em fetos**

Em roedores (ratos e hamsters) e em ovinos, humanos e primatas não-humanos, o NSQ é reconhecível pela histologia no meio da gestação e apresenta diferenças entre o dia e a noite na atividade metabólica, na expressão de RNAm da vasopressina (AVP) e de RNAm e proteína da c-fos proteína antes do nascimento (Reppert e Schwartz, 1983, 1984; Davis e Gorski, 1985; Constandil et al., 1995; Nováková et al., 2010). No entanto, existem diferenças importantes entre espécies na idade em que os marcos do desenvolvimento, como a aquisição do número definitivo de neurônios e inervação pelo trato retinohipotalâmico, são atingidos. Embora esses eventos sejam concluídos no útero de humanos, primatas não-humanos e ovelhas, eles ocorrem no período pós-natal em roedores (revisto em Serón-Ferré et al, 2001a;. Sumová et al., 2008; Weinert, 2005). Outras diferenças entre as espécies estão também presentes na idade em que a expressão dos genes do relógio é detectada no NSQ fetal de primatas não-humanos e roedores.

A ontogenia da expressão oscilatória dos genes do relógio no NSQ fetal tem sido extensivamente estudada em ratos, camundongos e hamsters através da mensuração da expressão *in vivo* de genes do relógio e também através da medição da expressão *in vitro* de um gene único (Per1 ou Per2) em cortes do NSQ fetal. As informações fornecidas pelas duas abordagens diferem. Todos os estudos *in vivo* mostraram que a expressão de genes do relógio no NSQ fetal é baixa e uma antifase oscilatória na expressão dos genes do relógio do núcleo é

atingida após o dia 10 pós-natal (Shimomura et al, 2001;. Sladek et al, 2004;. Li e Davis, 2005; Sumová et al., 2008; Ansari et al., 2009). Em ratos, como discutido por Sumová et al. (2008), a manifestação das oscilações dos genes do relógio circadiano ocorre em paralelo ao desenvolvimento de sinapses no NSQ fetal. Os estudos *in vitro* de cortes do NSQ em ratos durante o período fetal e neonatal apresentam uma discrepância com os dados *in vivo*. Na idade gestacional de 22 dias (termo 23 dias), forte expressão circadiana de Per1 em cortes do NSQ fetais em ratos transgênicos foi detectada por Ohta et al. (2008). Não está claro se as condições de cultura mascararam a oscilação potencial para Per1 no NSQ fetal como demonstrado por Dolatshad et al. (2010) para órgãos fetais em ratos. No entanto, apesar da ausência do mecanismo canônico do relógio, ritmos de 24 h de atividade metabólica e de expressão de RNAm da c-fos e da AVP estão presentes no NSQ de roedores no estado fetal *in vivo* (Reppert e Schwartz, 1983, 1984; Davis e Gorski, 1985; Nováková et al., 2010).

Como sugerido por Sumová et al. (2008), esses ritmos do NSQ fetal podem não ser ritmos endógenos do NSQ fetal e podem surgir em resposta a sinais maternos cíclicos. Alternativamente, uma possibilidade intrigante é que, durante o desenvolvimento, estas funções pode ser inicialmente conduzidas por um oscilador não participante do ciclo de feedback de transcrição/translação (CFTT) como nos glóbulos vermelhos (O'Neill e Reddy, 2011), e como a organização pós-natal do NSQ de roedores é completada, a TTFL torna-se ativa.

A ontogenia de expressão dos genes do relógio em órgãos periféricos fetais e neonatais tem sido extensivamente estudada em roedores. Os relógios circadianos podem estar envolvidos no desenvolvimento de inicialmente seis RNAm de genes do relógio canônicos (Per1, PER2, Cry1, Cry2, Clock e Bmal1), que são expressos nos oócitos não fertilizados de ratos. Após a fecundação, a expressão de RNAm destes diminui entre o estágio de 2 células e 16 células para ser reiniciado com o estágio do blastocisto (Johnson et al., 2002; Ko et al., 2000). Após a implantação, os genes do relógio são detectados em fetos inteiros e vários órgãos periféricos. Em medições *in vivo* por técnicas de imagem em ratas grávidas que transportavam fetos transgênicos com o Per1: luc, foi mostrado a expressão da luciferase no útero das ratas gestantes aos 10 dias de gestação e uma diferença na intensidade da luminescência aos 12 dias. No geral, houve um aumento exponencial na Per1:luc no útero desde o dia 10 até ao final da gestação e no dia 1 pós-natal (Saxena et al., 2007).

Outros pesquisadores têm abordado a expressão de genes do relógio em fetos inteiros e em órgãos fetais selecionados *in vivo* em camundongos (Dolatshad et al., 2010) e fetos de ratos. Em fetos de ratos inteiros, a expressão dos genes do relógio Per2, Cry1, Bmal1 e Clock foram detectadas a partir do dia 10 de gestação até o dia pós-natal 1. No entanto, medições da expressão de Per2 e Bmal1 em intervalos de 4 h não mostrou um padrão de 24 h no feto inteiro aos 10, 14 e 19 dias da idade gestacional. Resultados negativos semelhantes foram encontrados em fígado fetal, rim e coração nas duas últimas idades. A mesma pergunta foi explorada no feto do rato aos 16 dias de idade gestacional, com a diferença de que os genes do relógio foram quantificados separadamente na cabeça inteira e no corpo inteiro. Nesse estudo, uma antifase de 24 h de oscilação de Per2 e Bmal1 foi observada em ambos os compartimentos. Essas oscilações foram mascaradas quando os dados da cabeça e do corpo foram combinados.

Estruturas cerebrais potenciais e órgãos que contribuem para as 24 h da oscilação dos genes do relógio em camundongos, na cabeça e no corpo inteiro de ratos durante o período fetal aos 18 dias de gestação foram estudados a fim de verificar essas oscilações (Torres-Farfan et al., 2011). Em camundongos, a *pars tuberalis* fetal mostra uma expressão oscilatória das proteínas do relógio BMAL1, PER2m e CRY1m (Ansari et al., 2009). No rato, as diferenças diurnas e noturnas na expressão de RNAm de Per2 e Bmal1 em antifase estavam presentes no hipocampo fetal e na glândula pineal do feto. Outras estruturas cerebrais não foram testadas. Ao nível do corpo, nenhuma oscilação foi encontrada no fígado fetal rato, de acordo com resultados de mais um estudo detalhado da Sladek et al. (2007). Uma sugestão de oscilação é encontrada no coração de rato fetal. Em contraste, uma forte oscilação em antifase de Per2 e Bmal1 foi encontrado na glândula suprarrenal fetal de ratos (Torres-Farfan et al., 2011). Outros autores detectaram expressão pós-natal circadiana da Per1: luc no dia do nascimento, em ratos, na glândula pineal, fígado, tireóide e glândulas supra-renais (Yamazaki et al., 2009). Ao todo, os dados disponíveis apoiam a presença de relógios circadianos periféricos em roedores fetais em uma idade gestacional em que a oscilação gene do relógio do NSQ fetal está ausente.

## **2.6 Controle dos ritmos fetais através dos sinais circadianos maternos**

Um aspecto desconhecido dos relógios circadianos é a regulação e os mecanismos que influenciam diretamente este sistema. O NSQ adulto é regulado pelo ciclo claro/escuro através do trato retinohipotalâmico, mas os mecanismos moleculares pelos quais os neurotransmissores agem sobre os neurônios do NSQ mudando o relógio molecular são desconhecidos. Os ritmos dos genes do relógio no NSQ de macacos-prego durante a vida fetal e os ritmos de RNAm de AVP e c-Fos em NSQ de fetos de ratos são regulados pelo ciclo claro/escuro externo (Torres-Farfan et al, 2006;. El-Hennamy et al, 2008;. Nováková et al., 2010). A evidência discutida acima indica que para estes macacos a regulação pode ser proporcionada pelo ritmo materno da melatonina.

Até este momento, dois sinais de regulação maternos, a melatonina e o tempo de restrição à comida foram demonstrados em roedores. Uma experiência recente investigou o papel do ciclo claro/escuro versus alimentação restrita nos ritmos fetais de NSQ de ratos para AVP e c-Fos, não encontrando efeito da restrição da alimentação nestes ritmos quando o ciclo claro/escuro se manteve (Nováková et al., 2010). No entanto, a exposição à luz constante, o que perturba o ritmo de atividade materna (e possivelmente outros ritmos, incluindo o de melatonina) aboliu os ritmos da AVP e c-Fos no NSQ fetal, sugerindo a supressão ou dessincronização desses ritmos. Sob esta situação, a restrição alimentar maternal restaurou os ritmos fetais do NSQ, mas a amplitude foi menor e a fase foi mudada em comparação àquelas dos fetos de mães mantidas em ciclo claro/escuro (Nováková et al., 2010). Os autores concluíram que os sinais derivados do ciclo claro/escuro maternos prevalecem sobre os sinais de alimentos para estes ritmos específicos do NSQ fetal.

Já em roedores, a regulação exercida durante a vida fetal tem uma longa duração pós-natal. Está bem estabelecido que a fase de ritmos circadianos comportamentais pós-natais que aparecem em 2-3 semanas de idade em hamsters e em ratos são regulados por sinais maternos experimentados durante a gestação. Uma demonstração convincente de que o ritmo da melatonina da rata gestante está envolvido na regulação dos ritmos dos filhotes é a descoberta que a pinealectomia materna durante a gestação causa a dessincronização no ritmo de ingesta

hídrica do filhote. A sincronização deste ritmo entre filhotes é restaurada pela re-exposição de melatonina materna diária durante a gestação tardia (Bellavia et al., 2006). Os mecanismos pelos quais este controle é exercido são desconhecidos; no entanto, há uma crescente preocupação sobre os efeitos em longo prazo na prole humana da interferência da alimentação e do ritmo de melatonina materna devido ao estilo de vida e mudanças nos horários de trabalho durante a gestação.

## 2. 7 O sistema circadiano materno durante a gestação

Torna-se claro que os sinais circadianos maternos durante a gravidez são importantes para os ritmos circadianos fetais e neonatais. No entanto, há informações limitadas sobre as adaptações fisiológicas do sistema circadiano materno à gravidez e a resposta deste sistema às perturbações ambientais (restrição alimentar, stress, mudança no ciclo claro-escuro, entre outros). Em condições normais, os estudos em humanos e ratos têm mostrado um aumento na amplitude do ritmo de melatonina materna (revisado por Tamura et al., 2008). Além disso, em ambas as espécies, há um aumento na concentração plasmática materna de glicocorticóides enquanto o ritmo de glicocorticóides no plasma é mantido e a resposta do eixo hipotalâmico-adrenal ao estresse é diminuída (revisado por Weerth e Buitelaar, 2005; Brunton, 2010).

Outros ritmos maternos como a atividade e temperatura mostram mudanças espécie-específicas durante a gestação. Em ratas gestantes diurnas “*Nile*”, a fase dos ritmos de atividade e temperatura foram semelhantes aos de animais não-gestantes, porém a amplitude estava diminuída (Schrader et al, 2009). Em contrapartida, ratos com atividade noturna não apresentavam diferença na amplitude e na fase do ritmo de atividade e temperatura (Kittrell and Satinoff, 1998). Seguindo a linha que a gestação normal afeta o sistema circadiano materno, um estudo recente comparando os ritmos de expressão proteica de Fos e Per2 no núcleo supraquiasmático na zona ventral subparaventricular de ratas gestantes e no período entre dois ciclos estrais (*diestrus*), detectou várias diferenças funcionais. De nota, o pico de expressão de Per2 teve sua fase avançada 4 horas no NSQ de ratas gestantes e houve diferenças na resposta à luz do centro e da periferia do NSQ e da zona subparaventricular

ventral. Estes resultados foram interpretados como uma indicação de uma reorganização funcional destas regiões durante a gestação.

As consequências em longo prazo nos filhotes de possíveis perturbações do sistema circadiano materno estão começando a ser exploradas. Em humanos e animais experimentais, a desnutrição durante a gravidez aumenta o risco de doenças cardiovasculares e síndrome metabólica na prole gerando o conceito de origens desenvolvimentistas da saúde e da doença (Developmental Origin of Health and Diseases). De grande interesse é o aumento da obesidade já começando em crianças (Entringer et al., 2010). Estudos em macacas japonesas gestantes, quando submetidas a uma dieta rica em gorduras revelam um aumento na adiposidade da prole. Um alvo foi o fígado fetal, que mostrou o acúmulo de lípidos, aumentou a expressão de genes na via gliconeogênica e interrompeu a expressão do gene do relógio *Npas2*, devido ao aumento da ocupação por sítios de acetilase da histona H3K14ac no promotor *Npas2* (McCurdy et al, 2009;.. Suter et al, 2011).

Uma modificação diferente da dieta, alimentando camundongos gestantes com uma dieta de baixo teor de proteínas, induziu a resistência à insulina e aumento da adiposidade na prole por 20 semanas de idade. De nota, anormalidades circadianas comportamentais no tempo de atividade e no comportamento alimentar e uma alteração no ciclo claro/escuro da expressão de RNAm de *Bmal1*, *Per2* e *Clock* na parte frontal do cérebro e no córtex hepático já estavam presentes em 8 semanas de idade, antes do aparecimento de anomalias metabólicas. Curiosamente, o tratamento não afetou a expressão de genes no hipotálamo, incluindo o *NSQ* (Sutton et al., 2010). Ainda resta, de fato, saber se estas condições durante a gestação (composição da dieta, mudança de horários de trabalho da mãe, etc) podem afetar os relógios periféricos específicos dos seus respectivos fetos, levando a efeitos metabólicos em longo prazo na prole.

## **2. 8 O Sistema circadiano durante a lactação**

O aleitamento é uma das demandas mais exigentes em termos energéticos dos estados fisiológicos da vida de uma fêmea adulta. Durante a lactação, as necessidades de nutrientes da

glândula mamária frequentemente excedem as do resto do corpo (Vernom et al., 2002; Bauman e Currie, 1980; Oftedal, 2000). Os mamíferos têm três estratégias para atender as demandas energéticas de lactação: aumento do apetite, aumento da eficiência metabólica e aumento do uso de reservas de nutrientes (por exemplo, lipídios armazenados). A maioria dos mamíferos utilizam todos os três tipos de estratégias em graus diferentes. Por exemplo, os estudos com roedores mostrou que o consumo de ração das mães aumentou com o aumento do tamanho da ninhada (Vernom et al., 2002). No entanto, o aumento da ingestão de alimentos por si só, muitas vezes não pode acomodar as demandas energéticas de produção de leite, e roedores durante a lactação geralmente experimentam um período de balanço energético negativo (Vernom et al., 2002). O balanço energético negativo das mães em lactação parece ser uma estratégia para aumentar a eficiência metabólica. Adaptações à desnutrição incluem a diminuição da taxa metabólica basal, aumentando a termogênese do tecido adiposo marrom, e aumentar a atividade anabólica no tecido adiposo e no músculo esquelético que, por sua vez, levam a menores necessidades de nutrientes e o particionamento de nutrientes para funções essenciais. Estas mesmas adaptações são observadas em mães em lactação e resultam em aumento da eficiência metabólica e partição preferencial de nutrientes para a glândula mamária para apoiar o crescimento dos filhotes através da produção de leite (Vernom et al., 2002).

Mudanças dramáticas na circulação dos níveis de hormônios reprodutivos e metabólicos ocorrem durante a transição da gravidez à lactação (Freeman et al., 2000; Kelly et al., 2002; Neville e Morton, 2001; Tucker e Merkel, 1987; Augustine, Ladyman e Grattan, 2008) e estimulam, em parte, essas adaptações metabólicas nas mães (Speakman, 2000; Speakman e McQueenie, 1998; Johnson, Thomson e Speakman, 2001). Estudos recentes mostraram alteração da expressão de genes do relógio circadiano em vários tecidos durante o período perinatal, e isso leva à hipótese de que o sistema circadiano também regula as mudanças fisiológicas que ocorrem nas mães para apoiar a lactação (Plaut e Casey, 2012; Casey e Plaut, 2012; Casey et al., 2009)

Em roedores, a fase e a amplitude do núcleo de expressão rítmica dos principais genes do relógio são diferentes entre as glândulas mamárias de camundongos virgens e lactantes, e, portanto, apóia um papel para esses genes no desenvolvimento da glândula mamária e na diferenciação (Metz et al., 2006). Estudos revelaram que as mudanças nos genes do relógio ocorreram em vários tecidos durante a transição da gravidez a lactação (Metz et al., 2006;



Casey et al., 2009). Além disso, a prole de camundongos com deficiência funcional da proteína CLOCK (mutantes Clock- D19) não conseguiram prosperar, o que sugere que o rompimento circadiano afeta a produção de leite das mães, que pode não ser adequado o suficiente para alimentar seus filhotes (Dolatshad et al., 2006).

No ser humano, 7% dos genes expressos na mama em lactação apresentam ritmos circadianos, incluindo os níveis de estado estacionários de RNAm dos genes do relógio e de genes envolvidos com o metabolismo (Maningat et al., 2009). O leite materno nesse estudo foi coletado a cada 3 horas durante um período de 24 horas. Em nossos estudos anteriores, a coleta do leite da mãe associada à retirada 3 horas mais tarde do resíduo gástrico de seu bebê pôde permitir o estudo da transmissão de sinais moleculares da mãe à criança (Floris et al., 2014). Cubero et al (2004) demonstraram uma ritmicidade circadiana de excreção do L-triptofano no leite materno. A partir desses achados e sabendo que estudos já demonstraram que problemas no relógio circadiano podem alterar os mecanismos fisiológicos da mãe durante a lactação, nosso grupo investigou se a suplementação com um bolus de triptofano em bebês do nascimento ao desmame poderia ter consequências sobre sua fisiologia circadiana em situação de desnutrição proteica ou sobre dieta normal (Nascimento et al., 2013). Desta forma, a transmissão de um sinal circadiano pela mãe ao bebê poderia permitir a melhora na formulação de leites industrializados infantis.

## **2.9 Ritmos circadianos e metabolismo energético**

Torna-se cada vez mais claro que os ritmos de 24 horas em vários processos biológicos, incluindo o metabolismo, são mediados não só por fatores ambientais (isto é, extrínsecos), mas também por fatores endógenos (isto é, intrínsecos). A dissociação destes dois fatores é possível quando as condições ambientais forem mantidas constantes ao longo do dia (isto é, iluminação constante e disponibilidade de alimentos, na ausência de sincronização de sinais ambientais); Sob tais condições, o comportamento (vigília / sono, alimentação / jejum), a regulação neuroendócrina e os ciclos metabólicos persistem em humanos e modelos de roedores (com periodicidades ligeiramente mais longas e mais curtas do que 24 horas, respectivamente) (Aschoff 1965; Pittendrigh e Daan 1976).

As oscilações dependentes dos horários do dia, tanto endócrinas como dos ritmos metabólicos, estão intimamente associadas com, e foram, portanto, classicamente atribuídas às flutuações nos comportamentos diários. No entanto, vários estudos têm desafiado diretamente uma relação obrigatória entre os dois, revelando que os ritmos distintos endócrinos e metabólicos durante 24 horas podem ser dissociados dos comportamentos. Por exemplo, oscilações nos valores de cortisol e hormônio tireoestimulante (TSH) persistem em seres humanos quando o sono é evitado através da aplicação de um estado de excitação durante a noite (Van Cauter, et al 1991;. Van Cauter e Copinschi 1999; Van Cauter e Spiegel 1999) . Os ritmos de epinefrina e do inibidor-1 do ativador do plasminogênio persistem durante 24 horas, semelhante aos seres humanos submetidos a dias de 20 ou 28 horas contíguas (conhecido como dessincronismo forçado) (Scheer, et al 2010;. Scheer, et al 2011;. Scheer e Shea 2013; Shea, et al. 2011).

Com relação ao metabolismo, oscilações nos níveis de glicose no sangue circulante persistem durante este protocolo de dessincronismo forçado, destacando que os ritmos no metabolismo dos carboidratos não são simplesmente secundários a alterações na atividade física e / ou ingestão de alimentos durante o dia (Scheer, et al. 2009). Coletivamente, estas observações sugerem que 24 horas de oscilações em parâmetros endócrinos e metabólicos específicos não são regulados exclusivamente por ritmos ambientais e / ou comportamentais, mas em vez disso são mediadas (pelo menos em parte), por mecanismos endógenos. O candidato mais provável é o relógio circadiano.

Estudos indicam que alterações deste relógio circadiano são associadas à síndrome metabólica, uma entidade patológica caracterizada pela presença de obesidade, hipertensão, níveis elevados de triglicerídeos e resistência à insulina. Em particular, tem sido mostrado que ratos *knockout* para o gene *Clock* desenvolvem obesidade e intolerância à glucose e exibem um consumo exacerbado de alimento que está associado à uma desregulação da expressão circadiana de peptídeos no hipotálamo, responsáveis pela regulação do sistema de recompensa alimentar e metabolismo energético. De maneira similar, a mutação negativa do gene *Bmal1* altera o ritmo circadiano da glicose sanguínea . As alterações do perfil circadiano de atividade locomotora e de ingestão alimentar foram descritos em vários modelos animais, incluindo ratos Zucker obesos (*fa/fa*). Estes resultados são similares aos dados epidemiológicos e clínicos em humanos. Eles indicam que, de um lado, a dessincronização do relógio circadiano induzida pelo trabalho em horários invertidos, Jet-lag ou horários não-habituais das refeições,

assim como a interrupção do ciclo sono/vigília, são associados a um risco aumentado de desenvolver síndrome metabólica e, por outro lado, o ritmo circadiano da secreção de insulina e tolerância à glicose, assim como a expressão circadiana dos genes do relógio em adipócitos, são alteradas em pacientes com diabetes tipo II (Turek et al., 2005)

## 2. 9.1 Ritmos circadianos e metabolismo da glicose

São observadas oscilações acentuadas durante o dia no metabolismo da glicose em ambos os seres humanos e modelos de roedores, tanto a nível sistêmico como a nível celular dos órgãos. Durante períodos de atividade física aumentada, a utilização não-insulínica da glicose aumenta; a relativa utilização aeróbica e anaeróbica fica dependente da intensidade do exercício (Alberts et al 2006;. Calvo, et al 2008;. Rose e Richter 2005). Da mesma forma, o consumo alimentar resulta em liberação de glicose mediada pela insulina (Woerle, et al., 2003). Portanto, não surpreende que a calorimetria indireta revele um aumento da utilização da glicose durante o período de vigília (em relação ao período de sono). No entanto, estudos recentes apoiam fortemente o conceito de que ritmos no metabolismo da glicose não são mediados puramente por flutuações nos comportamentos.

Evidência adicional inclui a observação de que os níveis de glicose sanguínea aumentam antes de acordar, tanto em seres humanos como em roedores, um evento conhecido como o “fenômeno do amanhecer” (Bolli, et al. 1984). Da mesma forma, ritmos dos níveis de glicose no sangue persistem quando os ratos são mantidos em jejum (La Fleur et al., 1999). Coletivamente, estas observações revelam um papel importante de um mecanismo circadiano endógeno no metabolismo sistêmico da glicose. Com efeito, a ablação cirúrgica do relógio central (NSQ) ou a manipulação genética de componentes do relógio circadiano perturbam a homeostase da glicose (La Fleur et al. 1999; la Fleur, et al. 2001). No caso do fenômeno do amanhecer, vários estudos sugerem que o eixo sistema nervoso autonômico- NSQ - núcleo paraventricular desempenha um papel crítico nos ritmos diários da produção hepática de glicose, como recentemente revisados por Kalsbeek et al (Kalsbeek, et al. 2014).

A homeostase da glicose é alcançada por meio da regulação coordenada entre a entrada exógena (Ingestão / digestão / absorção) e endógena (gliconeogênese) de glicose

versus os mecanismos de eliminação (utilização) dela. Existe evidência de que o relógio circadiano dos hepatócitos exerce um papel importante em vários processos envolvidos na homeostasia da glicose, incluindo gliconeogênese e a reserva de glicogênio. Neste último caso, os níveis de glicogênio hepático exibem uma variação diurna em uma variedade de espécies, incluindo ratos, ratinhos, coelhos, cobaias, aves, e humanos, em destaque (Sollberger 1964). Interessantemente, os ritmos dependentes dos horários durante o dia dos níveis de glicogênio persistem em roedores em jejum (embora em menor amplitude), sugerindo que estes ritmos não são simplesmente secundários aos ciclos de alimentação / jejum (Ishikawa e Shimazu 1976).

Não só os níveis de glicogênio oscilam ao longo do dia, mas também as atividades de enzimas-chave do metabolismo do glicogênio; a glicogênio-sintetase exibe níveis máximos durante a fase de escuro (ativa) em roedores, enquanto que os picos da glicogênio-fosforilase encontra-se na fase de luz (sono) (Ishikawa e Shimazu 1980; Peret, 1976 et al.). Estes achados do envolvimento do relógio circadiano mediando estas oscilações são corroborados pelos estudos recentes de Doi et al, que relatam uma diminuição das oscilações para os níveis de glicogênio e para a expressão/atividade da glicogênio-sintetase em ratos mutantes *Clock*<sup>Δ19</sup> (Doi et al., 2010).

Semelhante ao armazenamento de glicogênio, a gliconeogênese exibe uma variação diurna; as taxas de aumento são observadas na zona de transição da fase de sono para vigília(em comparação com a transição da vigília para o sono), que é acompanhado por um ritmo diurno de atividade da fosfoenolpiruvato carboxicinase (PEPCK), uma enzima chave na regulação da gliconeogênese (Kida et al. 1980). Usando camundongos *knockout* específicos de hepatócitos para *bmal1*, Lamia et al descobriram que o relógio circadiano hepatócitos foi fundamental para ritmos na expressão de PEPCK (Lamia, et al. 2008). Mais recentemente, Zhang et al relataram que um dos principais componentes do relógio, o CRY, modula a gliconeogênese hepática de uma maneira dependente do horário do dia, através da regulação da sinalização  $\beta$ -adrenérgica e da resposta da proteína de ligação do AMPc (CREB) (Zhang, et al. 2010).

Tanto a disponibilidade de glicose insulino-dependente e insulino-independente exibem variações diurnas em humanos e roedores (la Fleur et al 2001;. Lee, et al 1992;. Whichelow, et ai. 1974). Tecidos extra-hepáticos, tais como os músculos, contribuem de forma significativa para a homeostase da glicose. Variações diurnas da utilização da glicose

no músculo esquelético e cardíaco persistem *ex vivo*, sugerindo que um mecanismo intrínseco pode contribuir para estes ritmos (Leighton et al 1988;. Young et al, 2001a.). No caso do coração, a modificação genética do relógio circadiano dos cardiomiócitos abole os ritmos de oxidação de glicose cardíaca, glicólise, e a síntese de glicogénio, bem como proteína OGlcNAcylation (um marcador indireto de fluxo através da via biossintética da hexosamina) (Durgan et al. 2011), de uma maneira que depende dos horários durante o dia. Mais recentemente, Dyar et al relataram uma diminuição da recaptção da glicose no sóleo e no diafragma e da oxidação em miócitos de ratos com ablação genética do *bmal1*, concomitante com a desregulação da piruvato desidrogenase (Dyar, et al. 2014). Coletivamente, estas observações sugerem que os relógios circadianos dentro de miócitos cardíacos e esqueléticos influenciam significativamente a utilização da glicose.

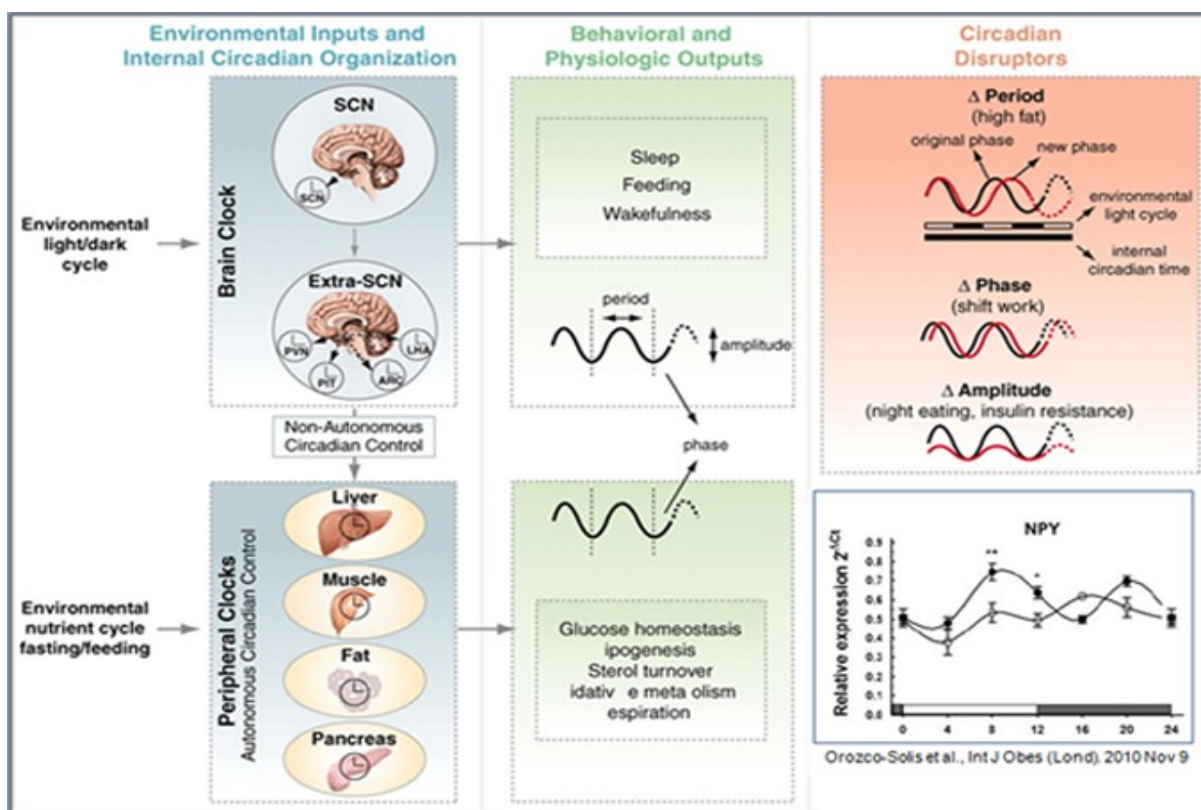
A regulação da homeostase da glicose mediada pelo relógio circadiano também envolve a regulação temporal da liberação e da sensibilidade à fatores endócrinos. A insulina e o glucagon têm um papel importante na manutenção da homeostase da glicose no sangue (Voet 2004). Estudos *in vitro* por Peschke et al. demonstraram que a secreção de insulina a partir de ilhotas pancreáticas isoladas exibem um ritmo circadiano que se origina dentro da própria ilhota (Peschke e Peschke 1998). Além disso, as concentrações de insulina no plasma em ratos apresentam oscilações diárias com incrementos distintos em cada refeição (Kalsbeek e Strubbe 1998). Os estudos também mostram que as modificações do relógio circadiano causam um prejuízo na secreção de insulina e consequente hipoinsulinemia (Coomans, et al 2013.; Marcheiva, et al. 2010).

Usando receptores da melatonina em camundongos com ablação genética para um modelo desregulado de relógio circadiano, Muhlbauer et al relataram ritmos circadianos alterados dos transcritos da insulina e dos níveis de insulina no plasma (Muhlbauer et al. 2009). A sensibilidade à insulina também exhibe uma dependência do horário do dia, o que parece ser dependente relógio circadiano. Por exemplo, tanto a glicose quanto a tolerância à insulina está prejudicada em ratos com ablação do SCN, bem como em ratos mutantes *Clock*<sup>Δ19</sup> e em camundongos com ablação genética de *bmal1* (la Fleur et al 2001; Rudic, et al 2004). Do mesmo modo, a sinalização de insulina é prejudicada em vários tecidos isolados a partir da linha germinativa com ablação de *bmal1*, mutante de *PER2*, e ratos mutantes específicos de cardiomiócitos para *Clock*<sup>Δ19</sup> (Anea, et al 2009;. Carvas, et al 2012;. Durgan, et al 2010).

Somado à insulina, glucagon também desempenha um papel crucial na regulação da homeostase da glicose no sangue. De forma semelhante, o glucagon também exibe padrões diários de liberação (Gagliardino, et al 1978; Tasaka et al 1980.). Um estudo realizado por Ruiten et al. demonstraram que as concentrações de glucagon plasmático durante 24 horas são reguladas pela alimentação e pelo relógio circadiano (Ruiten, et al., 2003). Experiências de Bahr et al. sugerem que a melatonina (um importante sincronizador dos ritmos circadianos) influencia a expressão de glucagon pancreático, bem como ação do glucagon periférico (Bahr et al. 2011). Coletivamente, estas observações levantam a possibilidade de que relógios circadianos celulares autonômicos contribuem para os ritmos da homeostase da glicose, através da regulação da liberação e/ou da sensibilidade à fatores endócrinos (por exemplo, insulina e glucagon).

## **2. 9.2 Influência da alimentação na regulação circadiana do metabolismo**

De fato, a relação entre o relógio circadiano e o metabolismo não é unidirecional. Apesar da sincronização pela luminosidade, a atividade do relógio pode ser modificada pelos horários e a qualidade da ingestão alimentar (Figura 4). Quando animais notívagos, como os ratos e camudongos, têm acesso ao alimento apenas durante a fase clara do ciclo claro/escuro, mudanças no perfil circadiano de expressão dos genes do relógio ocorrem no fígado e outros tecidos periféricos, mas não no núcleo supraquiasmático . Em contraste, quando animais recebem apenas 50-60% da sua ingestão alimentar diária, uma vez por dia, durante o ciclo claro, o ritmo circadiano do relógio central é também afetado (Challet et al., 1997; Mendoza et al., 2005; Mendoza, Pévet e Challet, 2007) . Além disso, o consume de uma dieta rica em lipídeos altera a ritmicidade do relógio em ratos (Kohsaka et al., 2007) .



**Figura 4.** Através da habilidade em sincronizar sua atividade em resposta à um estímulo, como à luz e ao alimento, que agem como sinais de “entrada”, e para controlar o padrão de expressão cíclica de um grande número de genes, como sinais de “saída”, o relógio circadiano é localizado no centro do sistema de adaptação da entrada de energia para as necessidades metabólicas do indivíduo. Alterações na ritmicidade do relógio são associadas ao desenvolvimento da síndrome metabólica. Nossos resultados, apresentados no canto inferior direito da figura mostra que a desnutrição perinatal altera o perfil circadiano de expressão do Neuropeptídeo Y, um gene envolvido no controle da ingestão alimentar e do metabolismo (Adaptado de Bass e Takahashi, Science 330:1349-54, 2010 et de Orozco-Solis et al., 2010b).

As principais regiões do hipotálamo de mamíferos envolvidas na regulação da ingestão de alimentos incluem o hipotálamo lateral e o núcleo ventromedial, sendo o primeiro relacionado com a fome e este último ligado a saciedade (Wynne et al., 2005; Funahashi et al., 2003). Além disso, os neurônios em outras regiões do hipotálamo, incluindo os núcleos dorsomedial, paraventricular e arqueado, secretam peptídeos que estão envolvidos na fome e saciedade. Estes neuropeptídeos podem estimular o apetite, como o neuropeptídeo Y e a proteína relacionada ao Agouti, enquanto outros, incluindo os transcritos regulados pela cocaína e pela anfetamina e a pró-opiomelanocortina e seus derivados (por exemplo,

hormônio estimulador de melanócitos, de melanocortina), diminuem o apetite (Funahashi et al., 2003; Valassi et al., 2008).

Os padrões de expressão gênica e protéica destes neuropeptídeos exibem um ritmo circadiano em cérebro de roedores (Lu et al., 2002; Stutz et al., 2007; Xu et al., 1999) e podem, portanto, influenciar os sinais circadianos que afetam o apetite. Em um estudo, foi demonstrado que o aumento da ingestão de alimentos em ratos no início do ciclo escuro é reduzido em animais com falta de neuropeptídeo Y (Sindelar et al., 2005). Esse estudo mostrou, ainda, que os mecanismos implicados com o aumento da ingestão de alimentos provocada por privação de alimento são distintos daqueles envolvidos na resposta a alimentação no início do período de escuridão do ciclo claro-escuro. Os ritmos circadianos dos genes e proteínas do relógio foram apresentados nestes regiões do cérebro de ratos por imuno-histoquímica (Feillet et al., 2008; Wyse et al., 2010), por hibridação *in situ* (Asai et al., 2001) ou através da monitorização da luciferase que é regulada por promotores dos genes do relógio (Abe et al., 2002; Kriegsfeld et al., 2003; Guilding et al., 2009).

Atualmente é difícil distinguir a ritmicidade circadiana autônoma nessas regiões cerebrais fora do núcleo supraquiasmático do hipotálamo daquelas impostas pelo NSQ. Pode-se, portanto, assumir que os ritmos circadianos destes peptídeos são dependentes do NSQ. No entanto, um acoplamento diferencial dos relógios extra- NSQ com os seus homólogos no NSQ devido aos múltiplos efeitos *zeitgeber* pode resultar em mudanças na fase, amplitude e na cinética de reajuste de fase em suas oscilações, permitindo, assim, a plasticidade dos sistemas do relógio circadiano para integrar uma ampla gama de informações temporais.

Os ritmos circadianos dos neuropeptídeos envolvidos na regulação do apetite pode explicar o padrão básico persistente de comer três refeições por dia em humanos. Este padrão alimentar tem sido observado em indivíduos isolados fatores temporais externos, tais como a transição dia-noite e duração do dia (Aschoff et al., 1996). Horários regulares para as refeições ajudam a manter uma ordem interna temporal estável do sistema do relógio circadiano. Assim, o abandono de padrões alimentares regulares, devido à crescente demanda imposta pelas sociedades contemporâneas podem estar desregulando processos nutricionais e metabólicos e podem ter efeitos profundos sobre a saúde e bem-estar a longo prazo (Fonken et al., 2010; Lowden et al., 2010; Morikawa et al., 2007).



O estado metabólico de um indivíduo é também transmitido de uma forma dependente dos ciclos circadianos via sinais humorais dos tecidos periféricos para as regiões do cérebro que controlam o apetite (Kalra et al., 2003). O hormônio leptina, que suprime o apetite e é produzida principalmente em adipócitos, é secretado de uma forma circadiana (Lecoultre, Ravussin & Redman, 2011; Wong et al., 2004) e, por conseguinte, é sugerida estar sob o controle do relógio central através de sua liberação simpática para os adipócitos (Kalsbeek et al., 2001). Em humanos, os níveis plasmáticos de leptina durante a noite são elevados quando o apetite diminui, favorecendo o jejum e o descanso noturno, e baixa durante o dia, quando a fome aumenta. Em indivíduos obesos, no entanto, os níveis diurnos e noturnos de leptina são muito mais elevados em comparação com indivíduos saudáveis magros, indicando um estado de resistência à leptina (Yildiz et al., 2004). No entanto, o ritmo diurno de leptina circulante é mantido. A leptina é também expressa fora do tecido adiposo, como o estômago (Cinti et al., 2000; Bado et al., 1998). Os níveis de leptina gástricas oscilam de uma maneira circadiana, sendo elevado durante a noite, mas baixo durante o dia (Cinti et al., 2001). Isto sugeriria que a leptina gástrica está envolvida na regulação do apetite, induzindo a saciedade.

Outro hormônio que contribui com a ação da leptina sobre o apetite é a grelina. A grelina é produzido no estômago e em outros tecidos, incluindo o pâncreas e hipotálamo (Kojima & Kangawa, 2002; Cowley et al., 2003). Ela está envolvida na estimulação do apetite através de sua ação sobre neuropeptídeo Y no hipotálamo lateral (Chen et al., 2004; Hagemann et al., 2003) e também pode alterar a função do relógio no NSQ *in vitro* (Yi et al., 2008; Yannielli et al., 2007). A grelina oscila com a alimentação (Cummings et al., 2001), tornando este peptídeo um candidato putativo para a regulação dos sinais relacionados à alimentação. Além disso, níveis elevados de grelina foram encontrados durante a primeira parte da noite em humanos, diminuindo na parte da manhã antes de despertar (Cummings et al., 2001). A privação do sono pode aumentar os níveis de grelina em circulação e isso é acompanhado pela sensação de fome elevada (Schmid et al., 2008). Deste modo, a grelina pode ser um sinal envolvido na relação cruzada entre o relógio periférico e central. No entanto, os níveis circulantes de grelina são mais baixos em indivíduos obesos (Tschop et al., 2001), enquanto que em pacientes anoréxicos, os níveis de grelina em jejum são significativamente mais elevados do que nos controles (Otto et al., 2001). A relação temporal entre a grelina e a leptina indica que, apesar do aumento dos níveis séricos de grelina durante

a parte inicial da noite, o ritmo diurno de grelina é realmente parelhado com os níveis circulantes de leptina. Assim, o aumento noturno dos níveis de grelina em circulação pode compensar o efeito supressor do apetite produzido pelo aumento da leptina. Curiosamente, esta relação temporal é evidente em seres humanos e roedores, cujos padrões alimentares são completamente diferentes (Cummings et al., 2001; Sanchez et al., 2004).

Em paralelo às mudanças circadianas nos níveis de neuropeptídeos e nos sinais humorais dos tecidos periféricos, existe também um ritmo circadiano na seleção de macronutrientes. Na maioria dos mamíferos, a hora do dia pode influenciar a escolha e quantidade de macronutrientes que é consumido. Foi demonstrado que em ratos no início da sua fase ativa noturna, quando as suas reservas de glicogênio estão baixas, a sua preferência por hidratos de carbono aumenta com um aumento paralelo em níveis de neuropeptídeo Y no núcleo paraventricular do hipotálamo (Tempel & Leibowitz, 1989; Leibowitz, 1992). Até o final de sua fase de atividade no início da manhã, a preferência muda para gordura em relação a proteínas e carboidratos, o que libera energia mais lentamente durante a fase de repouso (Lax et al., 1998).

Da mesma forma em humanos, uma dieta rica em carboidratos é favorecida durante o café da manhã e dietas com alto teor de gorduras são preferidas durante as refeições à noite (Westerberp-Plantenga, Ijeda & Wijckmans-Duijsens, 1996). Os hidratos de carbono são metabolizados melhor durante café da manhã porque o corpo está metabolicamente pronto para responder a um estímulo da glicose (Dos Santos et al., 2006). Por conseguinte, é recomendado ingerir uma quantidade suficiente de energia que permitirá que o indivíduo fique mais alerta e, assim, quebraria a letargia ao acordar. Por outro lado, os níveis de glicose em circulação são mais baixos durante o sono, quando o trânsito GI diminui, por isso seria lógico pensar que uma refeição à noite não deve conter muito carboidrato. No entanto, continua pouco elucidado se a distribuição dos macronutrientes durante o dia está associada com a obesidade.

As mudanças nos horários da alimentação em roedores noturnos podem alterar a expressão rítmica dos genes do relógio circadiano no trato gastrointestinal, fígado e pâncreas, sem necessariamente alterar o padrão do relógio central de expressão no NSQ (Hoogerwerf et al., 2007; Stephan, 2002 ). Assim, a comida é um *zeitgeber* muito potente para os sistemas periféricos do relógio. Se roedores têm acesso a alimentos somente durante o período de luz quando eles estão dormindo normalmente, eles vão se ajustar a essa programação de

alimentação dentro de alguns dias e será exibido uma atividade antecipatória alimentar, incluindo o aumento da atividade locomotora, temperatura corporal, atividade das enzimas digestivas e motilidade gastrointestinal, algumas horas antes do alimento se tornar disponível (Stephan, 2002; Comperatore & Stephan, 1987). Além disso, os ritmos de expressão dos genes do relógio nesses órgãos mudam para realinhar com a nova programação de alimentação (Schibler, Ripperger & Brown, 2003; Stokkan et al., 2001). Estas atividades circadianas são normalmente reguladas pelo relógio central no NSQ. Assim, parece que a expressão dos genes do relógio nesses órgãos, os quais estão intimamente envolvidos na alimentação, tornam-se regulados pelas mudanças nos horários da alimentação. No entanto, quando os animais recuperam o acesso à alimentação durante o período escuro, o relógio no NSQ, cujos ritmos permaneceram inalterados pelas mudanças nos horários de alimentação, recupera o controle e volta a regular os relógios periféricos.

Ainda não está claro quais os sinais associados à alimentação causam uma mudança na expressão dos genes do relógio em tecidos periféricos. A nutrição parenteral total, que ignora o trato GI, mudou o pico de expressão dos genes do relógio no fígado durante o período de luz em ratos (Miki et al., 2003). Isto sugere que fatores diretamente associados com a alimentação, tais como o sabor dos alimentos, distensão do estômago, ou o contato físico direto de alimentos com a mucosa GI, não estão envolvidos com a regulação do relógio circadiano. De fato, a disponibilidade de nutrientes a um nível celular tem a maior influência sobre as alterações moleculares no relógio do sistema periférico. Além disso, outros sugeriram que a palatabilidade, bem como o valor nutricional da dieta desempenham algum papel na regulação da atividade antecipatória da alimentação (Mistlberger et al., 1987; Hsu et al., 2010).

Continua a ser um ponto de discórdia se a atividade antecipatória para a alimentação requer um oscilador mediado pela comida, uma vez que é improvável que o relógio no NSQ seja o responsável pelas mudanças na expressão gênica do relógio periférico em resposta aos horários da alimentação (Storch & Weitz, 2009). Em ratos com o NSQ lesionado, a atividade antecipatória ainda é evidente (Stephan, 1989). Portanto, a questão permanece se um segundo sistema circadiano neuronal existe que pode ser regulado pela programação da alimentação e se ele tem alguma influência sobre os ritmos circadianos em tecidos periféricos. A localização exata deste oscilador putativo permanece incerta. Inicialmente foi pensado estar localizado no

trato gastrointestinal, mas estudos recentes sugeriram que os componentes, pelo menos importantes deste oscilador dependente dos horários da alimentação estão localizados no núcleo hipotalâmico dorsomedial (Mieda et al., 2006; Gooley, Schomer & Saper CB, 2006). A ablação deste núcleo resultou na abolição da atividade antecipatória da alimentação e uma ascensão “pré-refeição” na temperatura do corpo (Gooley, Schomer & Saper CB, 2006). No entanto, pode-se argumentar que o relógio central ainda pode sincronizar os relógios em tecidos periféricos indiretamente através de sua influência sobre os ciclos de descanso-atividade, que por sua vez aciona respostas humorais, resultando em ritmos de alimentação.

De um ponto de vista adaptativo, a atividade antecipatória da alimentação permite ao organismo ativar a excitação, o apetite, o metabolismo e as secreções digestivas exatamente antes de receber os alimentos, permitindo-lhe lidar com vantagem a disponibilidade previsível do alimento. Assim, quando o alimento é abundante, o oscilador dependente da luz localizado no NSQ torna-se o responsável por dirigir os ritmos circadianos, mas quando a comida é escassa ou está disponível apenas em determinados momentos, o oscilador dependente do aporte alimentar assume o comando de um subconjunto de ritmos, melhorando assim o acesso aos alimentos, mas sem interferir com outros processos rítmicos que continuam ser controlados pelo NSQ (Stephan, 2002; Fuller, Lu & Saper, 2008).

### **2.9.3 Má-nutrição e os ritmos circadianos**

Está claro que o sistema de relógio circadiano é profundamente influenciado pela ingestão de nutrientes. Portanto, não é surpreendente que dietas desequilibradas podem ter efeitos negativos sobre a orquestração de genes do relógio no núcleo celular e suas consequências nos alvos transcricionais. Um recente estudo em ratos mostrou que expressão rítmica do gene do relógio *Rev-Erb-alfa*, que liga ritmos circadianos e metabolismo nos tecidos periféricos, é interrompida em células  $\beta$  pancreáticas em resposta à dieta rica em gordura (Vieira et al., 2012). Além disso, o padrão rítmico de secreção da insulina foi prejudicado, o que sugere que *Rev-erb- $\alpha$*  desempenha um papel importante na adaptação de células  $\beta$  a estímulos nutricionais. Assim, a plasticidade do sistema de relógio parece tornar-se um processo mal adaptado quando o organismo é exposto a uma dieta obesogênica.

Em outro estudo em ratos, a exposição ao alto teor de gordura resultou em um relógio anormal à longo prazo e-com padrões alterados de expressão gênica dos genes do relógio em tecidos periféricos, tais como o fígado (Hsieh et al., 2010). Observações similares foram também realizadas em tecido adiposo e no hipotálamo, onde a nutrição com alto teor de gordura não só induziu alterações moleculares no sistema do relógio, mas também alterou alguns ritmos comportamentais (Kohsaka et al., 2007). Coletivamente, estes dados implicam que as dietas pobres podem causar um desequilíbrio nos componentes moleculares tanto do relógio central como do periférico.

Uma vez que muitos dos genes controlados pelo relógio têm relações metabólicas diretas, perturbações induzidas por esta dieta em genes do relógio podem levar diretamente a uma alteração no metabolismo, levando a um risco aumentado de doença metabólica. Esta noção é apoiada por estudos em ratos em que a inativação do gene *Bmal1* resultou em patologias metabólicas tais como a obesidade, esteatose hepática, hiperinsulinemia, hiperglicemia, hiperlipidemia e hyperleptinemia (Fukagawa et al., 1992; Mistlberger, Lukman e Nadeau, 1998; Kuriyama et al., 2004; Kudo et al., 2004; Sunnan e Turek, 2014); patologias estas que apresentam uma semelhança impressionante com a síndrome metabólica humana. O aumento dramático na prevalência da síndrome metabólica nos últimos tempos torna necessária a compreensão sua patogênese. Portanto, o sistema de relógio circadiano é agora um alvo de pesquisa emergente e um mecanismo putativo ligando as influências dietéticas à susceptibilidade à doença metabólica.

## **2.10 Síndrome Metabólica**

### **2.10.1 Conceitos**

Em 1923, quando o médico sueco Eskil Kylin associou hipertensão arterial e hiperglicemia, houve o primeiro passo para descrição da síndrome metabólica (Kylin 1923). Anos mais tarde, um resumo apresentado à Reunião Anual da Associação Européia de Estudos da Diabetes, descreveu a síndrome metabólica como um aglomerado de características clínicas que envolvia a hipertensão arterial, hiperglicemia e obesidade (Avogaro and Crepaldi 1965). Somente em 1988, houve avanços significativos nos estudos da

síndrome metabólica. Nesse momento, estudiosos reuniram um conjunto de fatores de risco para a diabetes e doenças cardiovasculares no qual denominou de “Síndrome X” (Reaven 1988). Alguns anos depois, a combinação de obesidade, intolerância à glicose, hipertriglicemia e hipertensão ganhou o nome de “Síndrome da Resistência à Insulina” (Haffner, Valdez et al. 1992; Zimmet 1992).

Atualmente, utiliza-se o termo “síndrome metabólica” para o conjunto de fatores metabólicos, clínicos, bioquímicos e fisiológicos interconectados que aumentam o risco de doenças cardiovasculares ateroscleróticas e diabetes mellitus tipo 2 (Wilson, D'Agostino et al. 2005; Kaur 2014). Os critérios de seleção para definições de síndrome metabólica são variados de acordo com as diversas organizações, tais como, World Health Organization (WHO) (Alberti and Zimmet 1998), National Cholesterol Education Programme Adult Treatment Panel III (NCEP ATP III)(Cleeman 2001), American Association of Clinical Endocrinologists (AACE)(Einhorn, Reaven et al. 2003), e o International Diabetes Federation (IDF) (Tabela 1).

**Tabela 1. Critérios para definições da Síndrome Metabólica de acordo com diversas organizações.**

Organizações	Características Clínicas				
	Resistência à Insulina	Peso Corporal	Pressão Arterial	Glicose	Outros
<b>WHO</b>	Prejuízos na TG, na glicose em jejum, DM tipo2 mais 2 características clínicas	H: >0.90 M: >0.85 (a) ou IMC>30Kg/m <sup>2</sup>	≥140/90mmHg	Prejuízos glicose em jejum ou DM tipo2	Creatinina>30mg/g
<b>NCEP ATP III</b>	----	PC≥102cm (H) ou ≥80cm (M)	≥135/85mmHg	>110mg/dL (incluindo DM)	----
<b>AACE</b>	Prejuízos na TG ou na glicose em jejum mais 1 característica clínica	IMC≥25Kg/m <sup>2</sup>	≥130/85mmHg	Prejuízos na TG ou na glicose em jejum (não inclui DM)	Outras Características da resistência à insulina
<b>IDF</b>	----	↑ PC mais 2 características clínicas	≥130/85mmHg ou hipertensão com tratamento	≥100mg/dL (incluindo DM)	----

(a): Relação cintura-quadril. Siglas: WHO - World Health Organization; NCEP ATP III - National Cholesterol Education Programme Adult Treatment Panel III; AACE - American Association of Clinical Endocrinologists; IDF - International Diabetes Federation; TG – tolerância à glucose; DM – Diabetes mellitus; IMC – Índice de massa corporal; PC – Peso corporal; H – Homem; M – Mulher.

A organização mundial de saúde (WHO 1999) afirma que a síndrome metabólica é caracterizada pelo surgimento da intolerância à glicose ou diabetes mellitus e/ou resistência à insulina. Em contrapartida, para National Cholesterol Education Programme Adult Treatment Panel (NCEP ATP III), a resistência à insulina não é necessária para tal diagnóstico (Grundy, Brewer et al. 2004). Contudo, ainda de acordo com a NCEP ATP III, quando o indivíduo apresenta pelo menos três dos seis critérios enumerados na Tabela 1, o diagnóstico da síndrome metabólica pode ser realizado. Prejuízo na tolerância à glicose é um dos critérios para o diagnóstico clínico dessa síndrome, segundo a Associação Americana de Endocrinologia Clínica (AACE). E por fim, de acordo com a nova definição da Federação Internacional de Diabetes (IDF 2006), para uma pessoa ser definida como portadora desta síndrome deve apresentar principalmente obesidade central. Vale salientar que cada organização supracitada apenas formará o diagnóstico preciso da síndrome metabólica se o indivíduo apresentar, pelo menos, dois ou mais sintomas listados na Tabela 1.

Variações do ambiente nutricional em períodos iniciais da vida têm sido associadas ao desenvolvimento de síndrome metabólica na vida adulta (Bertram and Hanson 2001). A desnutrição perinatal promove hiperinsulinemia em jejum, hiperleptinemia, hiperfagia,

obesidade central (Vickers, Breier et al. 2000; Vickers, Breier et al. 2003) e redução da massa muscular na idade adulta (Vickers, Krechowec et al. 2003a). O aumento do consumo alimentar está associado ao retardo no surgimento de saciedade (Orozco solis et al., 2009), redução da ação inibitória da serotonina sobre o consumo alimentar (Lopes de Souza et al., 2008), alterações na expressão de genes envolvidos na sinalização da insulina e sensores nutricionais no hipotálamo (Orozco-Solis, Matos et al. 2010a). Também foram observadas modificações na expressão circadiana de genes hipotalâmicos envolvidos no controle do consumo alimentar em organismos desnutridos no período perinatal (Orozco-Solis, Matos et al. 2010b). A desnutrição perinatal promoveu aumento na expressão de peptídeos orexigênicos, neuropeptídeo Y (NPY) e proteína relacionada ao gene Agouti (Agrp), e redução de anorexigênicos, pró-opiomelanocortina (POMC) e transcripto relacionado a cocaína e anfetamina (CART), no hipotálamo de ratos adultos (Orozco-Solis, Lopes de Souza et al. 2009; Orozco-Solis, Matos et al. 2010a).

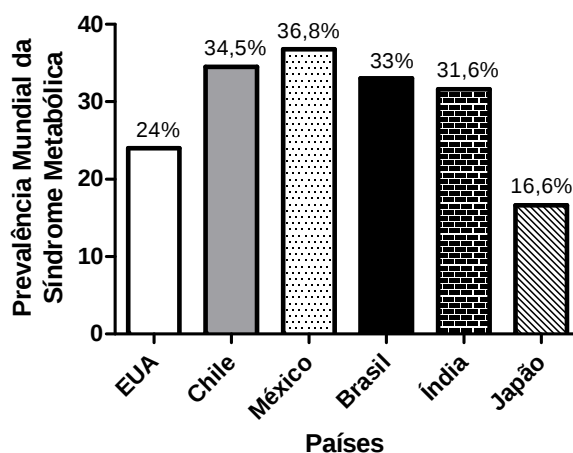
A resistência à insulina na vida adulta, em um organismo que foi desnutrido no período perinatal, poderá conferir benefícios se a nutrição pós-natal continuar deficiente. Tais respostas adaptativas do organismo poderão reduzir o aporte energético, favorecendo assim a sobrevivência (Hales and Barker 1992). Por outro lado, quando as condições dietéticas divergirem, essas respostas preditivas poderão predispor o indivíduo ao desenvolvimento da síndrome metabólica, revelando-se respostas mal adaptativas (Hales and Barker 1992). Esse fenótipo de sobrevivência é um exemplo proposto para a chamada “predictive adaptive response” (PAR). Esta pode ser definida como o conjunto de respostas à estímulos ambientais que confere vantagens adaptativas futuras (Gluckman and Hanson 2004a). Vale salientar que essas modificações nas características fenóticas tornam-se permanentes, aumentando assim a sobrevivência e o sucesso na reprodução das espécies (Wets-Eberhard 2003).

### **2.10.2 Epidemiologia: panorama em países desenvolvidos e em desenvolvimento**

A prevalência mundial da síndrome metabólica varia dependendo da região, da população estudada e das definições atribuídas à síndrome metabólica pelas organizações citadas anteriormente (WHO, NCEP ATP III, AACE, IDF). Nos Estados Unidos, por exemplo,



segundo a National Health and Nutrition Examination Survey, 24% da população adulta apresentou fatores de risco para desenvolver a síndrome metabólica. Em contrapartida, no México essa prevalência sobe para 36,8% (Ford, Giles et al. 2002; Villalpando, Shamah-Levy et al. 2010). No Chile, de acordo com critérios das NCEP ATPIII e IDF, a prevalência da síndrome metabólica em homens foi de 37% (Valenzuela, Maiz et al. 2010). No Brasil, foi observada prevalência da síndrome metabólica de 33% (Rodrigues, Baldo et al. 2010). A NCEP ATPIII mostrou que a prevalência na população urbana da Índia foi de 31,6% (Gupta, Deedwania et al. 2004). Esses números são menores no Japão, onde apenas 20,9% dos homens e 12,3% nas mulheres são acometidos pela síndrome (Uemura, Katsuura-Kamano et al. 2014) (Figura 5).



**Figura 5. Prevalência da Síndrome Metabólica em países desenvolvidos e em desenvolvimento**

Como discutido anteriormente, os indivíduos que na vida fetal e pós-natal inicial foram submetidos a um ambiente deficiente em nutrientes e que, na vida adulta, são expostos a elevada fonte energética, estão susceptíveis a desenvolverem resistência à insulina e hiperglicemia, ambos, considerados fatores de risco para o surgimento da síndrome metabólica e diabetes mellitus tipo 2. Assim, o modelo da resposta preditiva adaptativa, proposto por Gluckman e Colaboradores, pode justificar o aumento do surgimento da síndrome metabólica em países que estão em rápida industrialização (Gluckman and Hanson 2004a; Gluckman, Hanson et al. 2005).

### 2.10.3 Obesidade

A obesidade é considerada a quinta causa de morte indireta no mundo segundo a WHO. As prevalências mais altas de sobrepeso e obesidade, para ambos os sexos, se concentram nos países desenvolvidos, muito embora, naqueles em desenvolvimento já se observem taxas elevadas (WHO 2012). Estima-se que, em 2030, aproximadamente 700 milhões de pessoas sejam diagnosticadas com obesidade no mundo (Shaw, Sicree et al. 2010). Atualmente, observamos aumento considerável na oferta e no consumo de alimentos industrializados, ricos em gordura e açúcares simples e com baixo teor nutritivo concomitante à diminuição da atividade física. Essa combinação de fatores eleva a prevalência do sobrepeso/obesidade vistos cada vez mais em idades precoces. Esse aumento também está associado a elevadas incidências de comorbidades como, resistência à insulina, diabetes mellitus tipo 2 e síndrome metabólica (Greenberg and Obin 2006). Segundo WHO (WHO 1996), a obesidade é definida como acúmulo anormal ou em excesso do tecido adiposo, que posteriormente afetará a saúde do indivíduo. Considerada doença multifatorial, além do sedentarismo e alimentação inadequada (Han, Lawlor et al. 2010), outros fatores contribuem para o desenvolvimento da obesidade, tais como, fatores genéticos (Farooqi and O'Rahilly 2006) e meio ambiente perinatal (crianças nascidas de mães com diabetes gestacional, baixo peso ao nascer, etc) (Taylor, Grant et al. 2005; Ong and Loos 2006; Lawlor, Fraser et al. 2010).

Encontra-se consolidado na literatura que insultos e/ou estímulos acometidos durante os períodos críticos de desenvolvimento (período perinatal) causarão alterações permanentes no desenvolvimento dos vários tecidos e órgãos, levando a mudanças morfo-fisiológicas irreversíveis para nosso organismo (Barker, Bull et al. 1990; Hales and Barker 1992). Assim, a má nutrição materna resulta em alterações no metabolismo fetal. Corroborando com essas informações, estudos experimentais mostraram que restrição calórica no período gestacional promove obesidade em ratos machos logo após o desmame, bem como hiperfagia e acúmulo de tecido adiposo desses animais (Vickers, Breier et al. 2000). Estudos experimentais mostraram que a oferta de dieta com baixo teor de proteínas para ratas no período de amamentação, promoveu retardo no crescimento dos filhotes. Essas manipulações reduzem a disponibilidade nutricional para os filhotes resultando numa redução permanente da regulação do apetite e do peso corporal (Cripps, Martin-Gronert et al. 2009), posteriormente, podem

desenvolver hiperfagia, hiperleptinemia, hiperinsulinemia e aumento do depósito de gordura (Plagemann, Harder et al. 1999).

Durante as nossas investigações, para determinar os efeitos da nutrição nos períodos iniciais da vida na função cerebral em adultos, nós observamos que os filhotes nascidos e amamentados pelas mães que foram submetidas a uma dieta hipoprotéica após o desmame, apresentaram um aumento na ingestão alimentar (hiperfagia) e desenvolveram, na idade adulta, alterações corporais e características metabólicas de obesidade incluindo aumento do tecido adiposo abdominal e elevados níveis de triglicérides e ácidos graxos livres no sangue (Lopes de Souza et al., 2008; Orozco-Solis et al., 2009) .

Estas anormalidades são associadas com um perfil alterado de ingestão alimentar diário assim como a abolição do perfil circadiano de expressão de genes do relógio e genes envolvidos na regulação da ingestão alimentar e do gasto energético no hipotálamo e no fígado (Orozco-Solis et al., 2010b). Portanto, a desnutrição perinatal pode ser o principal fator de risco para desenvolvimento da síndrome metabólica. Estudos epidemiológicos em humanos e muitas investigações com animais experimentais têm mostrado que indivíduos expostos a deficiência nutricional durante o desenvolvimento perinatal têm, uma vez atingida a idade adulta, mais problemas de obesidade, diabetes tipo II e doenças cardiovasculares, comparados àqueles da mesma idade expostos à uma nutrição balanceada durante seu desenvolvimento intrauterino e neonatal (Hales e Barker, 2001).

#### **2.10.4 Evidências epidemiológicas**

A partir de achados epidemiológicos, observou-se a correlação de determinados fatores ambientais ocorridos no período precoce de vida e o surgimento de um padrão de saúde-doença peculiar na vida adulta (Silveira, Portella et al. 2007). Essas evidências epidemiológicas indicam que, crianças com baixo peso ao nascer apresentam risco elevado para o desenvolvimento da obesidade, diabetes e doenças cardiovasculares (Barker, Eriksson et al. 2002; Gluckman and Hanson 2004). Recentemente, evidenciou-se que não apenas a desnutrição, mas que, sobretudo, o sobrepeso durante períodos iniciais da vida também

promovem o desenvolvimento de síndrome metabólica na vida adulta, com consequências morfofuncionais de mesma ou maior extensão (Muhlhausler 2007).

Estas observações epidemiológicas, reforçadas extensivamente por experimentações com animais, conduziram a elaboração da hipótese da "programação metabólica" (Lucas, 1991), pouco depois modificada para a nomenclatura "programação nutricional" *programmation nutritionnelle* (Lucas, 1994). No primeiro estudo, foi observado que insultos ou estímulos aplicados no período em que os tecidos estão em rápida proliferação e diferenciação celular, podem ter efeitos duradouros ou persistentes sobre a estrutura ou função de um organismo. Em outras palavras, esses períodos críticos de desenvolvimento, assim chamado por Dobbing (1965) correspondem às janelas de tempo onde os tecidos estão mais susceptíveis às injúrias (Dobbing 1965).

Os primeiros relatos de estudos sobre programação metabólica ocorreram na cidade de Hertfordshire, Inglaterra. Onde foram verificados os pesos ao nascimento, e após um ano de vida, dos bebês nascidos em 1911. Esse estudo encontrou correlação entre o baixo peso ao nascer e o primeiro ano de vida, com o desenvolvimento de diabetes tipo 2 na vida adulta (Barker, Osmond et al. 1989). Mais tarde, na cidade de Preston (Inglaterra), Barker e colaboradores (1993) registraram, entre os anos de 1935-1943, informações como a data da última menstruação da mãe e peso ao nascer do bebê, o peso da placenta, comprimento da cabeça até o calcanhar e circunferência da cabeça (Barker, Hales et al. 1993). Nesse estudo também foi encontrado a mesma correlação dos estudos da cidade de Hertfordshire, adicionado aos prejuízos na tolerância à glicose, hipertensão e elevação nas concentrações séricas de triglicerídeos no jejum (Barker, Hales et al. 1993).

Um exemplo antigo de programação metabólica aconteceu durante o período da Segunda Guerra Mundial, momento em que as mulheres grávidas foram expostas a um período de escassez alimentar, denominado "fome holandesa". Estudos posteriores constataram que os filhos dessas gestantes apresentaram diferenças na composição corporal, dependendo da idade em que foram expostos à desnutrição intra-uterina. Aqueles que foram desnutridos no primeiro semestre de gestação apresentaram alta incidência de obesidade, quando comparados àqueles que foram desnutridos no último semestre de gestação (Ravelli, Stein et al. 1976).

Nas últimas décadas, um grande corpo de evidências vem apresentando que as influências nutricionais no início da vida afetam a taxa de crescimento fetal e pós-natal contribuindo, desta forma, para o surgimento de efeitos deletérios para saúde em longo prazo (Barker 1998). Para esses estudos, atualmente, dá-se o nome de origens desenvolvimentistas da saúde e da doença (do inglês *Developmental origins of health and disease*, DOHaD) (Prentice 2005). O início aos estudos do DOHaD se deu a partir de grandes coortes da Europa, como por exemplo nas observações de Hertfordshire, onde a associação entre o baixo peso ao nascer e as doenças cardiovasculares eram significativas, mesmo desconsiderando o IMC atual dos indivíduos analisados

Os mecanismos que levam a uma programação metabólica não estão totalmente esclarecidos. Sabe-se, no entanto, que a dieta materna está diretamente relacionada com o desenvolvimento e crescimento fetal. Estudos epidemiológicos identificaram que a manipulação nutricional, como por exemplo, a desnutrição perinatal é um dos fatores ambientais mais bem estudados como indutor da plasticidade fenotípica (Barker, Eriksson et al. 2002; Bellinger, Lilley et al. 2004; Gluckman, Lillycrop et al. 2007). A incompatibilidade entre a demanda de nutrientes oferecida in útero e o ambiente pós-natal, adicionado aos costumes e estilos adquiridos ao longo da vida como: mudanças nos hábitos alimentares e forma de vida associados com o sedentarismo, podem provocar um forte impacto metabólico e fisiológico no indivíduo, aumentando o risco da expressão da carga fenotípica adquirida na vida intra-uterina.

### **2.10.5 Evidências e Modelos Experimentais na DOHaD**

A partir dos estudos de Barker (Barker and Osmond 1986; Barker, Osmond et al. 1989; Barker, Hales et al. 1993), torna-se claro o aumento de evidências demonstrando que as influências nutricionais no início da vida, que afetam a taxa de crescimento fetal e pós-natal, têm efeitos profundos na vida adulta (Barker 1998; Langley-Evans 2006; Gluckman, Lillycrop et al. 2007). Para essas associações foi intitulado “Origens desenvolvimentistas da saúde e da doença” ou DOHaD (Prentice 2005). Obesidade em adultos é um componente importante que caracteriza as DOHaD e a tendência ou o surgimento da obesidade torna-se um pré-requisito necessário que revela os defeitos programados subjacentes (Prentice 2005).

Muito embora a influência do ambiente perinatal sobre o surgimento de doenças na vida futura esteja bem consolidada na literatura, a identificação dos mecanismos moleculares ainda é um desafio para os pesquisadores que defendem as DOHaD.

Há anos a pesquisa com animais experimentais tem sido uma parte integrante e imprescindível para tentar mostrar os efeitos da associação da nutrição ao longo do desenvolvimento fetal e neonatal e o estado de saúde na vida futura. Os modelos animais são largamente utilizados para enfatizar que fatores externos e internos influenciam de forma contundente a relação saúde/doença. Dentre os externos, o meio nutricional inadequado durante o desenvolvimento fetal (exemplo da desnutrição e hiperalimentação), as situações de estresse, a exposição à glicocorticóides, ao tabaco, ao álcool, associam-se a efeitos permanentes sobre aspectos cognitivos, metabolismo, e de forma mais investigada, sobre os sistemas cardiovascular e neuroendócrino (Meaney et al., 2007; Seckl e Meaney, 2006). Por inúmeras questões éticas, o estudo experimental em humanos possui diversas limitações. Isto inviabiliza a realização de variados procedimentos a exemplo das manipulações dietéticas e farmacológicas com vistas a desenvolver fenótipos fisiopatológicos, como aqueles que são desenvolvidos nos modelos animais.

Com o passar dos anos, os modelos animais ainda representam a principal vantagem para o fornecimento de informações sobre o funcionamento do organismo como um todo (Heywood 1987; Ribeiro, Campos et al. 1995; Salén 1995) e as resultantes oriundas dos diversos insultos ou manipulações. Esses modelos animais tornam-se elegíveis segundo o fenômeno estudado, a resposta biológica esperada e sua semelhança com o desfecho em humanos.

Em adição, animais de várias espécies têm sido utilizados ao longo das pesquisas experimentais, tais como ovelhas (Hawkins, Steyn et al. 2000; Williams, Kurlak et al. 2007), porcos (Poore, Forhead et al. 2002; Poore and Fowden 2004), primatas não-humanos (Cox, Nijland et al. 2006; Nijland, Schlabritz-Loutsevitch et al. 2007) e roedores. Um outro grupo inclui coelhos (Mapara, Thomas et al. 2012), cabras, bois, porcos e em menor quantidade, cães, gatos e algumas espécies de primatas (Andreollo, Santos et al. 2012). Segundo informações da literatura, a maior parte da pesquisa na área básica é empreendida nos animais de pequeno porte, como camundongo, rato, hamster compreendendo quase 80% do total das espécies utilizadas nos laboratórios (Schnaider and Silva 2004), e os outros 10% são peixes,

anfíbios, répteis e aves. Sem dúvidas, o rato é um dos modelos mais utilizados e um dos mais conhecidos cientificamente por sua fisiologia e biologia. Outro fator importante para a vasta utilização de ratos como modelo animal é que esse tipo de animal é um excelente modelo para pesquisas que envolvam manipulações dietéticas, devido a sua alta capacidade a se adaptar as diversas manipulações nutricionais. Muito das bases científicas que fundamentaram o estudo das recomendações nutricionais, a exemplo da ingestão protéica, necessária ao crescimento e manutenção, foram embasadas no crescimento e desenvolvimento de ratos desmamados (McDonald 1997). Nestes, informações como a qualidade da proteína, o turnover de aminoácidos e a utilização de ambos subsidiaram as determinações da cota de ingestão diária e preconizam a nutrição adequada.

O estudo dos agravos da desnutrição sobre o organismo em desenvolvimento foi e ainda é o foco de diversas pesquisas. Suas sequelas podem atingir diversos órgãos e sistemas e se estendem desde mudanças provisórias até as persistentes, com repercussões individuais e coletivas, visto os agravos que a saúde da população pode trazer a uma nação. Atualmente muitas pesquisas pertinentes ao estudo das manipulações nutricionais e/ou de fatores que impliquem em alteração do estado nutricional e suas repercussões no organismo, têm sido direcionadas ao esclarecimento dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos nos efeitos da plasticidade durante os períodos iniciais da vida. Uma das mais utilizadas é a dieta hipoprotéica, que há alguns anos contribui para o estudo dos efeitos da programação metabólica sobre o estado de saúde de um organismo adulto.

Em estudos experimentais, o modelo nutricional mais utilizado para a promoção de restrição do crescimento perinatal, com repercussões futuras sobre o surgimento de doenças como as cardiovasculares e o diabetes é a indução da desnutrição por redução do conteúdo de proteína na dieta materna (Desai, Crowther et al. 1996). Em alguns países em desenvolvimento, a deficiência de proteína na dieta ainda figura como um dos fatores mais importantes para a desnutrição infantil, visto que a extrema pobreza limita seu consumo (Symonds, Sebert et al. 2009). A extensão da restrição protéica materna, bem como, sua quantidade e qualidade, que caracteriza as dietas hipoprotéicas (low protein em inglês) causa diversos prejuízos aos filhotes. Podem-se exemplificar agravos no desenvolvimento e morfologia das ilhotas pancreáticas, dos tecidos sensíveis à insulina, como músculo, fígado e adipócitos, além de distúrbios nos rins e cérebro (Langley-Evans 2000). Em nível metabólico

essas repercussões podem ser traduzidas como aumento na pressão arterial sanguínea (Langley-Evans 1996), surgimento de diabetes tipo II na vida adulta (Grace, Swenne et al. 1990; Ozanne, Wang et al. 1996), dislipidemias e excesso de tecido adiposo (Orozco-Solis, Lopes de Souza et al., 2009). A ocorrência de diabetes tipo II e resistência à insulina foi observada em ratos de 17 meses de idade, provenientes de mães alimentadas com dieta hipoprotéica no período perinatal (Petry, Dorling et al. 2001). Corroborando com esses achados, descobriu-se que esse modelo promove distúrbios na ontogênese do pâncreas endócrino, induzindo a redução nas células beta pancreáticas (Snoeck, Remacle et al. 1990; Petrik, Reusens et al. 1999).

A breve exposição de evidências sugere que o consumo de uma dieta pobre em proteínas durante o período gestacional e/ou lactacional promove diversas perturbações endócrinas, resultando em aumento da pressão arterial, intolerância à glicose, resistência à insulina (Dahri, Snoeck et al. 1991; Kwong, Wild et al. 2000)(Drake et al., 2005), além de alterações comportamentais, celulares e moleculares, aumentando o risco de desenvolver danos metabólicos na vida adulta. Outras repercussões pertinentes aos efeitos da restrição protéica na vida perinatal são demonstradas nas alterações ocorridas no controle central do comportamento alimentar. Em estudos experimentais foi verificado que a dieta low-protein durante a gestação, promove preferência dietética, em ratos adultos, para os alimentos com alto teor de gordura (Bellinger, Lilley et al. 2004) (Bellinger et al 2005). Além disso, animais desnutridos perinatalmente desenvolveram hiperfagia após o desmame (Lopes de Souza, Orozco-Solis et al. 2008; Orozco-Solis, Lopes de Souza et al. 2009), bem como redução do efeito anorexigênico da serotonina através da dessensibilização do receptor serotoninérgico 5-HT1B (Lopes de Souza, Orozco-Solis et al. 2008). Vale salientar que essa hiperfagia torna-se aumentada ao ofertar dietas hiperlipídicas (Breier, Krechowec et al. 2004). Em outros estudos, animais desnutridos precocemente apresentavam alterações na expressão hipotalâmica de genes relacionados ao metabolismo da glicose e dos lipídeos, bem como, dos sensores que detectam o estado nutricional do organismo (Orozco-Solis, Matos et al. 2010a). Corroborando com esses dados, Plagemann e colaboradores (Plagemann, Harder et al. 2000), sugeriram que animais expostos à dieta low-protein no período pré-natal, tiveram alterações na estrutura hipotalâmica, bem como, na expressão de neuropeptídeos relacionados com o comportamento alimentar.



Os modelos de programação fetal com dieta hipoproteica têm sido bastante utilizados para analisar os mecanismos das associações entre nutrição materna com prejuízos no crescimento fetal, aparecimento do diabetes e doenças cardiovasculares em períodos tardios de vida (Bertram and Hanson 2001). Contudo, apesar dos diversos estudos concernentes a esse tipo de dieta, a sua composição não apresenta uma padronização única. Dessa forma encontra-se na literatura pesquisas utilizando os mais variados teores de proteínas nas dietas (resumidos na Tabela 2). Igualmente pode variar entre os estudos a fonte de proteína utilizada que vai desde a caseína até fontes oriundas de ingredientes naturais.

Dentre os teores de proteína da dieta hipoproteica, o mais utilizado é o modelo de desnutrição desenvolvido por Snoeck e colaboradores (Snoeck, Remacle et al. 1990) que fornece apenas 8% de proteína ao invés de 20% da dieta controle. Nesse estudo foi observado um retardo no crescimento intra-uterino associado com baixo peso ao nascer. Este desfecho experimental se assemelha aos observados nos pioneiros estudos de base populacional realizados por Barker.

**Tabela 2. Diversas composições usadas nas dietas *low protein* com suas respectivas dietas controles.**

Dieta (g/Kg)	Proteína	Fibra	Amido de milho	Açúcar	Vitaminas	Minerais	Metionina	Colina	Óleo	Ref.
LP6%	60,00	67,16	153,52	511,74	10,00	35,00	3,70	-	151,80	a
CTRL 25%	250,00	50,00	114,52	381,72	10,00	35,00	3,70	-	150,00	a
LP8%	90,00	50,00	80,00	666,70	69,50	69,50	0,80	-	43,00	b
CTRL 20%	220,00	50,00	80,00	536,50	68,50	68,50	2,00	-	43,00	b
LP9%	90,00	50,00	485,00	243,00	5,00	20,00	5,00	2,00	100,00	c
CTRL 18%	180,00	50,00	425,00	213,00	5,00	20,00	5,00	2,00	100,00	c
LP 10%	100,00	50,00	373,40	316,60	10,00	50,00	1,50*	1,65	50,00	d
CTRL 20%	200,00	50,00	317,60	317,60	10,00	50,00	3,00*	1,65	50,00	d

Referências : a - (Galler and Tonkiss 1991) ; b - (Snoeck, Remacle et al. 1990) ; c - (Langley-Evans, Gardner et al. 1996) ; d - (Zambrano, Rodriguez-Gonzalez et al. 2005). Siglas: LP – Low Protein; CTRL – Controles. \*O aminoácido utilizado foi a cistina.

Outro tópico que deve ser levado em consideração além da quantidade e qualidade da proteína nas dietas experimentais é a relação proteína: carboidrato:lipídeos entre as dietas controle e low protein. De acordo com Reeves (Reeves 1997), a dieta controle é baseada AIN93G, composta pelos macronutrientes proteínas, carboidratos e lipídeos cuja proporção é de 2.8:9.0:1.0 (respectivamente). Em contrapartida, a maioria das dietas hipoproteicas contêm altos níveis de carboidratos, com sacarose excessiva, conseqüentemente, desequilibrando a relação dos macronutrientes (Cherala, Shapiro et al. 2006). Du e colaboradores (Du, Higginbotham et al. 1999) utilizaram diferentes concentrações da dieta com baixo teor de proteína, durante o período de 2 semanas. Na primeira semana, os ratos aumentaram a ingestão de alimentos com restrição moderada de proteínas, porém houve diminuição da ingestão de alimentos diante de restrições mais severas. E por fim, a ingestão alimentar dos animais que se alimentaram com dieta 5% de proteína resultou num menor consumo alimentar comparado com aqueles alimentados com 8% (Du, Higginbotham et al. 1999). Isso sugere que os níveis de proteínas na dieta induzem respostas metabólicas distintas, como por exemplo, oscilação da quantidade de dieta consumida.

Então, visto a ligação entre a gestação e a influência da alimentação (desnutrição principalmente) sobre o relógio circadiano, aqui nós nos perguntamos: Em termos comportamentais e moleculares, a gestação e a desnutrição perinatal materna poderiam afetar os ritmos circadianos? Esta questão é pertinente, pois se as mudanças dos ritmos levam a efeitos comportamentais e moleculares negativos para o corpo durante e após o período crítico do desenvolvimento, esta pesquisa poderia dar contribuições significativas para melhora da prevenção e do tratamento das doenças crônicas advindas destas agressões perinatais.

## **3 Objetivos**

### **3.1 Geral**

Analisar, em termos comportamentais e moleculares, a influência da gestação e da desnutrição perinatal materna sobre a ritmicidade circadiana.

### **3.2 Específicos**

Analisar em animais (fêmeas) e seus respectivos fetos e filhotes durante e após a gestação :

- a biometria;
- o ritmo circadiano de expressão dos genes Bmal1, Per1 e Per2;
- o consumo alimentar e curva glicêmica circadiana das mães antes, durante e após a gestação.

## 4 Métodos

### 4.1 Comitê de Ética

Os protocolos experimentais foram aprovados pelo “Comité d’éthique pour l’expérimentation animale, Pays de la Loire, France” sob o número 06 (March 20th, 2013; CEEA.2010.38) e pelo Comitê de Ética para Condução de Estudos em Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE, protocolo: 23076.018780/2014-70). Os estudos nos ratos foram realizados de acordo com as normas da unidade de experimentação animal de Nantes (em conformidade com o European Communities Directive de 24 de Novembro de 1986 (86/ 609/EEC) e com os Princípios de cuidados a animais laboratoriais (NIH publication no. 85–23, revised 1985).

### 4.2 Animais e dietas

Para as avaliações realizadas foram utilizadas ratas Wistar-Han virgens, com idade de 90 dias e pesando  $210 \pm 20$  g, provenientes do fornecedor Charles-River (França) e do Biotério de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. As fêmeas foram acasaladas com machos de mesma idade, linhagem e fornecedor. Os animais foram mantidos em biotério de experimentação, com temperatura de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , e ciclo claroescuro de 12/12 horas (claro das 07:00 às 19:00 h, escuro das 19:00 às 07:00 h), e livre acesso à água e dieta padrão de biotério (Ração SAFE® - A04, 18% proteína e Purina do Brasil, 18% proteína). O diagnóstico do estado de prenhez foi realizado através de esfregaço vaginal. Confirmada a gestação, as ratas passaram a receber as dietas experimentais dando origem a dois grupos: Controle (C), cujas ratas receberam dieta normoproteica (proteína à 18%) ou Desnutrido (PR – Protein Restricted), receberam dieta hipoproteica (proteína à 8%). As dietas eram isocalóricas, seguiam as recomendações da AIN-93G (REEVES, NIELSEN e FAHEY, 1993) e estão descritas na Tabela 1. Os regimes experimentais foram mantidos durante toda a gestação e lactação. Um dia após o nascimento, os filhotes foram pesados e selecionados, formando-se ninhadas com 8 filhotes e a mãe (5 machos e 3 fêmeas, quando possível). Após o desmame,

todos os filhotes passaram a receber dieta de manutenção (Ração SAFE® - A04, 18% de proteína) e ficaram alojados em gaiolas com, no máximo, 4 animais.

**Tabela 1. Ingredientes das dietas Controle e Protein-restricted**

<b>Constituintes</b>	<b>Dieta Controle</b>	<b>Dieta Hipoprotéica</b>
<b>g%</b>	100,00	100,00
<b>Proteína</b>	18,00	8,10
<b>Carboidratos</b>	65,20	75,10
<b>Lipídios</b>	7,00	7,00
<b>Celulose</b>	5,00	5,00
<b>Vitaminas</b>	1,00	1,00
<b>Minerais</b>	3,50	3,50
<b>Metionina</b>	0,30	0,30
<b>% Kcal</b>	3,9 Kcal/g	3,9 Kcal/g

Durante a gestação, lactação e após a lactação o peso das ratas foi aferido a cada semana. Durante a lactação e após a lactação, o peso dos filhotes foi aferido a cada 4 dias (Balança Sartorius, sensibilidade 0,01g).. Para todos os experimentos, foram utilizados 12 ratos do grupo Controle e 12 do grupo Desnutrido. Todos os procedimentos realizados de acordo com o European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86 / 609 / EEC) em relação aos cuidados e uso de animais para procedimentos experimentais. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical.

### 4.3 Desenho experimental

Ratas fêmeas foram utilizadas no estudo (8 semanas de idade aproximadamente, 200 – 224g). Na sua chegada, elas foram acomodadas sob ciclo claro/escuro de 12h cada (luzes das 08:00 – 20:00) ou sob ciclo invertido escuro/claro de 12 h (luzes das 20:00 – 8:00). Todas as manipulações nas ratas durante o período escuro foram realizadas sob lâmpada vermelha (<2 lux) e sob condicionamento de ar controlado (21±2°; umidade relativa: 60±10%). Os animais foram mantidos sem manipulações durante duas primeiras semanas para adaptação. Após a confirmação do acasalamento pela visualização do espermatozoide no esfregaço vaginal, as ratas foram individualmente acomodadas em gaiolas, de forma randomizada, como grupo low-protein (LP) e grupo controle (C). Um dia após o nascimento, o tamanho da ninhada foi ajustado para 8 ratos por mãe, com uma proporção de 4 machos e 4 fêmeas. Ao desmame dos

animais (21 dias), apenas os ratos machos continuaram no estudo e ambos os grupos (C e LP) iniciaram a dieta padrão do laboratório até o final dos experimentos. O dia do nascimento, tamanho da ninhada e peso dos filhotes foi mensurado ao nascimento.

#### **4.4 Análise de PCR durante o desenvolvimento perinatal de ratos controle e desnutridos**

Ratas gestantes (24), pesando 220 – 250g, sob ciclo claro escuro de 12h cada (luzes das 08:00 – 20:00) foram randomicamente distribuídas em 4 grupos (2 controles e 2 desnutridos) para os estudos de biologia molecular: 1) mães controles até o 17º dia de gestação (C1, alimentadas pela dieta controle durante a gestação, n=6) e seus respectivos embriões na mesma idade gestacional (C1<sub>E</sub>, n=6); 2) mães controles até o 23º dia após o desmame (C1-AG, alimentadas pela dieta controle durante a gestação e lactação, n=6) e seus respectivos filhotes até o 14º dia após o desmame (C1<sub>P</sub>, alimentados com dieta controle durante gestação e lactação, n=6); 3) mães desnutridas até o 17º dia de gestação (LP1, alimentadas com dieta hipoproteica durante a gestação, n=6) e seus respectivos embriões na mesma idade gestacional (LP1<sub>E</sub>, n=6); 4) mães desnutridas até o 23º dia após o desmame (LP1-AG, alimentadas com dieta hipoproteica durante a gestação e lactação, n=6) e seus respectivos filhotes até o 14º dia após o desmame (LP1<sub>P</sub>, alimentados com dieta hipoproteica durante a gestação e lactação, n=6). O desenho experimental é demonstrado na Figura 1 (artigo).

Nós realizamos uma análise comparativa, através de PCR quantitativo, do padrão circadiano de expressão de alguns dos principais genes do relógio. As experiências foram realizadas em culturas primárias de células fibroblásticas das mães no 17º dia de gestação (mães e seus respectivos embriões– C1, C1<sub>E</sub>, LP1, LP1<sub>E</sub>) e também das mães entre o 15º -25º após o desmame (mães e seus respectivos filhotes - C1-AG, C1<sub>P</sub>, LP1-AG, LP1<sub>P</sub>), submetidas ou não à restrição proteica durante o desenvolvimento perinatal.

## 4.5 Consumo alimentar e glicemia durante o desenvolvimento perinatal de ratas controles e desnutridas

Ratas Wistar sob ciclo invertido (luzes das 20:00-8:00), pesando 220-250g, provenientes do Biotério de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil foram separadas em um grupo que não foi submetido ao protocolo de acasalamento, i.e., ratas não-gestantes, que se alimentaram da dieta padrão do laboratório (Purina do Brasil) até os 90-100 dias de idade (NP2, n=20). Estes ratos, após a confirmação do acasalamento, foram randomicamente divididos em grupos controle (C, n=10) e desnutrido (LP, n=10). As mães controles foram analisadas no 17º dia de gestação (C2, alimentadas com dieta controle durante a gestação, n=10) e 23 dias após o desmame (C2-AG, alimentadas com dieta controle durante a gestação e lactação, n=10). O mesmo protocolo foi utilizado para o grupo desnutrido, i.e., ratas gestantes desnutridas foram analisadas no 17º dia de gestação (LP2, alimentadas com dieta hipoproteica durante a gestação, n=10) e 23 dias após o desmame (LP2-AG, alimentadas com dieta hipoproteica durante a gestação e lactação, n=10). As mães controles e desnutridas foram sacrificadas por deslocamento cervical neste último ponto temporal (Figura 1 - artigo).

## 4.6 Mensuração do consumo alimentar

Ratas antes (NP2, n=20), durante (C2, n=10 e LP2, n=10) e 23 dias após o desmame (C2-AG, n=10 e LP2-AG, n=10) foram acomodadas em gaiolas individualmente. Todas as dietas foram ofertadas *ad libitum*. As ratas foram alimentadas inicialmente com a dieta padrão do laboratório (Purina do Brasil) antes da gestação e depois do desmame. Durante a gestação e lactação, as mães foram alimentadas com a dieta hipoproteica (8% de proteína) ou normoprotéica (18% de proteína). O acesso à comida foi restrito a uma abertura horizontal na grade metálica que fechava a gaiola. Isso permitia o rato comer mas não remover a comida. A água foi colocada em uma garrafa fixada na parte anterior da gaiola. Após a habituação dos ratos durante 7 dias, para adquirir um padrão estável de alimentação, o consumo alimentar foi avaliado a cada 4h durante 3 dias consecutivos. Nós determinamos as seguintes faixas de

tempo (*Zeitgeber*) durante um dia: ZT0 = 08-12h; ZT4 = 12-16h; ZT8 = 16-20h; ZT12=20-24h; ZT16 = 24-04h; ZT20 = 04-08h; ZT24 = 08-12h

## 4.7 Mensuração da glicemia

Ratas antes (NP2, n=20), durante (C2, n=10 e LP2, n=10) e 23 dias após o desmame (C2-AG, n=10 e LP2-AG, n=10) tiveram amostras de sangue coletadas de suas caudas para determinar a oscilação circadiana da glicose sanguínea total (Accu Check Active, Roche-Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). A coleta ocorreu a cada 4h no 2º dia de mensuração do consumo alimentar (ZT0 – ZT24).

## 4.8 Cultura celular

Seis ratos de cada grupo de cada grupo experimental (mães/embriões/filhotes controles e desnutridos) foram utilizados para a cultura celular. Ela foi feita a partir da extremidade não-inervada da cauda dos ratos através do método descrito por Nascimento (2013). A biópsia de 10 a 100mg foi exposta rapidamente a água de Javel, lavada em um grande volume de solução tampão fosfato salina antes da exposição à Tripsina – EDTA durante 15 min à 37° C. Os agregados celulares foram mecanicamente desagregados por pipetagem vigorosa (20 vezes). As suspensões celulares foram feitas com 3 ml de DMEM + 20% de soro fetal de bezerro e centrifugadas a 1.300g durante 3 minutos à temperatura ambiente. O sedimento celular foi ressuspensão em 10 ml de DMEM + 10% de soro fetal de , anfotericina-B (1/1000) e gentamicina (100 mg / 50 ml) e inoculadas em 25 cm<sup>2</sup> de frasco (NuncH) numa incubadora umidificada (37° C , 5% de CO<sub>2</sub>). Dentro de três a cinco dias, colônias de células ativas foram vistas. No frasco inoculado com células de crescimento rápido, a confluência foi alcançada dentro de uma semana. As células foram ressuspensas por tripsinização e usadas para preparar um tubo criogênico (em 95% de soro fetal de bezerro com 5% de DMSO, armazenado numa caixa Nalgen antes de ser mantida permanentemente a 270uC) e para inocular placas de cultura de tecido (LabTek, P-96 ou 25 cm<sup>2</sup> balão). A ritmicidade circadiana das células foi realizada por um choque de soro (DMEM com 50% Dulbeco®).



## 4.9 Análise do RT-PCR quantitativo

Os animais foram sacrificados sob condições ad libitum por deslocamento cervical. Uma pequena parte da cauda foi retirada para a realização da cultura de fibroblastos. Após o choque sérico, as células foram coletadas a cada 6 horas em um período total de 30 horas (6 pontos temporais, incluindo o primeiro ponto 2 horas após o choque). O RNA total foi extraído usando o reagente Trizol (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), tratado com DNase (livre de RNAses) por 30 minutos à 37° C e subsequentemente purificado por um kit de purificação de minicoluna NucleoSpin from Macherey-Nagel (Hoerd, France) de acordo com as instruções do fabricante. A qualidade do RNA foi checada em géis de agarose e a quantidade determinada usando o espectrofotômetro NanoVue™ Plus da GE Healthcare à 260 e 280 nm. Em seguida, 1mg do RNA purificado foi transcrito reversamente usando a Superscript II RNaseH- Reverse- Transcriptase (Invitrogen) em um volume total de 20mL e o DNAc resultante foi diluído 40 vezes em água livre de DNAses e RNAses. Então, 5mL de cada amostra de DNAc diluído foi utilizado como modelo para a amplificação de PCR utilizando SYBR Green (Biorad, Marnes la Coquette, France) como um corante fluorogênico e como sistema de detecção o iCycler iQ Real-Time PCR da BioRad Laboratories (Hercules, CA, USA). Os parâmetros do PCR foram: uma desnaturação inicial de 5 minutos à 95° C seguida de 45 ciclos de 30s à 95° C e 30s à 60° C. Nós desenhamos os primers forward e reverse com o software Beacon Designer; As especificidades foram atribuídas de forma independente com o software Blast. Os primers usados para amplificação foram: Bmal1 forward 5'GACTTCGCCTCCACCTGTTC3', reverse 5'CATTGTCTGGTTCACCTGTCTTCG3'; Per1 forward 5'GCCGTGCTGCCTGCTCATTG3', reverse 5'AACTTGGTGTGTGCCGTGTGG3'; Per2 forward 5'GCACGCTGGCAACCTTGAAG3', reverse 5'GGCTGGCTCTCACTGGACATTAG3'; e b-2-microglobulin forward 5'GATGGCTCGCTCGGTGAC3', reverse 5'CGTAGCAGTTGAGGAAGTTGG3'. A expressão relativa dos níveis de expressão de Bmal1, Per1 e Per2 foram calculadas usando o método comparativo do  $\Delta$ CT (Livak & Schmittgen, 2001).

## 4.10 Análise estatística

Os resultados das experiências foram expressos como média±erro padrão com 4-6 ratos por ponto temporal (mães e seus respectivos embriões/filhotes). Os níveis de expressão relativa de RNAm nas diferentes culturas de fibroblastos foram calculados usando o método comparativo do  $\Delta$ CT e a beta-2-microglobulina como gene de referência. A aplicabilidade do método CT foi primeiramente validada pela determinação de como as eficiências de amplificação dos diferentes transcritos incluindo a beta-actina variava com a diluição das amostras. As experiências mostraram que a eficiência da amplificação do PCR foi a mesma para todos os genes estudados e que a expressão da beta-2-microglobulina não foi influenciada nem pela idade nem pela dieta das mães.

Para testar a presença de ritmos circadianos nos genes estudados, no consumo alimentar e na glicemia, a série de dados temporais foi primeiramente analisada por *one-way* ANOVA. A existência de um efeito significativo de tempo associado com a aproximação dos valores máximos e mínimos para o consumo alimentar/glicemia ou expressão gênica em dois intervalos temporais separados foram utilizados como uma evidência da presença de um ritmo circadiano. Nós realizamos também uma análise cosinor para confirmar estas hipóteses e para determinar os efeitos da dieta materanal nos parâmetros circadianos do ritmo (mesor, amplitude, acrofase, etc – não publicado) de cada um dos genes.

Para verificar as diferenças nos níveis de expressão gênica (1ª experiência) e no consumo alimentar e glicemia (2ª experiência) entre os grupos nos diferentes pontos temporais, os dados foram analisados pelo *two-way* ANOVA com a dieta materna (controle ou hipoprotéica) e ZT como fatores. Quando efeitos significativos eram encontrados, o teste de Bonferroni para comparações múltiplas era utilizado. A diferença estatística entre o peso dos animais LP e C eram calculados pelo teste t de Student. A significância estatística foi ajustada em  $p < 0.05$ .

## 5. Resultados

### 5.1 Artigo - Effect of perinatal protein restriction on the inducibility of *bmal1*, *per1* and *per2* transcripts in fibroblast primary cultures established from mothers and first generation offspring

#### Authors :

**André de Sá Braga Oliveira**<sup>1,\*</sup>, Paula Honorio de Melo Martimiano<sup>1</sup>, Elizabeth Nascimento<sup>2</sup>, Anthony Pagniez<sup>1</sup>, Sandra Lopes de Souza<sup>3</sup>, Raul Manhães de Castro<sup>2</sup>, Francisco Bolaños-Jimenez<sup>1</sup>, Bertrand Kaeffer<sup>1</sup>

**Address :** 1.UMR-1280, Physiologie des Adaptations Nutritionnelles, INRA-Université de Nantes, Nantes, France ; 2. Departamento de Nutricao, Centro de Ciencias da Saude, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil ; 3 Departamento de Anatomia, Centro de Ciencias Biologicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

(\*) Present Address : Departamento de Anatomia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Moraes Rego, S/N, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brasil.

Correspondence : Bertrand.Kaeffer@univ-nantes.fr

#### Acknowledgements :

We thank Ms Blandine Castellano and Mr Guillaume Poupeau for valuable assistance in husbandry; Dr Pierre De Coppet for helpful support with qPCR. The work was partly financed by CNPq / FACEPE, Brazil and the Ligue de la Recherche contre le Cancer through a collaboration with Pr Frédérique Savagner. AO and PM were recipients of doctoral grants from Capes-Cofecub initiative #657-09.

#### Abstract :

##### Background:

Individuals exposed to a nutritional deficiency during perinatal development have, once they reach adulthood, a higher risk of developing obesity, type 2 diabetes and cardiovascular

disease compared with individuals of the same age fed on a balanced nutrition. Here, we have explored whether protein restriction during the perinatal period acts as a major selective pressure on the capacity of synchronization of *in vitro* propagated fibroblasts sampled in dyads.

**Material and Methods:** Low Protein (8 g% of protein) or normoprotein (18 g% protein) diets were offered during gestation and lactation. Circadian food intake and glycemia during pregnancy and lactation of Low-Protein and Control mothers were registered. High density cultures of fibroblasts from dyads [mother (Day-17 Gestation; Day-65 after fecundation) and first generation offspring (Day-17 embryo and D-35 young adult)] were submitted to a serum shock to re-induce oscillations of *bmal1*, *per1*, and *per2* transcripts. Relative expression of transcripts were assayed by qPCR.

**Results:** Total blood glucose of Control and specially of Low Protein mothers during pregnancy were significantly lower than those before pregnancy with independent alterations in the rhythm of food consumption. Fibroblasts from Low Protein mothers exhibited significant differences in the expression levels of *bmal1* at ZT 6 and ZT 18 in relation to those of controls. In contrast, fibroblasts of Low Protein embryos were affected by protein restriction during early life for *per1* and *per 2* genes at ZT 0 and ZT 24 (only for *per 2*).

**Conclusion:** Our results are clearly in favor of an altered capacity of re-induction of these transcripts in fibroblasts that is dependent on the perinatal history of the donor. In addition, sampling in dyads reveals that the synchronization capacity of fibroblasts for *bmal1* and *per1* transcripts are different between fetus, pups and mothers except for *per2*. Responses to perinatal and posnatal environment reflect the plasticity of development and the “decisions” made by the first generation offspring optimizing early development with lasting consequences.

**Key words:** Nutritional programing, Intrauterine growth restriction, Gestation, Lactation, Non-invasive assay

## Introduction

Almost all organisms on earth, from cyanobacteria to humans, exhibit daily changes in a variety of physiological processes, such as gene expression, metabolism, and behavior (*Dunlap, 1999; Cermakian & Sassone-Corsi, 2000*). By developing an endogenous circadian (circa – about; dies - day) clock, which can be entrained to external stimuli, primarily light, animals and plants ensure that physiological processes are performed at the appropriate, optimal time of day or night (*Panda et al., 2002*). The clock core machinery, e.g., in constant darkness, the endogenous rhythms free-run, generating cycles of approximately but not exactly 24 hours.

At the molecular level, a transcription/translation-based negative feedback loop constitutes the core oscillator of the circadian clock. This loop involves a well concerted regulation of *Per*, *Cry*, *Clock*, *Bmal1* genes and their products (*Takahashi et al., 2008*). The core oscillatory mechanism seems to be common to both the central clock localized in the hypothalamic suprachiasmatic nucleus (SCN) and peripheral clocks distributed in most tissues and cells (*Zylka et al., 1998; Balsalobre et al., 1998; Yagita et al., 2001*). The cyclic gene expression in peripheral clocks is probably sustained by synchronization with some neural and/or humoral signals generated by the SCN in a circadian manner (*Yamazaki et al., 2000; Brown & Schibler, 1999; Ishida et al., 1999*).

Mice with both global and tissue-specific loss-of-function mutations in core clock genes display several metabolic alterations like hyperlipidemia, hepatic steatosis hyperinsulinemia/hyperglycemia (*Marcheva et al., 2009; 2010; Turek et al., 2005*), impaired insulin secretion (*Marcheva et al., 2010*). Conversely, nutritional and metabolic signals impinge on the circadian clock. Actually, both food availability and the energetic content of food are potent entraining cues for the circadian clock. Thus, when nocturnal animals such as rats and mice have access to food only during the light phase of day / night cycle, changes in the circadian profile of expression of clock genes occur in the liver and other peripheral tissues but not in the suprachiasmatic nuclei (*Stokkan et al., 2001; Damiola et al., 2000*). In contrast, when animals receive only 50-60% of their daily food intake once a day during the light cycle, the circadian rhythm of the central clock is also affected (*Challet et al., 1997; Mendoza et al., 2005; 2007*). The SCN-driven behavioral rhythms can also be entrained by palatable food reward (*Challet et al., 1996; Andrade et al., 2004; Caldelas et al., 2005; Mendoza et al., 2007*). and high-fat feeding alters the circadian expression in the hypothalamus and several peripheral organs of core-clock genes as well as of several genes involved in the regulation of key metabolic processes (*Kohsaka et al., 2007*)

Interestingly, transient nutritional manipulations during perinatal development, induce long-lasting alterations of the circadian clock. Thus, protein restriction during perinatal development in rat (Orozco-Solis et al., 2011) and mice (*Sutton et al., 2010*) results in an altered circadian expression pattern of gene expression in the hypothalamus and liver. These later observations are linked to the epidemiological studies in humans and experimental

results in several animal species showing that individuals exposed to a nutritional deficiency during *in utero* or neonatal development are at higher risk of developing obesity, type 2 diabetes and cardiovascular disease than individuals of the same age exposed to a balanced nutrition during their intrauterine and neonatal development (**Hales & Barker, 2001**).

It is worth mentioning that not only the nutritional status can affect the rhythm of the circadian clock. Gestation itself can change the synchronization of the central and peripheral clocks. Thus, the rhythm amplitude of body temperature during the day decreases during gestation and increases during lactation in the rat (**Kittrell and Satinoff, 1988**). Similar changes in drinking rhythms occur between lactation and post-lactation (**Kittrell and Satinoff, 1988**). Moreover, the bimodal rhythm of *Fos* expression in the ventral subparaventricular zone (vSPZ) of the hypothalamus observed in diestrous rats disappears in pregnant rats and, conversely, the expression of *Fos* in the shell of the suprachiasmatic nucleus is increased through the whole light cycle in pregnant but not in diestrous rats (**Schrader et al., 2010**). Altered rhythms of *Fos* expression between diestrous and pregnant rats have also been observed in other brain regions involved in the regulation of body temperature and the sleep/wake cycle (**Schrader et al., 2012**). However, we ignore what is the relationship, if any, between these changes in the circadian clock during pregnancy and the metabolic differences between the gravid and non-gravid state and, notably, the insulin resistance state pregnancy. Moreover, how the gene expression pattern of the core genes of the circadian clock is modified by pregnancy and how this modification impinge on the circadian clock of the offspring, has not been examined to date.

Given the long-term effect of protein-restriction during gestation and lactation on the offspring's circadian clock, here we sought to determine whether this nutritional manipulation alters the circadian pattern of expression of core clock genes in the dam and whether the malnutrition-induced changes on the maternal circadian clock are imposed to the foetus and persist in the long term.

## **Material and Methods**

### ***Ethical Committees***

The first experimental protocol was approved by the “Comité d'éthique pour l'expérimentation animale, Pays de la Loire, France” under number 06 (March 20th, 2013; CEEA.2010.38). Studies on rats were realized according to the rules of the Nantes animal experimental unit (in compliance with the European Communities Directive of 24 November 1986 (86/ 609/EEC) and the Principles of laboratory animal care (NIH publication no. 85–23, revised 1985).

The second experimental protocol was approved by the Ethical Committee for Conduction of Animal Studies at the Sciences Biological Center, University Federal of Pernambuco (UFPE, protocol number: 23076.018780/2014-70). All animals were cared for in accordance with the principles and guidelines of the Canadian Council on Animal Care as outlined in the Guide to the Care and Use of Experimental Animals.

In both protocols, the female Wistar rats were individually housed in polypropylene cages in an environmentally controlled clean air room, with a temperature of  $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ , a 12 h dark /12 h light cycle and a relative humidity of 60-70%. The body weight of rats did not differ at the beginning of the experimental period (220 – 250g) due to the inclusion criteria previously established such that it would not influence the pregnancy development.

### ***Diet***

During all experiments, the animals were maintained with diet and water *ad libitum*. Low-protein (8 g% of protein) or normoprotein (18 g% protein) diets were offered during gestation and lactation. The composition of diets was previously described by Nascimento et al., 2013.

### ***Experimental Design***

Female Wistar rats were used at the beginning of study (8 weeks, weighing 200–224g). On arrival, the rats were housed either under a photoperiod 12 h light/dark cycle (lights on at 08:00 to 20:00 h) or a 12 h dark/light (lights on at 20:00 to 08:00 h) reversed cycle. All handling during the dark period was done under dim red light ( $< 2$  lux), in a temperature-controlled ( $21\pm 2^{\circ}$ ) and air conditioned housing room (relative humidity:  $60\pm 10\%$ ). Animals were kept undisturbed for 2 weeks for adaptation. After confirmation of mating by visualization of spermatozoa in vaginal smears, the dams were housed individually and randomly assigned as low-protein (LP) and control (C) groups. Body weight gain and food intake of dams during gestation and lactation were determined. One day after delivery, litter size was adjusted to eight pups per dam with an equal sex ratio. At weaning (21 days), only male rats remained in the study and all control (C) and protein-restricted (LP) pups were onto

standard chow (*Purina do Brasil*) until the end of experiments. Timing of delivery, litter size and pup weight were recorded at birth.

### ***PCR analysis during pregnancy and lactation of Low-Protein and Control rats***

Pregnant rats (n = 24, weighing 200–224 g, purchased from Janvier, Rennes, France) under a photoperiod 12 h light/dark cycle (lights on at 08:00 to 20:00 h) were randomly divided in four groups (2 control and 2 low protein groups) for the molecular biology studies: **1)** control mothers until the 17<sup>th</sup> day of gestation (C1, fed control diet during gestation, n = 6) and their respective control embryos at the same gestational age (C1<sub>E</sub>, fed control diet during gestation, n = 6); **2)** control mothers until the 23<sup>th</sup> day after weaning (C1-AG, fed control diet during gestation and lactation, n = 6) and their respective control pups until the 14<sup>th</sup> day after weaning (C1<sub>P</sub> = 35-old-day pups, fed control diet during gestation and lactation, n = 6); **3)** low protein mothers until the 17<sup>th</sup> day of gestation (LP1, fed low protein diet during gestation, n = 6) and their respective low protein embryos until the 17<sup>th</sup> day of gestation (LP1<sub>E</sub>, fed low protein diet during gestation, n = 6); **4)** low protein mothers until the 23<sup>th</sup> day after weaning (LP1-AG, fed low protein diet during gestation and lactation, n = 6) and their respective low protein pups until the 14<sup>th</sup> day after weaning (LP1<sub>P</sub> = 35-old-day pups, fed low protein diet during gestation and lactation, n = 6). The experimental design is shown in **Figure 1**.

We performed a comparative analysis, by quantitative PCR, of the circadian pattern expression of Clock target genes. These experiments were performed on primary cultures of fibroblast cells from dyads on Day 17 of gestation (mothers and their embryos – C1, C1<sub>E</sub>, LP1, LP1<sub>E</sub>) and also between Day-15 and Day-25 after weaning (mothers and their pups - C1-AG, C1<sub>P</sub>, LP1-AG, LP1<sub>P</sub>) submitted to Low Protein or Control diet during perinatal development.

### ***Circadian food consumption and glycemia during pregnancy and lactation of Low-Protein and Control rats***

Female Wistar rats under a 12 h dark/light (lights on at 20:00 to 08:00 h) reversed cycle (8 weeks, weighing 200–224 g bred from the nucleus of the Biotério de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil) were separated into a group that was not submitted to mating protocol, i.e., non-pregnant rats, fed standard diet until the 90th day of age (NP2, n = 20). These rats after confirmation of mating were randomly assigned as low protein (LP, n = 10) and control (C, n = 10) groups. Control mothers were analyzed at day 17 of gestation (C2, fed control diet during gestation, n = 10) and at day 23 after weaning (C2-AG, fed control diet during gestation and lactation, n = 10). The same protocol was used with the low protein group, i.e., LP pregnant rats were analyzed at day 17 of gestation (LP2, fed low protein diet during gestation, n = 10) and at day 23 after weaning (LP2-AG, fed low



protein diet during gestation and lactation, n = 10). Control and low protein mothers were euthanized by cervical dislocation at this last temporal point (**Figure 1**).

### **Measurement of Food Intake**

Rats before (NP2), during (C2 and LP2) and after 23 days of weaning (C2-AG and LP2-AG) were housed individually in metabolic cages (Charles River). All diets were offer ad libitum. The female rats were fed standard laboratory chow (Purina do Brasil) before pregnancy and after weaning. During pregnancy and lactation the mothers were fed with isoenergetic diets with low protein (8% de protein) or normoprotein (18% protein).

Access to food was restricted to a horizontal slot in the hopper that allowed the rat to eat but not to remove the food. A hollow in the front portion of the hopper retained any food spilled out from the hopper. Water was dispensed from a bottle fixed to the front wall. After a habituation period of 7 days, during which the animals attained a stable pattern of feeding, food intake was monitored every 4 h for the next 3 consecutive days. We determined the following range of Zeitgeber hours (ZT) during a day: ZT0 = 08-12h; ZT4 = 12-16h; ZT8 = 16-20h; ZT12=20-24h; ZT16 = 24-04h; ZT20 = 04-08h; ZT24 = 08-12h

### **Total Blood D-glucose**

Rats before (NP2), during (C2 and LP2) and after 23 days of weaning (C2-AG and LP2-AG) were sampled at the tail of one blood drop to determine the circadian oscillation of total blood glucose by Accu Check Active (Roche-Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) every 4h at the second day of measurement of food intake. Rats were housed in different cages and blood sample every 4h between Zeitgeber time (ZT) 0 to 12 and 12 to 24h.

### **Cell culture**

The sampling was made at the non-innervated rat tail extremity by the method described by *Nascimento et al (2013)*. The biopsy of 10 to 100mg was briefly exposed to Javel water, rinsed twice in a large volume of phosphate-buffered saline solution before exposure to Trypsin-EDTA during 15 min at 37°C. Cellular aggregates were mechanically disaggregated by vigorous pipetting (20 times). Cellular suspensions were layered on top of a cushion of 3 ml DMEM +20% fetal calf serum and centrifuged at 1,3000g for 3 min at room temperature. The cellular pellet was resuspended in 10 ml DMEM medium +10% fetal calf serum, amphotericin-B (1/1000) and gentamicin (100 mg/50 ml) and inoculated in 25 cm<sup>2</sup> flask (NuncH) in a humidified incubator (37 oC, 5% CO<sub>2</sub>). Within three to five days, colonies of active cells were seen. In flask inoculated with fast-growing cells, confluency was reached within a week. Cells were resuspended by trypsinization and used to prepare a cryotube (in

95% fetal calf serum with 5% DMSO, stored in a Nalgen box before being kept permanently at 27°C) and to inoculate tissue culture dishes (LabTek, P-96 or 25 cm<sup>2</sup> flask). Circadian rhythmicity of the cells was performed by a serum shock (DMEM 50% Dulbecco®). The activity of the clock before sacrifice of dams was assessed by recording their circadian food intake during pregnancy and lactation.

### **Quantitative RT-PCR analysis**

Animals were killed under *ad libitum* feeding conditions by a cervical dislocation. A little part of tail was removed for making the culture of fibroblasts. After serum shock, cells were collected every 6 hours over a period of 30h (6 temporary points including the first point 2h). Total RNA was extracted using the Trizol reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), treated with DNase (RNase free) for 30 min at 37°C and subsequently purified using the mini-column purification kit NucleoSpin from Macherey-Nagel (Hoerd, France) according to the manufacturer's instructions. The quality was checked on agarose gels and the quantity determined using a NanoVue™ Plus Spectrophotometer GE Healthcare at 260 and 280 nm. Afterwards, 1 mg of purified RNA was reversed-transcribed using Superscript II RNaseH-Reverse- Transcriptase (Invitrogen) in a total volume of 20 µl and the resulting cDNA was diluted 40-fold in DNase- and RNase-free water. Thereafter, 5 µl of each cDNA diluted sample was used as template for PCR amplification using SYBR Green (Biorad, Marnes la Coquette, France) as fluorogenic intercalating dye and the iCycler iQ Real-Time PCR detection system instrument from BioRad Laboratories (Hercules, CA, USA). PCR parameters were: an initial denaturation step of 5min at 95°C followed by 45 cycles of 30 s at 95°C and 30s at 60°C. We designed forward and reverse primers with Beacon Designer or PerlPrimer software; the specificities were assigned independently on line with the Blast software. The primers used for the amplification were: Bmal1 forward 5'GACTTCGCCTCCACCTGTTC3', reverse 5'CATTGTCTGGTTCCTGTCTTCG3'; Per1 forward 5'GCCGTGCTGCCTGCTCATTG3', reverse 5'AACTTGGTGTGTGCCGTGTGG3'; Per2 forward 5'GCACGCTGGCAACCTTGAAG3', reverse 5'GGCTGGCTCTCACTGGACATTAG3'; and b-2-microglobulin forward 5'GATGGCTCGCTCGGTGAC3', reverse 5'CGTAGCAGTTGAGGAAGTTGG3'. Relative expression levels of Bmal1 and Period1 mRNAs was calculated using the comparative  $\Delta\text{CT}$  method (*Livak & Schmittgen, 2001*).

### **Statistical Analyses**

Experimental results are expressed as means $\pm$ s.e.m. with four–six rats per time point (mothers or their embryos/pups). The relative expression levels of the mRNAs in the different fibroblast cultures were calculated using the comparative  $\Delta\text{CT}$  method and b-2-microglobulin RNA as housekeeping gene. The applicability of the CT method was first validated by

determining how the amplification efficiencies of the different transcripts including b-actin varied with template dilution. These experiments showed that the efficiency of the PCR amplification was the same for all the genes and that the expression of b-2-microglobulin was not influenced either by age or the mother diet.

To test the presence of circadian rhythms of genes, food intake and glycemia, time series data were first analyzed by *one-way* ANOVA. The existence of a significant effect of time associated with the clustering of the maximum and minimum values for food ingestion or gene expression into two separate time intervals were used as an evidence of the presence of a circadian rhythm. We performed cosinor analysis (time series analysis serial cosinor program - <http://www.euroestech.com/>) to confirm these hypotheses and to determine the effects of the maternal diet on the circadian parameters of the rhythm (mesor, acrophase, amplitude, etc – non published) for each one of the genes.

To ascertain the differences in the levels of gene expression (1<sup>st</sup> experience) or glycemia and food intake (2<sup>nd</sup> experience) between the groups at the different time points, data were analyzed by two-way ANOVA with mother diet (control, low-protein) and ZT as factors. When significant effects were found, Bonferroni's test for multiple comparisons was performed. The statistical difference between C and LP animals in body weight was evaluated by Student's t-test. Statistical significance was set at  $p < 0.05$ .

## Results

### Low Protein mothers had a lower body weight gain and a lower food intake during the second week of lactation

The use of low protein diet during pregnancy promoted lower body weight in LP1 group compared with controls ( $p = 0.002$ ) and the lowest percentage of body weight gain in LP1-AG group compared to C1-AG ( $p = 0.009$ ) in the last week of gestation (**Table 1**). However, at the beginning of lactation, the groups were not different on these 2 parameters. Maternal protein restriction had no effect on litter size or pup survival (mean number of pups per dam LP<sub>p</sub>  $12.05 \pm 0.76$  versus C<sub>p</sub>  $= 11.53 \pm 0.80$ ,  $p = 0.73$ ).

The weekly control of food intake during pregnancy shows no direct relationship with body weight gain since although the LP1 group ingested larger amount of food in the 1st week of gestation ( $p = 0.01$ ), it was not observed concomitant increase in body weight gain. Similar situation was observed in the 2nd week of pregnancy where there was no difference of food intake between the LP1 and C1 groups, although LP1 showed lower body weight gain at this week ( $p = 0.07$ , **Table 1**).

During lactation, diet was not able to modify the final weight of mothers or to promote differences in body weight gain in each week assessed. However, the LP1-AG group had lower food intake in the 2nd week of lactation ( $p = 0.01$ ), as seen in **Table 1**. We have obtained similar results during Experiment 2 (unshown).

**Table 1 - Effects of maternal low-protein diet in different perinatal periods on nutritional parameters of dams.** Data are from Experiment 1 with n = 6 for each group). C1 - control mothers until the 17<sup>th</sup> day of gestation, LP1 – low-protein mothers until the 17<sup>th</sup> day of gestation, C1-AG - control mothers until the 65<sup>th</sup> day after the beginning of gestation, LP1 – low-protein mothers until the 65<sup>th</sup> day after the beginning of gestation. Data expressed in mean ± SEM \* p<0.05 CTRL versus LP using t test of Student.

	Groups							
	C1		LP1		C1-AG		LP1-AG	
	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM
<b>Gestation</b>								
Initial body weight (g)	261.8	7.2	248.7	9.1	246.8	5.3	257.6	3.8
Final body weight	372.8	6.1	352.6	4.7*	415.5	9.6	432.6	12.4
Body weight gain (%)								
1 <sup>st</sup> week	11.44	1.32	12.89	1.52	13.91	0.9	13.01	1.38
2 <sup>nd</sup> week	18.1	1.28	14.93	0.84	15.97	1.15	13.97	1.43
3 <sup>rd</sup> week	13.19	2.21	14.48	1.81	38.51	0.99	30.34	2.3*
Food Intake (g/100g)								
1 <sup>st</sup> week	6.8	0.2	8.1	0.4*	7.5	0.4	8.6	0.4
2 <sup>nd</sup> week	6.1	0.4	6.9	0.3	7.1	0.3	7.5	0.5
3 <sup>rd</sup> week	-	-	-	-	6.9	0.6	7.0	0.7
<b>Lactation</b>								
Initial body weight	-	-	-	-	326.3	10.4	341.0	8.3
Final body weight	-	-	-	-	319.7	8.9	311.4	11.1
Body weight gain (%)								
1 <sup>st</sup> week	-	-	-	-	0.61	1.67	-0.38	1.05
2 <sup>nd</sup> week	-	-	-	-	1.19	1.27	-2.55	1.83
3 <sup>rd</sup> week	-	-	-	-	-3.70	1.59	-5.65	1.79
Food Intake (g/100g)								
1 <sup>st</sup> week	-	-	-	-	7.30	1.00	9.30	1.10
2 <sup>nd</sup> week	-	-	-	-	14.00	0.30	11.70	0.7*
3 <sup>rd</sup> week	-	-	-	-	16.10	0.50	14.90	0.80

### **Suckling pups from Low Protein mothers presented lower body weight gain than controls after the 13<sup>th</sup> day of delivery**

At birth, the offspring born to LP1-AG dams exhibited similar body weight in relation to their control (C1-AG) counterparts ( $LP_p$   $6.45 \pm 0.06$  vs  $C_p$   $6.87 \pm 0.13$  g,  $n=48$ ,  $p>0.05$ ). However, after day 13,  $LP_p$  exhibited lower body weight than  $C_p$  which persisted until the end of the experiment (Day 35). Offspring born to LP1-AG dams did not present any gain of weight in relation to their initial body weight compared to pups of control rats, except at the day of weaning when their body weight gain was lower in relation to control pups ( $C_p=149.43 \pm 9.19$  % to  $122.32 \pm 9.85$  %,  $p<0.05$ ). We have obtained similar results during Experiment 2 (unshown).

### **Total blood glucose of Low protein rats during pregnancy were significantly lower than those before pregnancy with independent alterations in food intake**

We analyzed mother rhythms not only for food consumption but also for blood sugar before, during and after gestation, submitted or not to a low-protein diet during perinatal period (**Figures S1; 3-5**).

Both LP and control dams exhibited a typical circadian profile of feeding characterized by the higher food intake during the night period (**Figures S1 and 3**). An inspection of the nocturnal pattern of feeding showed the existence of two peaks of feeding in both groups of animals. The first one took place within the 4 h following the extinction of the lights (ZT24) whereas the second one occurred at the end of the dark photoperiod (ZT8). During this last period, the levels of food ingestion in dams during pregnancy ( $LP_2$ ) were significantly lower than those before pregnancy ( $NP_2$ ; **Figure 3**,  $p<0.05$ ), but did not differ from the rats after pregnancy ( $LP_2$ -AG).

There were no food consumption changes before, during and after pregnancy ( $p>0.05$ ) in control animals, but the rhythm of glucose presented clear differences. Gestation alters glucose levels ( $C_2$  x  $C_2$ -AG, at ZT16 and ZT20 with  $p<0.001$  and at ZT4 with  $P<0.05$ ) independent of food intake. After pregnancy, the rate of glucose tends to return to the pre-gestational levels ( $NP_2$  x  $C_2$ -AG,  $p>0.05$ ; except 20h,  $p<0.001$ ). When we compare the rhythms during ( $C_2$ ) and after gestation/weaning ( $C_2$ -AG), we observed a difference in the dark cycle (Z16h,  $p<0.05$ ). These changes in blood sugar are also held in undernourished mothers, more clearly (**Figure 5**).

### **Effect of pregnancy on the circadian gene expression pattern of core clock genes**

Pregnancy altered mainly the re-induction of *Bmal1* in the studied mothers. As illustrated in **Figure 2**, C1-AG group displayed a significant difference in the expression levels of *Bmal1*

and Per 1 between pregnancy and at Day-65 after fecundation (Bmal 1 – all ZTs, time F-value = 17.56, interaction F-value = 3.94,  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$ ; Per 1 – ZT0, time F-value = 91.98, interaction F-value = 4.51,  $p < 0.001$ ). Moreover circadian rhythm expression of clock genes do not appear to be the same between the fetus (day 17 of gestation) and pups after 35 days of birth. C1<sub>E</sub> animals showed significant differences in the expression of Per 1 and Per 2 in relation to C1<sub>P</sub> animals at some ZTs (per 1 - ZT0, ZT18, ZT24, ZT30, time F-value = 27.08, interaction F-value = 8.51,  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$ ; per 2 – ZT0, time F-value = 14.69,  $p < 0.001$ , interaction F-value = 1.55,  $p > 0.05$ ).

### **Entrainment of embryos and pups rhythms by circadian maternal signals**

As illustrated in **Figures 6 and 7**, the expression of Bmal 1 in fibroblasts of Low-Protein and Control embryos (LP1<sub>E</sub> and C1<sub>E</sub>) did not exhibit a circadian rhythm over 30 hours (by one-way ANOVA and Cosinor analysis,  $p > 0.05$ ). Both Low Protein and Control embryos (LP1<sub>E</sub>, C1<sub>E</sub>) and pups (LP1<sub>P</sub>, C1<sub>P</sub>) displayed strong differences in the expression levels of Bmal 1, Per 1 and Per 2 in relation to their respective mothers ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$ ), except for Per 2 between control embryos and their respective mothers ( $p > 0.05$ ).

### **Fibroblasts of Low Protein embryos were affected by protein restriction for per1 and per 2 transcripts in contrast to fibroblasts established from the mothers**

One-way ANOVA and Cosinor analysis showed that the rhythmic expression of per 1 and per 2 in fibroblasts was preserved in Low-Protein mothers in the 17<sup>th</sup> day of gestation (LP1) and in their respective embryos (LP1<sub>E</sub>) in the same temporal point (**Figure 8**), but not for bmal 1 which was not rhythmic both for LP and Control groups. LP mothers (LP1) exhibited significant differences in the expression levels of bmal 1 at ZT 6 and ZT 18 in relation to control animals. In contrast, LP embryos (LP1<sub>E</sub>) were affected by protein restriction during early life for per1 at ZT 0 and ZT 24 and for Per 2 gene at ZT24.

### **Fibroblasts of Low Protein mothers after gestation exhibited a single difference in the expression levels of Bmal 1 at ZT 0 but fibroblasts from D-35 pups were affected for all genes studied**

One-way ANOVA and cosinor analysis showed that the rhythmic expression of per 1, per 2 and bmal 1 in fibroblasts was preserved in mothers at Day-65 after fecundation (LP1-AG) and in their respective pups at Day-35 of life (LP1<sub>P</sub>) at the same temporal point. LP mothers after gestation (LP1-AG) exhibited a single difference in the expression levels of Bmal 1 at ZT 0 in relation to control animals (**Figure 9**). In contrast, LP1<sub>P</sub> fibroblasts were affected by protein restriction during early life for all genes studied.

## Discussion

In our study, choosing fibroblast cells is fully justified by the fact that these cells have an independent and self-sustained oscillator whose function continues even during cell division (**Brown et al., 2005**). We have shown that fibroblasts from the tip of rat tail can be non-invasively recovered from the same animal and that these cells can be used to study the alterations of clock machinery respectively to the diet of rat pups (**Nascimento et al., 2013**). After propagation in culture, fibroblasts are losing their synchronization and clock transcript oscillations should be re-induced by a serum shock applied for 1-2 hours (**Balsalobre et al., 1998; 2000**). **O'Neill et al (2008)** have proposed that mature fibroblast cultures will be of great utility for high-throughput pharmacological and mutational circadian screening. Recently, **Noguchi et al (2013)** have used transgenic fibroblast for Per2 gene to demonstrate that the circadian rhythmicity in tissue culture depends on cellular density. In addition, these authors have shown that fibroblasts require paracrine signals from adjacent cells for normal expression of rhythmicity, and that these signals are specific to fibroblasts. Non-invasive isolation of fibroblasts allows assaying for the capacity of re-induction of clock transcripts on cultured cells. Protein restriction during the perinatal period acts as a major selective pressure on the capacity of synchronization of in vitro propagated fibroblasts.

In the present study, we first found that the rhythmic oscillations of *bmal1*, *per1*, and *per2* transcripts in fibroblasts were altered during pregnancy comparatively to those of the same mother sampled at Day-65 after fecundation. This observation strongly suggests that all aspects of mammalian physiology, including reproduction, are controlled by the circadian system, which evolved to anticipate and adapt to daily changes in the environment (**Dibner et al., 2010**). In reproducing females (i.e. pregnant and lactating) the survival of offspring becomes a priority, and changes in circadian rhythms in behavior and physiology through reproductive states of estrous cycle, pregnancy and lactation likely reflect response to these demands. For example, studies with laboratory animals showed that the phase of body temperature rhythm was advanced and the amplitude decreased to compensate for increases in the daily temperature minimum during pregnancy (**Kittrell et al., 1988**). Further, to compensate for the increased need for sleep in early pregnancy, sleep patterns are also altered in rodents (**Kimura et al., 1996; Schrader et al., 2012**).

Numerous physiological and behavioral adaptations occur in the dam so she can meet the nutritional demands of her pups, including increased absorptive capacity of the gut and metabolic capacity of the liver (**Williamson, 1980**), as well as dramatic increases in food intake and meal pattern changes (**Smith & Grove, 2002; Augustine et al., 2008**). Our data show that the transition from late pregnancy to a later state after weaning and beyond is not associated with any modification of food intake. However, we have found several molecular alterations in peripheral clock, especially in *Bmal1* mRNA expression in the fibroblasts of mothers. This is corroborated by studies that show that the transition from late pregnancy to lactation is associated with changes in both central (SCN) and peripheral (liver and mammary gland) clocks and that these changes occur in a tissue-specific manner. The increase in *Per2*



mRNA expression in the SCN of lactating dams has supports the hypothesis that changes in the master clock in the SCN occur during transitions in reproductive states and may result in coordinated changes in tissue-specific metabolism needed to support milk production (**Casey et al., 2014**).

In our study, the capacity to re-induce an oscillation of *bmal1* mRNA in cultured fibroblasts was strongly altered by the transition from gestation to a later period after gestation and lactation. It's well-known that glucose metabolism is related to circadian modifications in *Bmal1* mRNA expression (**Marcheva et al., 2010**). This was confirmed in our study that demonstrates alterations in glucose rhythm between mothers during pregnancy and after pregnancy and this was enhanced by protein restriction during perinatal development. Studies which performed immunofluorescent staining to confirm loss of BMAL1 expression specifically within pancreatic islets and not within brain regions such as the suprachiasmatic nucleus (SCN), arcuate nucleus (ARC), dorsomedial hypothalamus (DMH), and paraventricular nucleus (PVN), showed, by quantitative real-time PCR analysis of key circadian genes in islet and liver from *PdxCre;Bma<sup>1flx/flx</sup>* and control mice, islet-specific alterations in gene expression profiles, further confirming the specificity of the *Bmal1* mutation to the islet (**Marcheva et al., 2010**). Importantly, the pancreas-specific *Bmal1* knockout mice showed normal circadian activity, feeding rhythms, and body weight and composition, as well as our work. So, because the rat fibroblasts mRNA expression of *Bmal 1* during pregnancy and after pregnancy have normal activity and feeding rhythms, as well as normal body weight, the metabolic phenotypes that develop must be due to disruption of the clock network within peripheral clock, rather than due to secondary changes in activity or behavior (**Rudic et al., 2004**).

Another point has to be considered when we study circadian system in mother during gestation: their capacity to entrain the circadian clocks of their offspring, especially during fetal development. Here we observe that the capacity of mother's fibroblasts is different from offspring suggesting that nutritional programming has selected pups with a new synchronization capacity. We know much less about the fetal circadian system. What we do know is that development of circadian rhythms is part of the offspring's development and proceeds normally in the absence of a functional maternal suprachiasmatic nucleus of hypothalamus (SCN). This is demonstrated by normal initiation of the postnatal circadian rhythms in rat pups of mothers devoid of circadian rhythms by SCN lesion or by double knockout *mPer1<sup>Brdn</sup>/mPer2<sup>Brdn</sup>/mPer2<sup>Brdn</sup>* mice or *mPer2<sup>Brdn</sup>/mCry1* mice (**Davis & Reppert, 2001; Jud & Albrecht, 2006**). However, both experimental approaches demonstrate that maternal signals are required to synchronize these postnatal rhythms. In our study we didn't observed a synchronization between the circadian rhythms of mothers and fetus, especially for *Per 1* gene and that desynchronization was enhanced by protein restriction during fetal development of these animals for all genes studied.

Moreover, ontogeny of the expression of clock genes in fetal and newborn peripheral organs has been studied extensively in rodents. Researchers have addressed the expression of clock

genes in whole fetuses and in selected fetal organs in vivo around the clock in mice and rat fetuses (**Dolatshad et al., 2010**). In whole mice fetuses, expression of the clock genes *Per2*, *Cry1*, *Bmal1* and *Clock* was detected from day 10 of gestation to postnatal day-1. However, measurements of the expression of *Per2* and *Bmal1* at 4 h intervals did not show a 24 h pattern in the whole fetus at 10, 14 and 19 days of gestational age. Similar negative results were found in isolated fetal liver, kidney and heart at the two latter ages (**Torres-Farfan et al., 2011**). Maybe these disagreements between studies explain our fetus results. We worked with embryos tails at day 17 of gestation. We think that circadian system in our fetus was not well-expressed at this early gestational age for *Bmal1* gene. In contrast, oscillations in *Per1* and *Per2* genes were observed both in control and low-protein embryos. The same question was explored in other study that worked with the rat fetus at 16<sup>th</sup> day of gestation, with the difference that clock genes were quantified separately in whole head and whole body. An anti-phase 24 h oscillation of *Per2* and *Bmal1* was observed in both compartments. In the rat, day–night differences in *Per2* and *Bmal1* mRNA expression in anti-phase were present in the fetal hippocampus and in the fetal pineal gland. Other brain structures were not tested. At the body level, no oscillation was found in the rat fetal liver, in agreement with findings of other study (**Sladek et al., 2007**). In contrast, a strong oscillation in anti-phase of *Per2* and *Bmal1* was found in the rat fetal adrenal gland (**Torres-Farfan et al., 2011**). Other authors have detected circadian postnatal expression of *Per1:luc* at day of birth in rat the pineal gland, liver, thyroid, and adrenal gland (**Yamazaki et al., 2009**). Altogether, our data and the data available in other studies support two findings: 1) fetal organs are peripheral maternal circadian oscillators, which could be entrained by maternal circadian signals in the dependence of gestational age; 2) the presence of peripheral circadian clocks in fetal rodents at a gestational age at which clock gene oscillation of the fetal SCN is absent.

In fact, despite of the synchronization by maternal cues and lightness, activity of the clock can be also modified by the schedules and the quality of food intake (**Damiola et al., 2000; Mendoza et al., 2007**). The herein presented results presented strong differences in mRNA expression of clock genes between control and low-protein mothers during and after gestation (65 days after the beginning of gestation, i.e, 23 days after weaning when standard feeding regimen was returned), between CTRL and LP embryos and especially between CTRL and LP pups of 35 days of age. We provided *ad libitum* access to food. Consequently, the modifications of the circadian rhythms, we observed, were not imposed by the temporal consumption of food, but were due to the low-protein content of the diet.

Our results altogether have interesting implications. We observed that the rhythm of blood glucose changes in mothers during gestation (G17) without a modification on her food intake and these modifications occur both in control and malnourished mothers (Nascimento, 2013 have shown that total blood glucose rhythm is not circadian but around a period of 16.2 H corresponding to previously published value). This would mean that changes of circadian rhythms of genes studied in embryos and malnourished pups are not entrained by the mother but by the low content of dietary protein. A second interesting point is the fact that protein

restriction during gestation and lactation permanently altered the rhythmicity of several transcripts in fibroblasts, which constitutes strong evidence that the circadian clock has been nutritionally programmed. This proposition is further sustained by our recent results showing that programming of the circadian clock may contribute to the alterations in feeding and energy metabolism associated with malnutrition in early life, especially in peripheral organs, which might promote the development of metabolic disorders in adulthood (Orozco-Sólis et al., 2010).

After all these analysis and by the fact that embryos respond by permanently changing the pattern of their development to enhance maternal nutrient retrieval during subsequent gestation (*Fleming et al., 2015*), we think that mothers responses observed in glucose rhythms without changes in their food intake would mean that the alteration of circadian rhythms of genes studied in malnourished embryos and pups are not entrained by the mother but by the low content of dietary protein. Moreover, the several changes observed in our low-protein embryos during gestation (G17) could act to protect pos-natal life and likely contribute to offspring competitive fitness. However, the resulting growth, especially seen in our low-protein pups, adversely affects long-term health with elevated adult disease risk. We argue that periconception environmental responses reflect developmental plasticity and ‘decisions’ made by embryos to optimise their own development, but with lasting consequences. This arrangement following birth will allow postnatal integration of the scattered fetal peripheral circadian clocks into an adult-like circadian system commanded by the SCN and entrained to the LD cycle. Whether particular situations during pregnancy (diet composition, for example) may impinge on specific fetal peripheral clocks leading to long term metabolic effects in the offspring is just beginning to be explored, especially the molecular pathways.

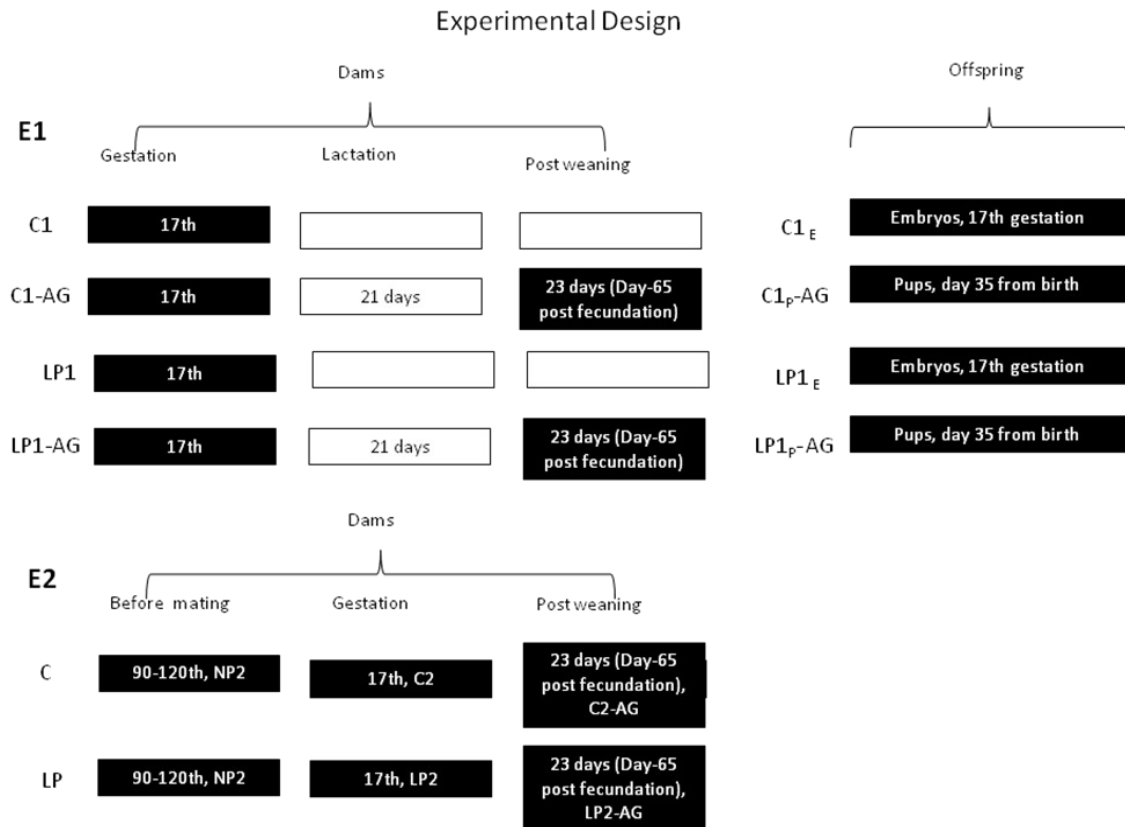
Future works may integrate the description of *Brown et al (2005)* on human fibroblasts which is in favor of a unique circadian clock per fibroblast and our results which are clearly in favor of an altered capacity of re-induction of circadian clock of a population of fibroblasts dependent on the perinatal history of the donor. Transcription of *per2* has been associated with the initiation of the circadian cycle. Our results clearly suggest that the survival of pups undergoing protein restriction during perinatal life is coming with a cost, the strong dysregulation of the circadian cycle initiation.

## 5.2 Article figures and subtitles

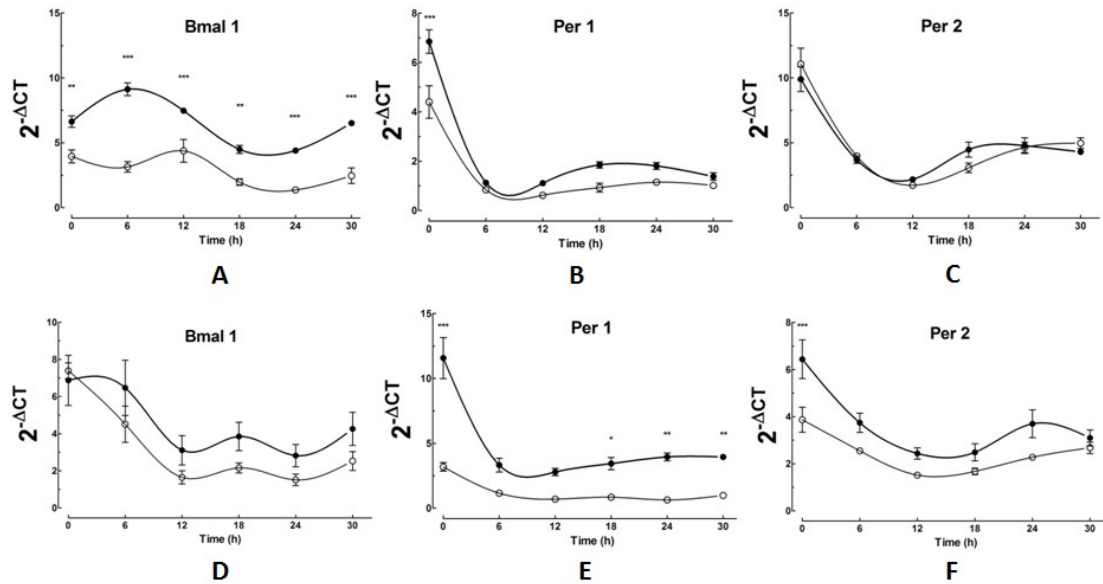
### Figure 1. Experimental design of work (Experiments 1 - E1 and 2 – E2).

C1, C2 = Control mothers (n=6 and 10, respectively) of experiments 1 and 2; C1<sub>E</sub> = Control embryos (n=6); LP1, LP2 = Low-Protein mothers (n=6 and 10, respectively); LP1<sub>E</sub> = Low-Protein embryos; C1-AG = Control mothers After Gestation (23 days post weaning, n=6), C1<sub>P</sub>-AG = Control pups After Gestation (35-old-day pups, n=6); LP1-AG = Low-Protein mothers After Gestation (23 days post weaning, n=6); LP1<sub>P</sub>-AG = Low-Protein pups After

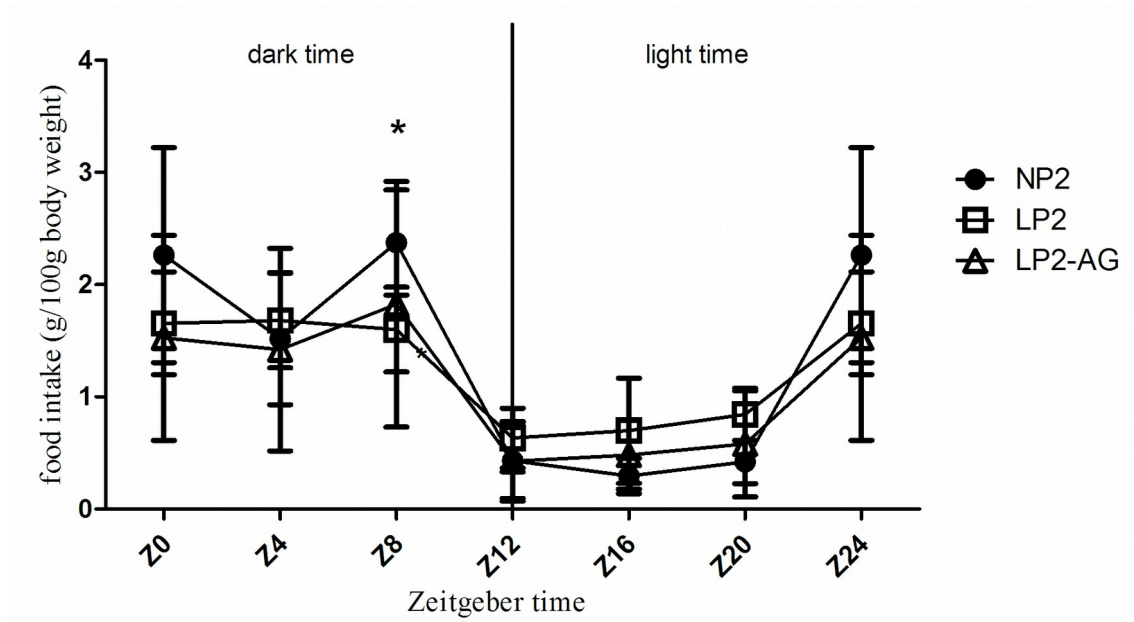
Gestation (35-old-day pups, n=6). NP2 = Non-pregnant rats (C - n=10; LP - n = 10); C2-AG = Control mothers After Gestation (23 days post weaning , n=10); LP2 - AG = Low-Protein mothers After Gestation (23 days post weaning , n=10). Black boxes = day of molecular or circadian food intake/glycemic analysis.



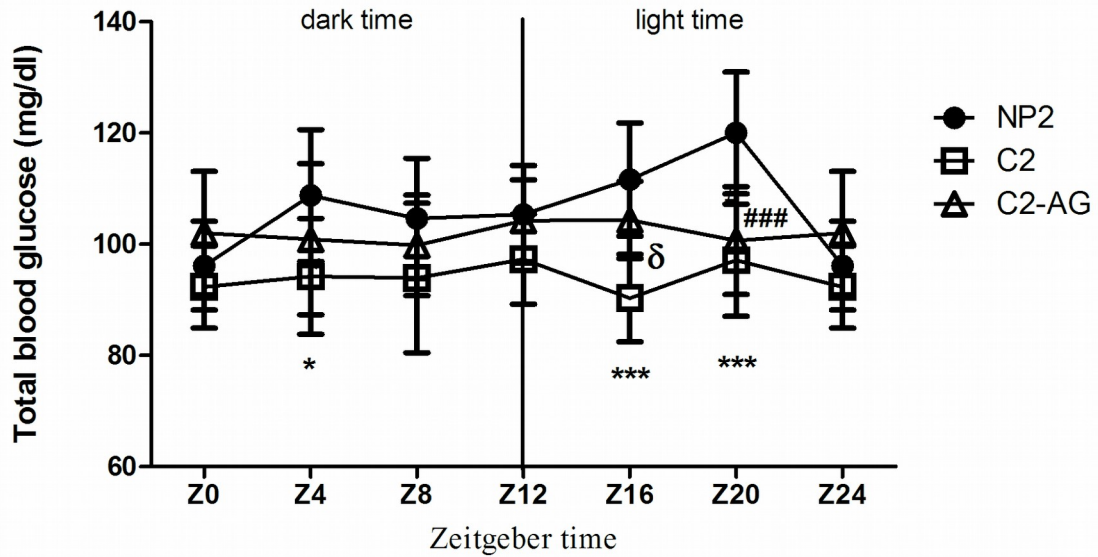
**Figure 2. Re-induction by a serum shock of *bmal1*, *per1* and *per2* in cultured fibroblasts for control groups (mothers at Day-17 of gestation and Day-65 post-fecundation; embryos at Day-17, rat pups at Day-35 of life).** Daily expression profile of *Bmal 1* (A), *Per1* (B) and *Per2* (C) transcripts in fibroblast culture of control mothers on day 17 of gestation (closed circles) and the same mothers after 65 days of the beginning of gestation (i.e., 23 days after weaning - open circles). Daily expression profile of *Bmal 1* (D), *Per1* (E) and *Per2* (F) genes in fibroblasts culture of control embryos on day 17 of gestation (closed circles – C1<sub>E</sub> group) and control 35-day-old pups (open circles – C1<sub>P</sub> group). Values illustrate the relative abundance of each transcript in relation to those of the endogenous *b-2*-microglobulin amplified within the same sample and under the same experimental conditions. \**P*<0.05; \*\**P*<0.01; \*\*\**P*<0.001 (two-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test). Each point corresponds to the mean±s.e.m. expression levels of four–six pups born to at least three different dams.



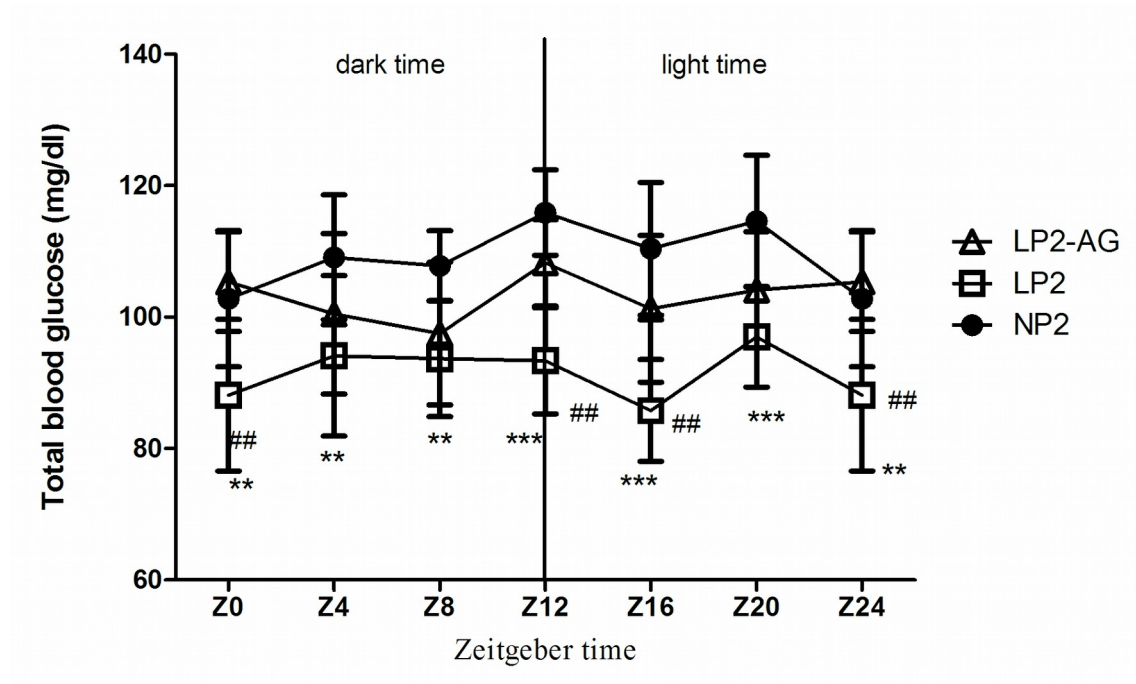
**Figure 3. Daily percentages of food intake of Non-Pregnant and Pregnant rats (Day-17 of gestation and Day-65 post fecundation).** A single difference was observed on dark cycle of food intake, at ZT8 during 3 consecutive days of observations. Data (g/100 g body weight) are expressed in mean  $\pm$  SE. \* $p < 0.05$  NP2 vs LP2, by Two-way RM ANOVA followed by Bonferroni test. NP2 = non-pregnant rats; LP2 = low-protein mothers at day 17 of gestation; LP2-AG = low-protein mothers after 65 days of the beginning of gestation (23 days after weaning). Dams (n = 10) fed low-protein diet during perinatal period.



**Figure 4. Evolution of total blood glucose over 24 hours of Control rats sampled before (NP2), during (C2) and after gestation (C2-AG). Rats fed on control diet. Data are expressed as mean  $\pm$  SE. \*  $p < 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  – NP2 x C2; ###  $p < 0.001$  – NP2 x C2-AG;  $\delta$   $p < 0.05$  – C2 x C2-AG. By two-way RM ANOVA followed by post-hoc of Bonferroni test.**

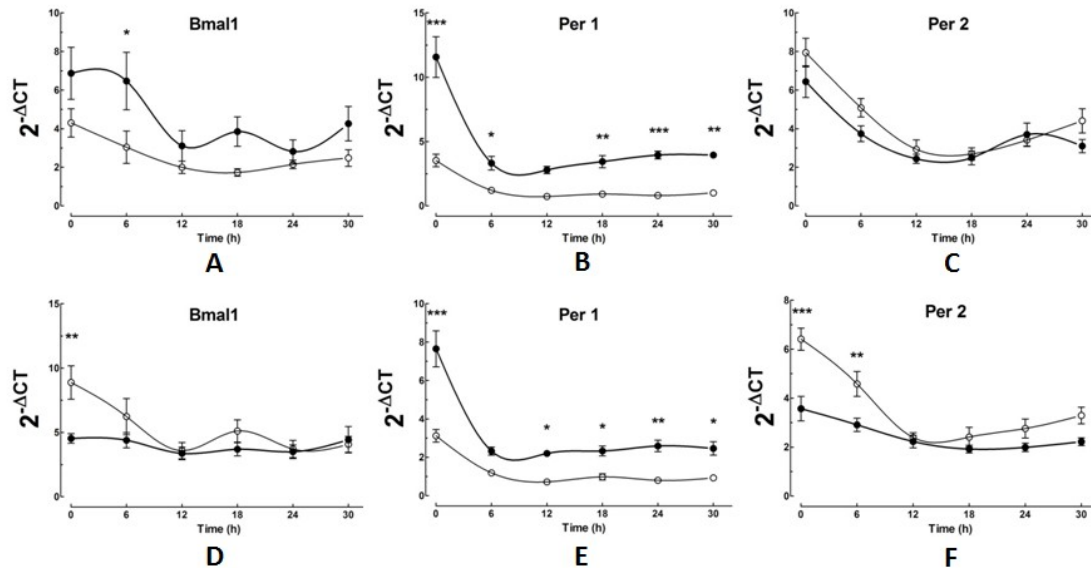


**Figure 5. Evolution of total blood glucose over 24 hours of Low Protein rats sampled before (NP2), during (LP2) and after gestation (LP2-AG). Rats fed on low-protein diet. Data are expressed as mean  $\pm$  SE. \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  – NP2 x LP2; ##  $p < 0.01$ ; ### –  $p < 0.001$  - LP2 x LP2-AG. By two-way ANOVA followed by post-hoc of Bonferroni test.**

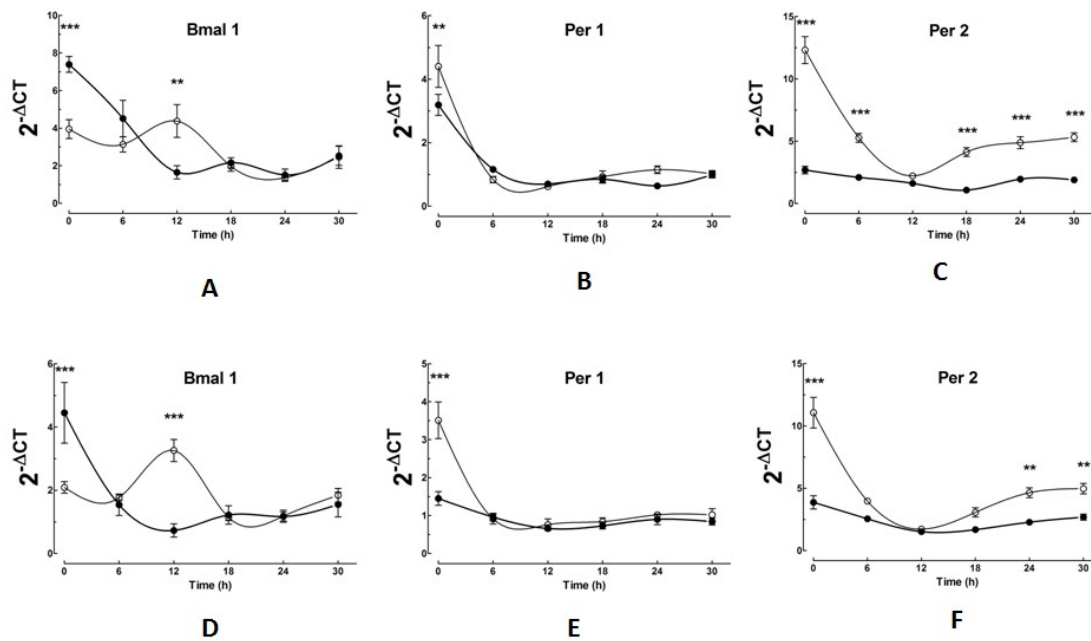




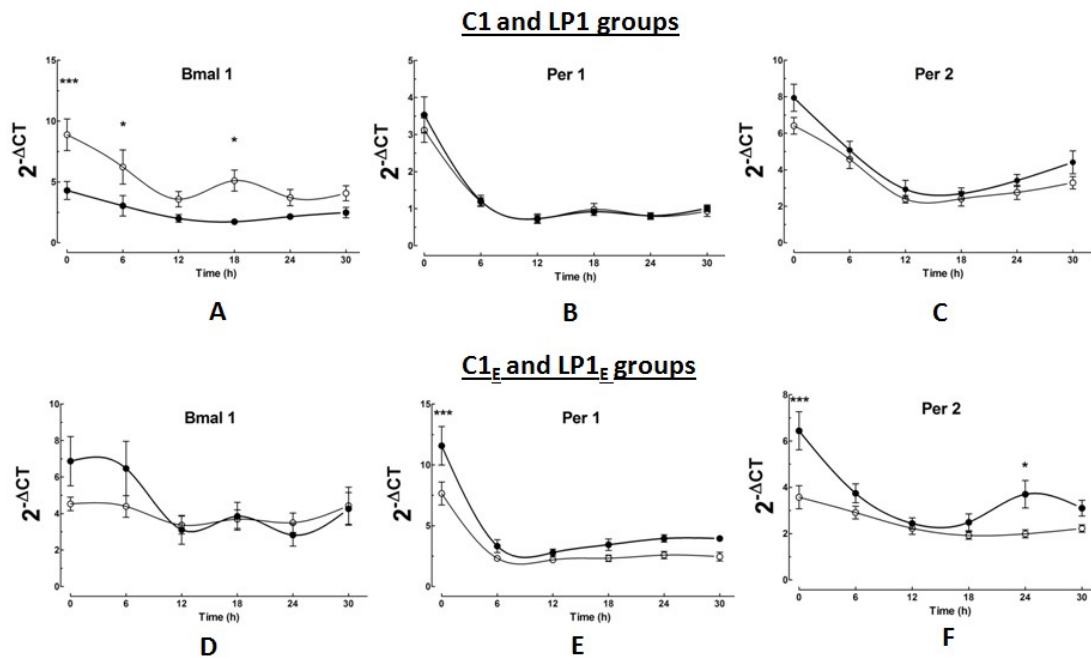
**Figure 6. Re-induction by a serum shock of *bmal1*, *per1* and *per2* in cultured fibroblasts of Low Protein mothers and their embryos at Day-17 of gestation in comparison with corresponding controls.** Daily expression profiles of *bmal1* (A), *per1* (B) and *per2* (C) transcripts in fibroblasts of control embryos at Day-17 of gestation (closed circles – C1<sub>E</sub> group) and their control mothers at Day-17 of gestation (open circles – C1 group). Daily expression profile of *bmal1* (D), *per1* (E) and *per2* (F) genes in fibroblasts of Low-Protein embryos at Day-17 of gestation (closed circles – LP1<sub>E</sub> group) and of corresponding mothers sampled in parallel (open circles – LP1 group). Values illustrate the relative abundance of each transcript in relation to those of the endogenous b-2-microglobulin amplified within the same sample and under the same experimental conditions. \*P<0.05; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001 (two-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test). Each point corresponds to the mean±s.e.m. expression levels of four–six pups born to at least three different dams.



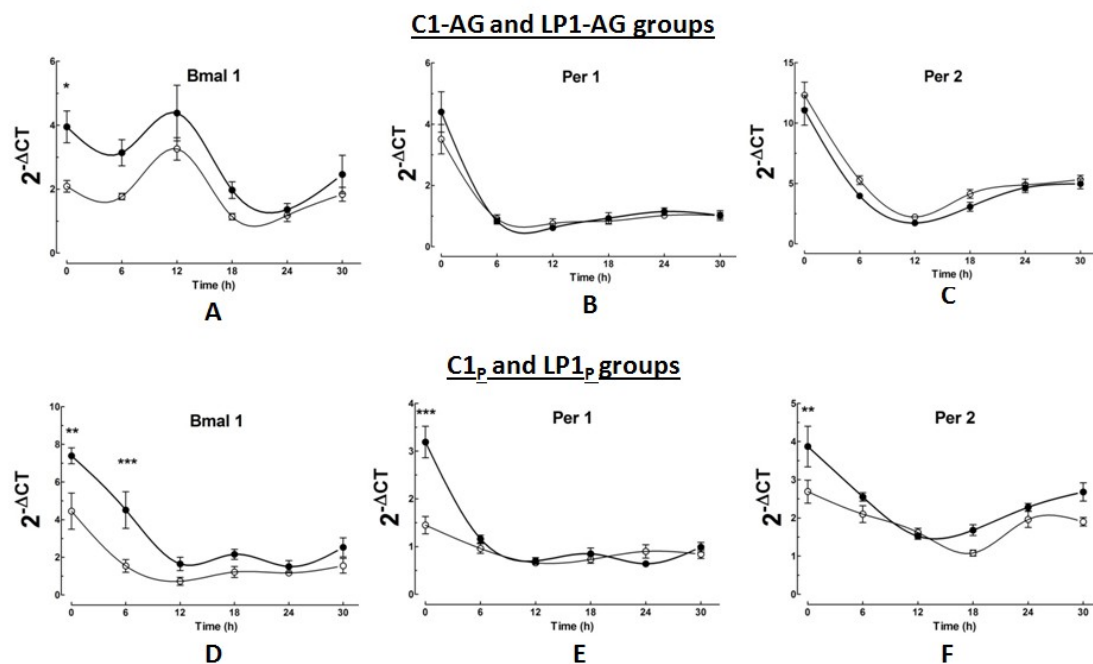
**Figure 7. Re-induction by a serum shock of *bmal1*, *per1* and *per2* in cultured fibroblasts of 35-day old pups and their mother.** Daily expression profile of *bmal 1* (A), *per1* (B) and *per2* (C) genes in fibroblasts culture of control 35-day-old pups (closed circles – C1P group) and their mothers almost at the same temporal point (open circles – C1-AG group). Daily expression profile of *bmal 1* (D), *per1* (E) and *per2* (F) genes in fibroblasts culture of low-protein 35-day-old pups (closed circles – LP1<sub>p</sub> group) and their mothers sampled at Day-65 after fecundation (open circles – LP1-AG group). Values illustrate the relative abundance of each transcript in relation to those of the endogenous b-2-microglobulin amplified within the same sample and under the same experimental conditions. \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001 (two-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test). Each point corresponds to the mean±s.e.m. expression levels of four–six pups born to at least three different dams.



**Figure 8. Re-induction by a serum shock of *bmal1*, *per1* and *per2* in cultured fibroblasts of Low Protein and Control mothers at day 17 of gestation.** Daily expression profile of *bmal 1* (A), *per1* (B) and *per2* (C) transcripts in fibroblasts culture of Low-Protein (open circles – LP1 group) and control (closed circles – C1 group) mothers at Day 17 of gestation. Daily expression profile of *bmal 1* (D), *per1* (E) and *per2* (F) transcripts in fibroblasts culture of low-protein (open circles – LP1<sub>E</sub> group) and control (closed circles – C1<sub>E</sub> group) embryos at Day 17 of gestation. Values illustrate the relative abundance of each transcript in relation to those of the endogenous b-2-microglobulin amplified within the same sample and under the same experimental conditions. \*P<0.05; \*\*\*P<0.001 (two-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test). Each point corresponds to the mean±s.e.m. expression levels of four–six rats.

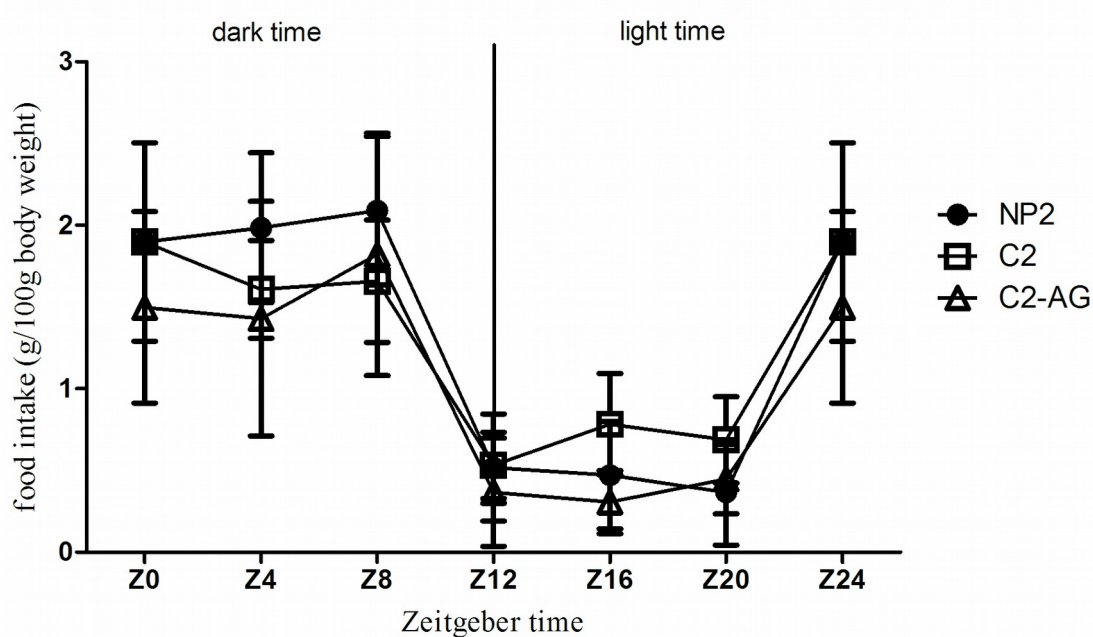


**Figure 9. Re-induction by a serum shock of *bmal1*, *per1* and *per2* in cultured fibroblasts of Low Protein and Control mothers at Day-65 after fecundation and of Low Protein and Control 35-day-old rat pups.** Daily expression profile of *bmal 1* (A), *per1* (B) and *per2* (C) genes in fibroblasts culture of Low Protein (open circles – LP1-AG group) and Control mothers (closed circles – C1-AG group) at Day-65 after fecundation (or 23 days after weaning). Daily expression profile of *bmal 1* (D), *per1* (E) and *per2* (F) genes in fibroblasts culture of Low-Protein 35-day-old pups (open circles – LP1<sub>p</sub> group) and corresponding controls (closed circles – C1<sub>p</sub> group). Values illustrate the relative abundance of each transcript in relation to those of the endogenous b-2-microglobulin amplified within the same sample and under the same experimental conditions. \**p*<0.05; \*\**p*<0.01; \*\*\**p*<0.001 (two-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test). Each point corresponds to the mean±s.e.m. expression levels of four–six rats



## Supplementary figures

**Figure S1. Daily percentages of food intake of dams 23 days post-weaning.** No differences were observed on the dark or light phase of food intake during 3 consecutive days of observations made every 4 hours. Data (g/100 g body weight) are expressed in mean  $\pm$  SE. Two-way RM ANOVA followed by Bonferroni test.; \*NP2 = non-pregnant rats; C2 = control mothers at day 17 of gestation; C2-AG = control mothers after 65 days of the beginning of gestation (23 days after weaning). Dams (n = 10) fed control diet during perinatal period.



## 5.3 Article References

Andrade JP, Pereira PA, Silva SM, Sá SI, Lukoyanov NV. Timed hypocaloric food restriction alters the synthesis and expression of vasopressin and vasoactive intestinal peptide in the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.* 2004 Oct 1;1022(1-2):226-33. PubMed PMID: 15353233.

Augustine RA, Ladyman SR, Grattan DR. From feeding one to feeding many: hormone-induced changes in bodyweight homeostasis during pregnancy. *J Physiol.* 2008 Jan 15;586(2):387-97. Epub 2007 Nov 22. Review. PubMed PMID: 18033810; PubMed Central PMCID: PMC2375600.

Balsalobre A, Damiola F, Schibler U. A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell.* 1998 Jun 12;93(6):929-37. PubMed PMID:

9635423.

Balsalobre A, Marcacci L, Schibler U. Multiple signaling pathways elicit circadian gene expression in cultured Rat-1 fibroblasts. *Curr Biol.* 2000 Oct 19;10(20):1291-4. PubMed PMID: 11069111.

Brown SA, Schibler U. The ins and outs of circadian timekeeping. *Curr Opin Genet Dev.* 1999 Oct;9(5):588-94. Review. PubMed PMID: 10508692.

Brown SA, Fleury-Olela F, Nagoshi E, Hauser C, Juge C, Meier CA, Chicheportiche R, Dayer JM, Albrecht U, Schibler U. The period length of fibroblast circadian gene expression varies widely among human individuals. *PLoS Biol.* 2005 Oct;3(10):e338. Epub 2005 Sep 27. PubMed PMID: 16167846; PubMed Central PMCID: PMC1233413.

Caldelas I, Feillet CA, Dardente H, Eclancher F, Malan A, Gournelen S, Pévet P, Challet E. Timed hypocaloric feeding and melatonin synchronize the suprachiasmatic clockwork in rats, but with opposite timing of behavioral output. *Eur J Neurosci.* 2005 Aug;22(4):921-9. PubMed PMID: 16115215.

Casey TM, Crodian J, Erickson E, Kuropatwinski KK, Gleiberman AS, Antoch MP. Tissue-specific changes in molecular clocks during the transition from pregnancy to lactation in mice. *Biol Reprod.* 2014 Jun;90(6):127. Doi: 10.1095/biolreprod.113.116137. Epub 2014 Apr 23. PubMed PMID: 24759789; PubMed Central PMCID: PMC4094001.

Cermakian N, Sassone-Corsi P. Multilevel regulation of the circadian clock. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000 Oct;1(1):59-67. Review. PubMed PMID: 11413490.

Challet E, Malan A, Pévet P. Daily hypocaloric feeding entrains circadian rhythms of wheel-running and body temperature in rats kept in constant darkness. *Neurosci Lett.* 1996 Jun 14;211(1):1-4. PubMed PMID: 8809833.

Challet E, Jacob N, Vuillez P, Pévet P, Malan A. Fos-like immunoreactivity in the circadian timing system of calorie-restricted rats fed at dawn: daily rhythms and light pulse-induced changes. *Brain Res.* 1997 Oct 3;770(1-2):228-36. PubMed PMID: 9372223.

Damiola F, Le Minh N, Preitner N, Kornmann B, Fleury-Olela F, Schibler U. Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev.* 2000 Dec 1;14(23):2950-61. PubMed PMID: 11114885; PubMed Central PMCID: PMC317100.

Davis, F.C., Reppert, S.M., 2001. Development of mammalian circadian rhythms. In: Takahashi, J.S., Turek, F.W., Moore, R.Y. (Eds.), *Handbook of Behavioral Neurobiology*, vol. Vol 12. Kluwer Academic/Plenum Publishers, *Circadian Clocks*. New York, pp. 247–290

Dibner C, Schibler U, Albrecht U. The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annu Rev Physiol*. 2010;72:517-49. doi: 10.1146/annurev-physiol-021909-135821. Review. PubMed PMID: 20148687.

Dolatshad H, Cary AJ, Davis FC. Differential expression of the circadian clock in maternal and embryonic tissues of mice. *PLoS One*. 2010 Mar 24;5(3):e9855. doi:10.1371/journal.pone.0009855. PubMed PMID: 20352049; PubMed Central PMCID: PMC2844431.

Dunlap JC. Molecular bases for circadian clocks. *Cell*. 1999 Jan 22;96(2):271-90. Review. PubMed PMID: 9988221.

Fleming TP, Watkins AJ, Sun C, Velazquez MA, Smyth NR, Eckert JJ. Do little embryos make big decisions? How maternal dietary protein restriction can permanently change an embryo. *Reprod Fertil Dev*. 2015 Mar 3. doi:10.1071/RD14455. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 25730413.

Guzmán-Quevedo O, Da Silva Aragão R, Pérez García G, Matos RJ, de Sa Braga Oliveira A, Manhães de Castro R, Bolaños-Jiménez F. Impaired hypothalamic mTOR activation in the adult rat offspring born to mothers fed a low-protein diet. *PLoS One*. 2013 Sep 9;8(9):e74990. doi: 10.1371/journal.pone.0074990. eCollection 2013. PubMed PMID: 24040371; PubMed Central PMCID: PMC3767644.

Hales CN, Barker DJ. The thrifty phenotype hypothesis. *Br Med Bull*. 2001;60:5-20. Review. PubMed PMID: 11809615.

Hara R, Wan K, Wakamatsu H, Aida R, Moriya T, Akiyama M, Shibata S. Restricted feeding entrains liver clock without participation of the suprachiasmatic nucleus. *Genes Cells*. 2001 Mar;6(3):269-78. PubMed PMID: 11260270.

Ishida N, Kaneko M, Allada R. Biological clocks. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Aug 3;96(16):8819-20. Review. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000 Aug 1;97(16):9347. PubMed PMID: 10430850; PubMed Central PMCID: PMC33693.

Jud C, Albrecht U. Circadian rhythms in murine pups develop in absence of a functional maternal circadian clock. *J Biol Rhythms*. 2006 Apr;21(2):149-54. PubMed

PMID: 16603679.

Kimura M, Zhang SQ, Inoué S. Pregnancy-associated sleep changes in the rat. *Am J Physiol*. 1996 Oct;271(4 Pt 2):R1063-9. PubMed PMID: 8898001.

Kittrell EM, Satinoff E. Diurnal rhythms of body temperature, drinking and activity over reproductive cycles. *Physiol Behav*. 1988;42(5):477-84. PubMed PMID:3393610.

Kohsaka A, Bass J. A sense of time: how molecular clocks organize metabolism. *Trends Endocrinol Metab*. 2007 Jan-Feb;18(1):4-11. Epub 2006 Nov 30. Review. PubMed PMID: 17140805.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8. PubMed PMID: 11846609.

Marcheva B, Ramsey KM, Buhr ED, Kobayashi Y, Su H, Ko CH, Ivanova G, Omura C, Mo S, Vitaterna MH, Lopez JP, Philipson LH, Bradfield CA, Crosby SD, JeBailey L, Wang X, Takahashi JS, Bass J. Disruption of the clock components CLOCK and BMAL1 leads to hypoinsulinaemia and diabetes. *Nature*. 2010 Jul 29;466(7306):627-31. doi: 10.1038/nature09253. PubMed PMID: 20562852; PubMed Central PMCID:PMC2920067.

Marcheva B, Ramsey KM, Affinati A, Bass J. Clock genes and metabolic disease. *J Appl Physiol* (1985). 2009 Nov;107(5):1638-46. doi:10.1152/jappphysiol.00698.2009. Epub 2009 Aug 6. Review. PubMed PMID: 19661448; PubMed Central PMCID: PMC2777795.

Marcheva B, Ramsey KM, Buhr ED, Kobayashi Y, Su H, Ko CH, Ivanova G, Omura C, Mo S, Vitaterna MH, Lopez JP, Philipson LH, Bradfield CA, Crosby SD, JeBailey L, Wang X, Takahashi JS, Bass J. Disruption of the clock components CLOCK and BMAL1 leads to hypoinsulinaemia and diabetes. *Nature*. 2010 Jul 29;466(7306):627-31. doi: 10.1038/nature09253. PubMed PMID: 20562852; PubMed Central PMCID: PMC2920067.

Mendoza J, Clesse D, Pévet P, Challet E. Food-reward signalling in the suprachiasmatic clock. *J Neurochem*. 2010 Mar;112(6):1489-99. doi:10.1111/j.1471-4159.2010.06570.x. Epub 2010 Jan 7. Erratum in: *J Neurochem*. 2010 Jun;113(5):1365. PubMed PMID: 20067576.

Mendoza J, Pévet P, Challet E. Circadian and photic regulation of clock and clock-controlled proteins in the suprachiasmatic nuclei of calorie-restricted mice. *Eur J*



Neurosci. 2007 Jun;25(12):3691-701. PubMed PMID: 17610588.

Mendoza J, Graff C, Dardente H, Pevet P, Challet E. Feeding cues alter clock gene oscillations and photic responses in the suprachiasmatic nuclei of mice exposed to a light/dark cycle. *J Neurosci*. 2005 Feb 9;25(6):1514-22. PubMed PMID:15703405.

Nascimento E, Guzman-Quevedo O, Delacourt N, da Silva Aragão R, Perez-Garcia G, de Souza SL, Manhães-de-Castro R, Bolaños-Jiménez F, Kaeffer B. Long-lasting effect of perinatal exposure to L-tryptophan on circadian clock of primary cell lines established from male offspring born from mothers fed on dietary protein restriction. *PLoS One*. 2013;8(2):e56231. doi: 10.1371/journal.pone.0056231. Epub 2013 Feb 27. PubMed PMID: 23460795; PubMed Central PMCID: PMC3584092.

Noguchi T, Wang LL, Welsh DK. Fibroblast PER2 circadian rhythmicity depends on cell density. *J Biol Rhythms*. 2013 Jun;28(3):183-92. doi:10.1177/0748730413487494. PubMed PMID: 23735497; PubMed Central PMCID: PMC3760388.

O'Neill JS, Hastings MH. Increased coherence of circadian rhythms in mature fibroblast cultures. *J Biol Rhythms*. 2008 Dec;23(6):483-8. doi:10.1177/0748730408326682. PubMed PMID: 19060257; PubMed Central PMCID:PMC2735814.

Orozco-Sólis R, Lopes de Souza S, Barbosa Matos RJ, Grit I, Le Bloch J, Nguyen P, Manhães de Castro R, Bolaños-Jiménez F. Perinatal undernutrition-induced obesity is independent of the developmental programming of feeding. *Physiol Behav*. 2009 Mar 2;96(3):481-92. doi: 10.1016/j.physbeh.2008.11.016. Epub 2008 Dec 3. PubMed PMID: 19100759.

Orozco-Solís R, Matos RJ, Lopes de Souza S, Grit I, Kaeffer B, Manhães de Castro R, Bolaños-Jiménez F. Perinatal nutrient restriction induces long-lasting alterations in the circadian expression pattern of genes regulating food intake and energy metabolism. *Int J Obes (Lond)*. 2011 Jul;35(7):990-1000. doi:10.1038/ijo.2010.223. Epub 2010 Nov 9. PubMed PMID: 21060311.

Panda S, Hogenesch JB, Kay SA. Circadian rhythms from flies to human. *Nature*. 2002 May 16;417(6886):329-35. Review. PubMed PMID: 12015613.

Schibler U, Ripperger J, Brown SA. Peripheral circadian oscillators in mammals: time and food. *J Biol Rhythms*. 2003 Jun;18(3):250-60. Review. PubMed PMID: 12828282.

Schrader JA, Smale L, Nunez AA. Pregnancy affects FOS rhythms in brain regions regulating sleep/wake state and body temperature in rats. *Brain Res*. 2012 Oct 22;1480:53-60. doi: 10.1016/j.brainres.2012.09.003. Epub 2012 Sep 10. PubMed

PMID: 22975436; PubMed Central PMCID: PMC4124522.

Schrader JA, Walaszczyk EJ, Smale L. Changing patterns of daily rhythmicity across reproductive states in diurnal female Nile grass rats (*Arvicanthis niloticus*). *Physiol Behav.* 2009 Dec 7;98(5):547-56. doi:10.1016/j.physbeh.2009.08.012. Epub 2009 Sep 8. PubMed PMID: 19744504; PubMed Central PMCID: PMC2783347.

Serón-Ferré M, Mendez N, Abarzua-Catalan L, Vilches N, Valenzuela FJ, Reynolds HE, Llanos AJ, Rojas A, Valenzuela GJ, Torres-Farfan C. Circadian rhythms in the fetus. *Mol Cell Endocrinol.* 2012 Feb 5;349(1):68-75. doi:10.1016/j.mce.2011.07.039. Epub 2011 Aug 5. Review. PubMed PMID: 21840372.

Sládek M, Jindráková Z, Bendová Z, Sumová A. Postnatal ontogenesis of the circadian clock within the rat liver. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007 Mar;292(3):R1224-9. Epub 2006 Nov 9. PubMed PMID: 17095653.

Smith MS, Grove KL. Integration of the regulation of reproductive function and energy balance: lactation as a model. *Front Neuroendocrinol.* 2002 Jul;23(3):225-56. Review. PubMed PMID: 12127305.

Stokkan KA, Yamazaki S, Tei H, Sakaki Y, Menaker M. Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science.* 2001 Jan 19;291(5503):490-3. PubMed PMID: 11161204.

Sutton GM, Centanni AV, Butler AA. Protein malnutrition during pregnancy in C57BL/6J mice results in offspring with altered circadian physiology before obesity. *Endocrinology.* 2010 Apr;151(4):1570-80. doi: 10.1210/en.2009-1133. Epub 2010 Feb 16. PubMed PMID: 20160133; PubMed Central PMCID: PMC2850243.

Takahashi JS, Hong HK, Ko CH, McDearmon EL. The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease. *Nat Rev Genet.* 2008 Oct;9(10):764-75. doi: 10.1038/nrg2430. Review. PubMed PMID: 18802415; PubMed Central PMCID: PMC3758473.

Torres-Farfan C, Mendez N, Abarzua-Catalan L, Vilches N, Valenzuela GJ, Seron-Ferre M. A circadian clock entrained by melatonin is ticking in the rat fetal adrenal. *Endocrinology.* 2011 May;152(5):1891-900. doi:10.1210/en.2010-1260. Epub 2011 Mar 1. PubMed PMID: 21363938.

Turek FW, Joshu C, Kohsaka A, Lin E, Ivanova G, McDearmon E, Laposky A, Losee-Olson S, Easton A, Jensen DR, Eckel RH, Takahashi JS, Bass J. Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. *Science.* 2005 May 13;308(5724):1043-5. Epub 2005 Apr 21. PubMed PMID: 15845877; PubMed Central PMCID:

PMC3764501.

Wakamatsu H, Yoshinobu Y, Aida R, Moriya T, Akiyama M, Shibata S. Restricted-feeding-induced anticipatory activity rhythm is associated with a phase-shift of the expression of mPer1 and mPer2 mRNA in the cerebral cortex and hippocampus but not in the suprachiasmatic nucleus of mice. *Eur J Neurosci*. 2001 Mar;13(6):1190-6. PubMed PMID: 11285016.

Williamson DH. Integration of metabolism in tissues of the lactating rat. *FEBS Lett*. 1980 Aug 25;117 Suppl:K93-105. Review. PubMed PMID: 6998730.

Yagita K, Tamanini F, van Der Horst GT, Okamura H. Molecular mechanisms of the biological clock in cultured fibroblasts. *Science*. 2001 Apr 13;292(5515):278-81. PubMed PMID: 11303101.

Yamazaki S, Numano R, Abe M, Hida A, Takahashi R, Ueda M, Block GD, Sakaki Y, Menaker M, Tei H. Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science*. 2000 Apr 28;288(5466):682-5. PubMed PMID: 10784453.

Yamazaki S, Yoshikawa T, Biscoe EW, Numano R, Gallaspy LM, Soulsby S, Papadimas E, Pezuk P, Doyle SE, Tei H, Sakaki Y, Block GD, Menaker M. Ontogeny of circadian organization in the rat. *J Biol Rhythms*. 2009 Feb;24(1):55-63. doi:10.1177/0748730408328438. PubMed PMID: 19150929; PubMed Central PMCID:PMC2665126.

Zylka MJ, Shearman LP, Weaver DR, Reppert SM. Three period homologs in mammals: differential light responses in the suprachiasmatic circadian clock and oscillating transcripts outside of brain. *Neuron*. 1998 Jun;20(6):1103-10. PubMed PMID: 9655499.

## 6 Discussão geral

No nosso estudo, a escolha dos fibroblastos é totalmente justificada pelo fato deles serem células que tem uma independente e auto-sustentável oscilador cuja função continua mesmo durante a divisão celular (*Brown et al., 2005*). Nós mostramos que os fibroblastos da ponta da cauda de ratos podem ser coletados de maneira não-invasiva do mesmo animal e que estas células podem ser utilizadas no estudo das alterações da maquinaria do relógio em relação à dieta dos filhotes de ratos (*Nascimento et al., 2013*). Após a propagação em cultura, os fibroblastos perdem a capacidade de sincronização e as oscilações dos transcritos do

relógio podem ser reinduzidas por um choque sérico aplicado por 1-2 horas (**Balsalobre et al., 1998; 2000**). **O'Neill et al (2008)** propôs que as culturas de fibroblastos maduros serão de grande utilidade para triagem farmacológica e circadiana mutacional de alto rendimento. Recentemente, **Noguchi et al (2013)** utilizou fibroblastos transgênicos para o gene *Per2* a fim de demonstrar que a ritmicidade circadiana na cultura de tecidos depende da densidade celular. Somado a isto, estes autores mostraram que os fibroblastos requerem sinais parácrinos das células adjacentes para expressão normal de ritmicidade, e que estes sinais são específicos dos fibroblastos. O isolamento não-invasivo de fibroblastos permite a avaliação da capacidade de reindução dos transcritos do relógio em células em cultura. A restrição proteica durante o período perinatal parece agir como uma importante pressão seletiva na capacidade de sincronização dos fibroblastos *in vitro*.

Neste estudo, nós primeiramente encontramos que as oscilações rítmicas dos transcritos *bmal1*, *per1* e *per2* em fibroblastos estavam alterados durante a gestação comparativamente àqueles da mesma mãe em um período após a gestação/lactação (23 dias após o desmame). Esta observação sugere fortemente que todos os aspectos da fisiologia dos mamíferos, incluindo a reprodução, são controlados pelo sistema circadiano. Trataria-se de uma adaptação às mudanças diárias do meio ambiente (**Dibner et al., 2010**). Em fêmeas gestantes durante a lactação e gestação, a sobrevivência da prole se torna uma prioridade, e mudanças nos ritmos circadianos comportamentais e fisiológicos durante os estados reprodutivos do ciclo estral, comumente reflete uma resposta a essas demandas. Por exemplo, estudos em animais de laboratório mostraram que a fase do ritmo de temperatura corporal estava avançada e a amplitude diminuída para compensar os aumentos diários mínimos de temperatura durante a gestação (**Kittrell et al., 1988**). Somado a isto, para compensar o aumento necessário do sono no início da gestação, os padrões de sono também estão alterados em roedores (**Kimura et al., 1996; Schrader et al., 2012**).

Inúmeras adaptações fisiológicas e comportamentais ocorrem na mãe de forma que ela possa suprir a demanda nutricional para seus filhotes, incluindo o aumento da capacidade de absorção do intestino e a capacidade metabólica do fígado (**Williamson, 1980**), assim como aumentos no consumo alimentar e mudanças no padrão das refeições (**Smith & Grove, 2002; Augustine et al., 2008**). Nossos dados mostram que a transição da fase final da gestação para um estado tardio após o desmame não está associado com nenhuma modificação no consumo alimentar das mães. Entretanto, nós achamos várias alterações moleculares no relógio

periférico, especialmente na expressão de RNAm de *Bmal1* nos fibroblastos das mães. Este achado é corroborado por estudos que mostram que a transição da fase final da gravidez para lactação é associada à mudanças tanto a nível central (NSQ), como a nível periférico (fígado e glândulas mamárias) do relógio e que estas mudanças ocorrem de uma maneira dependente do tecido que está sendo avaliado. O aumento da expressão de RNAm de *Per2* no NSQ de mães durante a lactação tem apoiado a hipótese que mudanças no principal relógio no NSQ ocorre durante transições dos estados reprodutivos e pode resultar de mudanças coordenadas no metabolismo de órgãos específicos que são necessários para a produção de leite para os filhotes (*Casey et al., 2014*).

Em nosso estudo, a capacidade de reinduzir uma oscilação do RNAm de *bmal1* em cultura de fibroblastos foi fortemente alterada pela transição da gestação para um período após a gestação e lactação (23 dias após o desmame). É bem conhecido que o metabolismo da glicose está relacionada com modificações circadianas na expressão de RNAm de *Bmal1* (*Marcheva et al., 2010*). Isto foi confirmado em nosso estudo quando observamos que as mães durante a fase final da gestação apresentavam um ritmo de glicose sanguínea diferente quando comparadas ao final de 23 dias após a lactação/desmame. Essas alterações se tornaram mais evidentes quando elas foram submetidas a uma restrição protéica durante o desenvolvimento perinatal. Estudos que realizaram coloração de imunofluorescência para confirmar a perda de expressão de *BMAL1* especificamente dentro de ilhotas pancreáticas e não dentro de regiões do cérebro como o núcleo supraquiasmático (NSQ), núcleo arqueado (ARC), no hipotálamo dorsomedial (DMH), e no núcleo paraventricular (PVN), mostraram alterações específicas da ilhota no perfil de expressão gênica, confirmando adicionalmente a especificidade da mutação de *Bmal1* para a ilhota (*Marcheva et al., 2010*). Mais importante, os camundongos *knockout* para *bmal1* em pâncreas deste estudo mostraram atividade circadiana, ritmos de alimentação, o peso e a composição corporal normais, assim como o nosso trabalho. Assim, visto que a expressão de RNAm de *Bmal1* em fibroblastos de ratos durante a gravidez e após a gravidez/lactação tem atividade e ritmos normais de alimentação, bem como o peso corporal normal, os fenótipos metabólicos da glicose que se desenvolvem devem ser devido à quebra de algum mecanismo dentro do relógio periférico, em vez de alterações secundárias da atividade ou do comportamento do animal.

Outro ponto deve ser considerado quando estudamos o sistema circadiano na mãe durante a gestação: a sua capacidade de controlar os relógios circadianos de seus filhos,

especialmente durante o desenvolvimento fetal. Aqui observamos que a capacidade dos fibroblastos da mãe é diferente da prole, sugerindo que a programação nutricional selecionou filhotes com uma nova capacidade de sincronização. Sabemos pouco sobre o sistema circadiano fetal. O que sabemos é que o desenvolvimento de ritmos circadianos é parte do desenvolvimento da prole e prossegue normalmente na ausência de um núcleo supraquiasmático materna funcional do hipotálamo (NSQ). Isto é demonstrado pela iniciação normal dos ritmos circadianos pós-natais em filhotes de ratos de mães com ausência dos ritmos circadianos por lesão do NSQ ou por duplo *knockout* de camundongos  $mPer1^{Brdn} / mPer2^{Brdn} / mPer2^{Brdn}$  ou de camundongos  $mPer2^{Brdn} / mCry1$  (Davis & Reppert, 2001; Jud & Albrecht, 2006). No entanto, ambas as abordagens experimentais demonstram que são necessários sinais maternos para sincronizar estes ritmos pós-natais. Em nosso estudo, não observamos uma sincronização entre os ritmos circadianos de mães e feto, especialmente para o gene *Per1* e que esta dessincronização foi reforçada pela restrição protéica durante o desenvolvimento fetal desses animais para todos os genes estudados.

Além disso, a ontogenia da expressão dos genes do relógio em órgãos periféricos, principalmente em fibroblastos, em fetos e neonatos tem sido extensivamente estudada em roedores. Os investigadores têm abordado a expressão de genes do relógio em fetos inteiros e em órgãos fetais selecionados *in vivo* no relógio de camundongos e fetos de ratos (Dolatshad *et al.*, 2010). Em fetos inteiros de ratos, a expressão dos genes do relógio *Per2*, *Cry1*, *Bmal1* e *Clock* foi detectado a partir do dia 10 de gestação até o 1o dia pós-natal. No entanto, as medições da expressão de *Per2* e *Bmal1* em intervalos de 4 h não apresentaram um padrão de 24 h no feto inteiro aos 10, 14 e 19 dias de idade gestacional. Resultados negativos semelhantes foram encontrados em fígado, rim e coração de fetos nas duas últimas idades (Torres-Farfan *et al.* 2011). Talvez essas divergências entre os estudos possam explicar nossos resultados com os fetos. Nós trabalhamos com caudas de embriões no 17º dia de gestação. Nós pensamos que o sistema circadiano em nosso feto não estava bem expresso nessa idade gestacional para o gene *Bmal1*. Em contraste, as oscilações nos genes *Per1* e *Per2* foram observadas tanto em embriões de controles como em desnutridos. A mesma pergunta foi explorada em outro estudo que trabalhou com fetos de rato no 16º dia de gestação, com a diferença de que os genes do relógio foram quantificados separadamente na cabeça inteira e em todo o corpo. Uma antifase de 24 h de oscilação do gene *Per2* e *Bmal1* foi observada em ambos os compartimentos. No rato, as diferenças no ciclo claro-escuro da expressão de

RNA<sub>m</sub> de Per2 e Bmal1 em antifase estavam presentes no hipocampo fetal e na glândula pineal do feto. Outras estruturas cerebrais não foram testadas. Ao nível do corpo, nenhuma oscilação foi encontrada no fígado fetal de ratos, estando de acordo com achados de outros estudos (*Sladek et al., 2007*). Em contraste, uma forte oscilação em antifase de Per2 e Bmal1 foi encontrada na glândula adrenal de fetos de rato (*Torres-Farfan et al., 2011*). Outros autores detectaram uma expressão pós-natal circadiana da Per1: luc no dia do nascimento na glândula pineal, fígado, tireoide e glândula suprarrenal de ratos (*Yamazaki et al., 2009*). Ao todo, os nossos dados e os dados disponíveis em outros estudos suportam duas conclusões: 1) órgãos fetais são osciladores circadianos maternos periféricos, que podem ser controlados por sinais circadianos maternos na dependência da idade gestacional; 2) há relógios circadianos periféricos funcionais em fetos de roedores fetais em uma idade gestacional em que a oscilação dos genes do relógio do NSQ fetal está ausente.

Na verdade, apesar da sincronização por sinais maternos e pela luz, a atividade do relógio pode ser também modificada pelos horários e pela qualidade do aporte alimentar (*Damiola et al., 2000*; *Mendoza et al., 2007*). Os resultados aqui apresentados demonstram fortes diferenças na expressão do RNA<sub>m</sub> dos genes de relógio entre as mães controles e desnutridas durante e após a gestação/lactação (65 dias após o início da gestação, isto é, 23 dias após o desmame quando a dieta padrão foi retornada), entre embriões controles e desnutridos e, especialmente, entre filhotes controles e desnutridos de 35 dias de idade. Nós fornecemos acesso *ad libitum* à comida. Em consequência, as modificações dos ritmos circadianos, que observamos não foram impostas pelo consumo temporal da comida, mas devido ao baixo teor de proteína da dieta.

Temos de fazer uma menção especial sobre os filhotes de 35 dias de idade. Os efeitos da restrição proteica perinatal no relógio circadiano estavam ainda presentes duas semanas após a dieta de baixa proteína ter sido substituída pela dieta padrão de laboratório. O significado desta observação reside no fato de que a desnutrição perinatal é um importante fator de risco para o desenvolvimento de síndrome metabólica. Estudos epidemiológicos em seres humanos e muitos estudos experimentais em animais mostraram que indivíduos expostos a uma deficiência nutricional durante o desenvolvimento perinatal têm, uma vez que atingem a idade adulta, mais problemas de obesidade, diabetes tipo 2 e doença cardiovascular em comparação com indivíduos da mesma idade exposto a uma equilibrada nutrição durante o seu desenvolvimento intra-uterino e neonatal (*Hales & Barker, 2001*).

Os nossos resultados têm outras implicações interessantes. Observamos que o ritmo de glicose mudou no sangue das mães durante a gestação (G17) sem uma modificação em paralelo de seu consumo alimentar. Essas modificações ocorreram tanto em mães controles como em desnutridas. *Nascimento et al., 2013* mostraram que o ritmo total de glicose no sangue não é circadiano, mas apresenta um período de 16,2h, que corresponde ao valor do nosso estudo – não publicado). Isto significaria que as mudanças de ritmos circadianos de genes estudados em embriões e filhotes desnutridos não são controlados pela mãe, mas pelo baixo teor de proteína da dieta. Um segundo ponto interessante é o fato de que a restrição protéica durante a gestação e lactação alterou permanentemente até a idade estudada a ritmicidade de vários transcritos em fibroblastos, o que constitui forte evidência de que o relógio circadiano foi nutricionalmente programado. Essa proposição é apoiada também por nossos resultados recentes que mostram que a programação do relógio circadiano devido à desnutrição no período crítico do desenvolvimento pode contribuir para as alterações na alimentação e no metabolismo energético, especialmente em órgãos periféricos, o que pode promover o desenvolvimento de desordens metabólicas na vida adulta (*Orozco -Sólis et al., 2010*).

Depois de todas estas análises e pelo fato de que os embriões respondem alterando permanentemente o padrão de seu desenvolvimento para otimizar a utilização de nutrientes maternos durante a gestação (*Fleming et al., 2015*), pensamos que as respostas nas mães observadas nos ritmos de glicose, sem mudanças no seu consumo alimentar significaria que a alteração dos ritmos circadianos de genes estudados em embriões e filhotes desnutridos não são induzidas pela mãe, mas pelo baixo teor de proteína da dieta destas mães. Além disso, as várias alterações observadas em nossos embriões desnutridos durante a gestação (G17) poderia ser para proteger sua vida pós-natal e, provavelmente, para contribuir para uma aptidão competitiva da prole. No entanto, o crescimento resultante, especialmente visto em nossos filhotes alimentados com baixa teor de proteína na dieta, afeta negativamente a saúde em longo prazo, com risco elevado de doença do adulto. Argumentamos que estas respostas perinatais ambientais refletem a plasticidade do desenvolvimento e as "decisões" feitas por embriões para otimizar o seu próprio desenvolvimento, mas com consequências duradouras. Este arranjo após o nascimento permitiria a integração pós-natal dos dispersos relógios circadianos periféricos fetais em um sistema circadiano adulto comandado pelo NSQ e controlado pelo ciclo claro-escuro. Se situações especiais durante a gravidez (composição da



dieta, por exemplo) podem incidir em relógios periféricos fetais específicos, levando a efeitos metabólicos em longo prazo na prole, está apenas começando a ser explorado, especialmente as vias moleculares.

Trabalhos futuros podem integrar a descrição de Brown et al (2005) em fibroblastos humanos que é a favor de um relógio circadiano único por fibroblasto e os nossos resultados, que são claramente a favor de uma capacidade alterada de reindução do relógio circadiano de uma população de fibroblastos dependente da história perinatal do doador. A transcrição de *Per2* tem sido associada com a iniciação do ciclo circadiano. Nossos resultados sugerem claramente que a sobrevivência dos filhotes submetidos à restrição protéica durante a vida perinatal vem com um custo, a forte desregulação da iniciação ciclo circadiano.

## 7 Considerações Finais

Acredita-se que o estilo de vida moderno, por exigir grande capacidade de adaptação física, mental e social dos indivíduos, seja o principal causador dos níveis mais frequentes de estresse, sintomas de ansiedade, tensão, alteração do ritmo do sono e do padrão alimentar. Este agravo da qualidade de vida tem sido relacionado a uma maior incidência de doenças como a obesidade e diabetes.

Estas doenças crônicas em geral, possuem múltiplos fatores causais. Um deles é a desnutrição perinatal, que contribui de maneira importante com problemas na regulação do metabolismo energético associado à obesidade, aumentando a susceptibilidade para desenvolver alterações que promovem prejuízos para o metabolismo, tais como, modificações na tolerância a glicose, na hipertensão arterial e taxa aumentada de triglicérides. Atualmente muitas pesquisas sobre manipulações nutricionais no início da vida e suas repercussões na vida adulta, têm utilizado como principal modelo a desnutrição por redução de proteína da dieta materna (Snoeck, Remacle et al. 1990).

Acredita-se que esta “programação metabólica” devido ao aporte nutricional protéico reduzido ou deficitário perinatal seja causada por alterações no relógio circadiano no período crítico do desenvolvimento (REF). O relógio circadiano influencia o balanço energético, afetando o apetite, a taxa metabólica, os padrões de atividade, sono e as respostas ao estresse. Ele também estaria implicado na homeostase corporal, assim como nas respostas aos desafios ambientais. Atualmente, já há evidências substanciais de estudos experimentais que o ambiente perinatal pode afetar os ritmos circadianos, porém, os mecanismos comportamentais e moleculares que envolvem as mães e suas proles ainda necessitam ser melhor elucidados. Por isso consideramos relevante investigar nesta tese a relação entre a dieta e os ritmos circadianos comportamentais, metabólicos e moleculares em animais gestantes e suas respectivas proles.

Na primeira etapa de experimentos (Experimento 1), hipotetizamos que a desnutrição proteica perinatal em ratos alteraria os ritmos circadianos em fibroblastos dos principais genes do relógio em mães e suas respectivas proles. Além disso, elaboramos a hipótese que haveria

uma indução materna dos ritmos circadianos aos seus respectivos fetos. De fato, observamos fortes diferenças entre as mães/embriões controles e desnutridos. Mais interessante foi perceber que os ritmos dos genes do relógio, principalmente *Bmal1* em todos os ZTs, eram muito diferentes entre o estado durante a gestação e após a lactação tanto em animais controles e desnutridos. Além disso, observamos que a capacidade dos fibroblastos das mães são diferentes da prole, sugerindo que a programação nutricional selecionaria os filhotes com uma nova capacidade de sincronização. Porém, essa capacidade não foi a mesma para alguns genes estudados, sugerindo também que a indução de ritmos maternos aos fetos é dependente da idade gestacional.

Os resultados relacionados às diferenças moleculares entre os ritmos circadianos durante e após a gestação/lactação nos conduziram a investigar se essa diferença de expressão gênica entre esses estados poderia ser causada por ritmos alimentares diferentes durante esses períodos e se o ritmo da glicose também estaria alterado, visto que *Bmal1* é um gene indispensável para o metabolismo da glicose. Portanto, na segunda etapa de experimentos (Experimento 2), hipotetizamos que o ritmo circadiano de ingestão alimentar e de glicemia das mães antes e após a gestação/lactação seriam semelhantes, porém diferentes do ritmo durante a gestação. Efetivamente, o consumo alimentar antes e após o desmame eram semelhantes, porém também o era durante a gestação. Apesar dos ritmos alimentares serem parecidos durante as fases das experiências, o ritmo glicêmico estava fortemente alterado durante a gestação quando comparado ao período pré-conceptual, principalmente nos animais desnutridos. Esse fenótipo metabólico nos leva a crer que ele é causado por uma alteração molecular do relógio periférico e não por uma mudança no comportamento do rato, como inicialmente hipotetizado.

Em suma, nossa tese é claramente a favor de uma capacidade alterada de reindução do relógio circadiano de uma população de fibroblastos dependente da história perinatal do doador. Além disso, as várias alterações observadas em nossos embriões desnutridos durante a gestação pode significar uma tentativa de proteção da sua vida pós-natal. No entanto, o crescimento resultante, especialmente visto em nossos filhotes alimentados com baixa teor de proteína na dieta durante o período perinatal, afeta negativamente a saúde em longo prazo, com risco elevado de doença do adulto. O tipo de dieta durante a gestação e lactação parece

incidir em relógios periféricos fetais específicos, levando a efeitos metabólicos em longo prazo na prole, porém, os mecanismos subjacentes ainda necessitam ser melhor elucidados.

## 7.1 Perspectivas

Nós observamos nesta tese que a redução do percentual proteico na mãe durante a gestação e a amamentação induz modificações moleculares e metabólicas circadianas nas mães e nas suas proles (fetos e filhotes de 35 dias). Nós observamos mais especificamente que os níveis de glicose sanguínea total das mães submetidas à restrição proteica durante a gestação estavam significativamente inferiores àqueles de antes da gestação, sem mostrar, entretanto, alterações no padrão de consumo alimentar durante estes períodos.

Estes resultados nos levam a refletir para diversos caminhos de continuação destes estudos, principalmente para compreensão dos mecanismos moleculares que a desnutrição afeta o metabolismo. Por exemplo, saber as interações entre o complexo Clock/Bmal1 e seus co-reguladores transcricionais PGC 1 $\alpha$  / PRC com os genes que regulam o metabolismo energético, a fim de identificar os marcadores moleculares de risco de desenvolvimento da obesidade e da síndrome metabólica. Além disso, visto o papel chave de Sirt1 e de PGC 1 $\alpha$  nas interações entre o metabolismo energético e o relógio circadiano, nós propomos que as alterações do relógio consecutivas à desnutrição perinatal resultariam da “programação” destes sensores nutricionais. A fim de testar esta hipótese, nós poderíamos avaliar o nível de expressão e de atividade de Sirt1 durante o ciclo circadiano de animais controles *versus* desnutridos.

De fato, ainda há outras questões maiores que envolvem o âmbito da saúde pública para serem respondidas ou ao menos trabalhos podem ser feitos para apresentar contribuições. Talvez o estabelecimento de meios para compensar as alterações induzidas pela programação metabólica precoce.

Em vista destes resultados, questões e idéias, propomos 3 perspectivas a partir deste trabalho:

- Definir a participação da via de sinalização Sirt1/ PGC 1 $\alpha$  na programação nutricional do relógio circadiano;

- Determinar em termos moleculares as interações entre Clock e o co-regulador da transcrição PRC e definir o papel destas interações na regulação do relógio circadiano;
- Propor uma estratégia para compensar as alterações induzidas pela desnutrição perinatal.

## 8 Referências/ Références bibliographiques

Abe, M., E.D. Herzo, et al. (2002). Circadian rhythms in isolated brain regions. *J Neurosci.* 22, 350–356.

Adam, C.L., Kyle, C.E., Young, P. (1994). Influence of prenatal photoperiod on postnatal reproductive development in male red deer (*Cervus elaphus*). *J. Reprod. Fertil* 100, 607–611.

Alberti, K. G. and P. Z. Zimmet (1998). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 15(7): 539-53.

Alberts, P., Johansson, B.G., McArthur, R.A. (2006). Characterization of energy expenditure in rodents by indirect calorimetry. *Curr Protoc Neurosci.* Chapter 9 Unit9 23D.

Anafi R.C., Lee Y., Sato T.K., Venkataraman A., Ramanathan C., et al. (2014). Machine Learning Helps Identify CHRONO as a Circadian Clock Component. *PLoS Biol* 12(4): e1001840.

Andreollo, N. A., E. F. d. Santos, et al. (2012). Idade dos ratos versus idade humana: qual é a relação? *ABCD Arq Bras Cir Dig* 25(1): 49-51.

Anea, C.B., Zhang, M., Stepp, D.W., Simkins, G.B., Reed, G., Fulton, D.J., Rudic, R.D. (2009). Vascular disease in mice with a dysfunctional circadian clock. *Circulation* 119:1510–1517.

[Arendt J.](#) (2005). Melatonin: characteristics, concerns, and prospects. *J Biol Rhythms* 20 (4): 291-303.

Asai, M., Yoshinobu, Y., Kaneko, S., et al. (2001). Circadian profile of *Per* gene mRNA expression in the suprachiasmatic nucleus, paraventricular nucleus, and pineal body of aged rats. *J Neurosci Res* 66, 1133–1139.

Aschoff J. (1965). Circadian Rhythms in Man. *Science.* 148:1427–1432. [PubMed: 14294139]

Aschoff, J., von, G.C., Wildgruber, C., et al. (1986) Meal timing in humans during isolation without time cues. *J Biol Rhythms* 1, 151–162.

Audoin, C. & Guinot, B. (2001). *The Measurement of Time* (Trans. by S. Lyle). Cambridge, UK: Cambridge University Press.

Augustine, R.A., Ladyman, S.R., Grattan, D.R. (2008) From feeding one to feeding many: hormone-induced changes in bodyweight homeostasis during pregnancy. *J Physiol* 586:387–397.

Avogaro, P. and G. Crepaldi (1965). "Essential hyperlipidemia, obesity and diabetes." *Diabetologia* 1(137).

Bado, A., Levasseur, S., Attoub, S., et al. (1998) The stomach is a source of leptin. *Nature* 394, 790–793.

Bahr, I., Muhlbauer, E., Schucht, H., Peschke, E. (2011) Melatonin stimulates glucagon secretion in vitro and in vivo. *J Pineal Res.* 50:336–344. [PubMed: 21244480]

Barclay et. al. (2012) Circadian desynchrony promotes metabolic disruption in a mouse model of shiftwork. *PLoS ONE.* 7:1-11.

Barker, D. J., J. G. Eriksson, et al. (2002). Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis. *Int J Epidemiol* 31(6): 1235-9.

Barker, D. J. and C. Osmond (1986). Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet* 1(8489): 1077-81.

Barker, D. J., C. N. Hales, et al. (1993). Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. *Diabetologia* 36(1): 62-7.

Barker, D. (1998). *Mothers, babies and health in later life.* (2nd Edn).

Barker, D. J., A. R. Bull, et al. (1990). Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life. *BMJ* 301(6746): 259-62.

Barker, D. J., C. Osmond, et al. (1989). Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *BMJ* 298(6673): 564-7.

Barkova EN, Nazarenko EV, Zhdanova EV. Diurnal variations in qualitative composition of breast milk in women with iron deficiency. *Bull Exp Biol Med* 2005; 140:394–396.

Barreto-Medeiros, J.; Queiros-Santos, A.; Cabral-Filho, J. E.; Ferreira, E. S. W. T.; Leandro, C. G.; Deiro, T. C.; Manhaes-De-Castro, R.; Machado Barbosa De-Castro, C. M. (2007) Stress/aggressiveness-induced immune changes are altered in adult rats submitted to neonatal malnutrition. *Neuroimmunomodulation [S.I.]*, v. 14, n. 5, p. 229-334

Barros, K. M.; Manhaes-De-Castro, R.; Lopes-De-Souza, S.; Matos, R. J.; Deiro, T. C.; Cabral-Filho, J. E.; Canon, F. (2006) A regional model (Northeastern Brazil) of induced malnutrition delays ontogeny of reflexes and locomotor activity in rats. *Nutr Neurosci [S.I.]*, v. 9, n. 1-2, p. 99-104, Feb-Apr.

- Bass, J., Takahashi, J.S. (2010) Circadian Integration of Metabolism and Energetics. *Science* 330 (6009): 1349 – 1354
- Bauman, D.E., Currie, W.B. (1980) Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. *J Dairy Sci* 63:1514–1529.
- Bayarri, M. J., Muñoz-Cueto, J. A., López-Olmeda, J. F., Vera, L. M., Rol-de-Lama, M. A., Madrid, J. A. & Sánchez-Vázquez, F. J. (2004). Daily locomotor activity and melatonin rhythms in Senegal sole (*Solea senegalensis*). *Physiology and Behavior* 81: 577–583.
- Bellinger, L., C. Lilley, et al. (2004). Prenatal exposure to a maternal low-protein diet programmes a preference for high-fat foods in the young adult rat. *Br J Nutr* 92(3): 513-20.
- Bellinger, L. and S. C. Langley-Evans (2005). Fetal programming of appetite by exposure to a maternal low-protein diet in the rat. *Clin Sci (Lond)*. 109(4): 413-20.
- Bellinger, L., C. Lilley, et al. (2004). Prenatal exposure to a maternal low-protein diet programmes a preference for high-fat foods in the young adult rat. *Br J Nutr* 92(3): 513-20.
- Berson, D.M., Dunn, F.A., Takao, M. (2002). Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science* 295:1070–1073.
- Bertram, C. E. and M. A. Hanson (2001). Animal models and programming of the metabolic syndrome. *Br Med Bull* 60: 103-21.
- Bünning, E. (1964). *The Physiological Clock: Endogenous Diurnal Rhythms and Biological Chronometry*. New York: Academic Press.
- Boden, G., Chen, X., Polansky, M. (1999) *Diabetes* 48, 2182.
- Bolli, G.B., De Feo, P., De Cosmo, S., Perriello, G., Ventura, M.M., Calcinaro, F., Lolli, C., Campbell, P., Brunetti, P., Gerich, J.E. (1984) Demonstration of a dawn phenomenon in normal human volunteers. *Diabetes*. 33:1150–1153.
- Borengasser, S.J., Kang, P., Faske, J., Gomez-Acevedo, H., Blackburn, M.L., et al. (2014) High Fat Diet and *In Utero* Exposure to Maternal Obesity Disrupts Circadian Rhythm and Leads to Metabolic Programming of Liver in Rat Offspring. *PLoS ONE* 9(1): e84209.
- Boulamery-Velly, A., Simon, N., Vidal, J., et al. (2005) Effects of three-hour restricted food access during the light period on circadian rhythms of temperature, locomotor activity, and heart rate in rats. *Chronobiol Int* 22, 489–498.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise de Situação em Saúde. *Saúde Brasil: uma análise da situação de saúde no Brasil*. Brasília; 2006



Breier, B. H., S. O. Krechowec, et al. (2004). Maternal nutrition in pregnancy and adiposity in offspring. In *Fetal Nutrition and Adult Disease: Programming of Chronic Disease through Fetal Exposure to Undernutrition* (Langley-Evans, S. C., ed.).

Brown, S.A., Zimbrunn, G., Fleury-Olela, F., et al. (2002) Rhythms of mammalian body temperature can sustain peripheral circadian clocks. *Curr Biol* 12, 1574–1583.

Buxton, O.M., Lee, C.W., L’Hermite-Baleriaux, M., et al. (2003) Exercise elicits phase shifts and acute alterations of melatonin that vary with circadian phase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284, R714–R724.

Buijs, R.M., La Fleur, S.E., Wortel, J., et al. (2003) The suprachiasmatic nucleus balances sympathetic and parasympathetic output to peripheral organs through separate preautonomic neurons. *J Comp Neurol* 464, 36–48.

Cagampang, F.R., Bruce, K.D. (2012) The role of the circadian clock system in nutrition and metabolism. *British Journal of Nutrition* 108, 381–392

Cailotto, C., La Fleur, S.E., van, H.C., et al. (2005) The suprachiasmatic nucleus controls the daily variation of plasma glucose via the autonomic output to the liver: are the clock genes involved? *Eur J Neurosci* 22, 2531–2540

Calvo, J.A., Daniels, T.G., Wang, X., Paul, A., Lin, J., Spiegelman, B.M., Stevenson, S.C., Rangwala, S.M. (2008) Muscle-specific expression of PPAR $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  improves exercise performance and increases peak oxygen uptake. *Journal of Applied Physiology* 104:1304–1312.

Carvas, J.M., Vukolic, A., Yepuri, G., Xiong, Y., Popp, K., Schmutz, I., Chappuis, S., Albrecht, U., Ming, X.F., Montani, J.P., et al. (2012) *Period2* gene mutant mice show compromised insulin-mediated endothelial nitric oxide release and altered glucose homeostasis. *Front Physio* 13:337

Casey, T.M., Plaut, K. (2012) Lactation Biology Symposium: circadian clocks as mediators of the homeorhetic response to lactation. *J Anim Sci* 90: 744–754.

Casey, T., Zakrzewska, E., Maple, R., Lintault, L., Wade, C., Baer, L., Ronca, A., Plaut, K. (2012) Hypergravity disruption of homeorhetic adaptations to lactation in rat dams include changes in circadian clocks. *Biol Open* 1:570–581.

Casey, T., Patel, O., Dykema, K., Dover, H., Furge, K., Plaut, K. (2009) Molecular signatures reveal the homeorhetic response to lactation may be orchestrated by circadian clocks *PLoS One* 4:e7395.

Casey, T.M., Crodian, J., Erickson, E., Kuropatwinski, K.K., Gleiberman, A.S., Antoch, M.P. (2014). Tissue-specific changes in molecular clocks during the transition from pregnancy to lactation in mice. *BOR Papers in Press*.

- Challet, N. Jacob, P. Vuillez, P. Pévet, A. Malan, (1997). Fos-like immunoreactivity in the circadian timing system of calorie-restricted rats fed at dawn: daily rhythms and light pulse-induced changes. *Brain Research* 770, 228
- Chen, H.Y., Trumbauer, M.E., Chen, A.S., et al. (2004) Orexigenic action of peripheral ghrelin is mediated by neuropeptide Y and agouti-related protein. *Endocrinology* 145, 2607–2612.
- Cherala, G., B. H. Shapiro, et al. (2006). Two low protein diets differentially affect food consumption and reproductive performance in pregnant and lactating rats and long-term growth in their offspring. *J Nutr* 136(11): 2827-33.
- Cinti, S., Matteis, R.D., Pico, C., et al. (2000) Secretory granules of endocrine and chief cells of human stomach mucosa contain leptin. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24, 789–793.
- Cinti, S., De, M.R., Ceresi, E., et al. (2001) Leptin in the human stomach. *Gut* 49, 155.
- Cleeman, J. I. (2001). Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *Journal of the American Medical Association* 285(19): 2486-97.
- Coomans, C.P., van den Berg, S.A., Lucassen, E.A., Houben, T., Pronk, A.C., van der Spek, R.D., Kalsbeek, A., Biermasz, N.R., Willems van Dijk, K., Romijn, J.A., et al. (2013) The suprachiasmatic nucleus controls circadian energy metabolism and hepatic insulin sensitivity. *Diabetes*. 62:1102–1108.
- Comperatore, C.A. & Stephan, F.K. (1987) Entrainment of duodenal activity to periodic feeding. *J Biol Rhythms* 2, 227–242.
- Cox, L. A., M. J. Nijland, et al. (2006). "Effect of 30 per cent maternal nutrient restriction from 0.16 to 0.5 gestation on fetal baboon kidney gene expression." *J Physiol* 572(Pt 1): 67-85.
- Cowley, M.A., Smith, R.G., Diano, S., et al. (2003) The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* 37, 649–661
- Cripps, R. L., M. S. Martin-Gronert, et al. (2009). "Programming of hypothalamic neuropeptide gene expression in rats by maternal dietary protein content during pregnancy and lactation." *Clin Sci (Lond)* 117(2): 85-93.
- Cubero, J., Valero, V., Sanchez, J., Rivero, M., Parvez, H., et al. (2005) The circadian rhythm of tryptophan in breast milk affects the rhythms of 6-sulfatoxymelatonin and sleep in newborn. *Neuroendocrinol Lett* 26(6): 657–661.

Cummings, D.E., Purnell, J.Q., Frayo, R.S., et al. (2001) A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 50, 1714–1719.

Dahl, G.E. (2008) Effects of short day photoperiod on prolactin signaling in dry cows: a common mechanism among tissues and environments? *J Anim Sci* 86:10–14.

Dahl, G.E., Buchanan, B.A., Tucker, H.A. (2000) Photoperiodic effects on dairy cattle: a review. *J Dairy Sci* 83:885–893.

Dahri, S., A. Snoeck, et al. (1991). "Islet function in offspring of mothers on low-protein diet during gestation." *Diabetes* 40 Suppl 2: 115-20.

Damiola, F., et al. (2000) Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes & Development* 14, 2950-1961

Davis, F.C., Reppert, S.M. (2001). Development of mammalian circadian rhythms. In: Takahashi, J.S., Turek, F.W., Moore, R.Y. (Eds.), *Handbook of Behavioral Neurobiology*, vol. Vol 12. Kluwer Academic/Plenum Publishers, *Circadian Clocks*. New York, pp. 247–290

Davidson, A.J., Castanon-Cervantes, O. & Stephan, F.K. (2004) Daily oscillations in liver function: diurnal vs circadian rhythmicity. *Liver Int* 24, 179–186

de Castro, J.M. (2004) The time of day of food intake influences overall intake in humans. *J Nutr*. 134(1):104-11.

Dekens, M.P., Santoriello, C., Vallone, D., Grassi, G., Whitmore, D., Foulkes, N.S. (2003). Light regulates the cell cycle in zebrafish. *Curr Biol* 13:2051–2057

Desai, M., N. J. Crowther, et al. (1996). "Organ-selective growth in the offspring of protein-restricted mothers." *Br J Nutr* 76(4): 591-603.

Dibner, C., Schibler, U. & Albrecht, U. (2010) The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annu Rev Physiol* 72, 517–549.

Dobbing, J. (1965). "The effect of undernutrition on myelination in the central nervous system." *Biol Neonat* 9(1): 132-47.

Doi, M., Hirayama, J., Sassone-Corsi, P. (2006). Circadian regulator CLOCK is a histone acetyltransferase. *Cell*. 2006 May 5;125(3):497-508

Doi, R., Oishi, K., Ishida, N. (2010) CLOCK regulates circadian rhythms of hepatic glycogen synthesis through transcriptional activation of Gys2. *J Biol Chem* 285:22114–22121.

Dolatshad, H., Campbell, E.A., O'Hara, L., Maywood, E.S., Hastings, M.H., Johnson, M.H. (2006) Developmental and reproductive performance in circadian mutant mice. *Hum Reprod* 21:68–79.

Dominguez-Salas, P., Moore, S.E., Baker, M.S., Bergen, A.W., Cox, S.E., Dyer, R.A., Fulford, A.J., Guan, Y., Laritsky, E., Silver, M.J., Swan, G.E., Zeisel, S.H., Innis, S.M., Waterland, R.A., Prentice, A.M. & Hennig, B.J. (2014). Maternal nutrition at conception modulates DNA methylation of human metastable epialleles. *Nature Communications* 5: 3746

Dos Santos, M.L., Aragon, F.F., Padovani, C.R., et al. (2006) Daytime variations in glucose tolerance in people with impaired glucose tolerance. *Diabetes Res Clin Pract* 74, 257–262.

Drake, A., D. Livingstone, et al. (2005). Reduced adipose glucocorticoid reactivation and increased hepatic glucocorticoid clearance as an early adaptation to high-fat feeding in Wistar rats. *Endocrinology*. 46(2): 913-9.

Du, F., D. A. Higginbotham, et al. (1999). Food intake, energy balance and serum leptin concentrations in rats fed low-protein diets. *J Nutr* 130(3): 514-21.

Durgan, D., Pulinilkunnil, T., Villegas-Montoya, C., Garvey, M., Frangogiannis, N., Michael, L., Chow, C., Dyck, J., Young, M. (2010) Short communication: ischemia/reperfusion tolerance is time-of-daydependent: mediation by the cardiomyocyte circadian clock. *Circ Res*. 106:546–550.

Durgan, D.J., Pat, B.M., Laczy, B., Bradley, J.A., Tsai, J.Y., Grenett, M.H., Ratcliffe, W.F., Brewer, R.A., Nagendran, J., Villegas-Montoya, C., et al. (2011) O-GlcNAcylation, novel post-translational modification linking myocardial metabolism and cardiomyocyte circadian clock. *J Biol Chem* 286:44606–44619.

Dyar, K.A., Ciciliot, S., Wright, L.E., Bienso, R.S., Tagliazucchi, G.M., Patel, V.R., Forcato, M., Paz, M.I., Gudiksen, A., Solagna, F., et al. (2014) Muscle insulin sensitivity and glucose metabolism are controlled by the intrinsic muscle clock. *Mol Metab* 3:29–41.

Ebling, F.J., Wood, R.I., Suttie, J.M., Adel, T.E., Foster, D.L. (1989). Prenatal photoperiod influences neonatal prolactin secretion in the sheep. *Endocrinology* 125, 384– 391.

Einhorn, D., G. M. Reaven, et al. (2003). American College of Endocrinology position statement on the insulin resistance syndrome. *Endocr Pract* 9(3): 237-52.

Engel, L., Lorenzkowski, V., Langer, C., et al. (2005) The photoperiod entrains the molecular clock of the rat pineal. *Eur J Neurosci* 21, 2297–2304.

Escobar, C., Cailotto, C., Angeles-Castellanos, M., et al. (2009) Peripheral oscillators: the driving force for food-anticipatory activity. *Eur J Neurosci* 30, 1665–1675.

Feillet, C.A., Mendoza, J., Albrecht, U., et al. (2008) Forebrain oscillators ticking with different clock hands. *Mol Cell Neurosci* 37, 209–221.

FID (Fédération Internationale du Diabète), Atlas du diabète, troisième édition, 2006

Floris, I., Billard, H., Boquien, C.Y., Gauvard, E., Drouard, A., Gournay, V., Rozé, J.C., Kaeffer, B. (2014). Early nutrition: first transcriptomic analysis of exfoliated cells and extracellular vesicles from breast milk with corresponding gastric fluid aspirate of preterm infant. UKAMB Milk Bank Conference ; Oct 2-3, London.

Fonken, L.K., Workman, J.L., Walton, J.C., et al. (2010) Light at night increases body mass by shifting the time of food intake. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 18664–18669.

Ford, E. S., W. H. Giles, et al. (2002). "Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey." *JAMA* 287(3): 356-9.

Foster, R. G. & Kreitzman, L. (2004). *Rhythms of Life: The Biological Clocks that Control the Daily Lives of Every Living Thing*. London: Profile.

Freeman, M.E., Kanyicska, B., Lerant, A., Nagy, G. (2000) Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev* 80:1523–1631.

FROY, O. (2010) Metabolism and circadian rhythms- implications for obesity. *Endocrine Reviews*. 31:1-24

Fukagawa, K. et al. (1992), *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 263, R1169

Fuller, P.M., Lu, J. & Saper. C.B. (2008) Differential rescue of light- and food-entrainable circadian rhythms. *Science* 320, 1074–1077.

Funahashi, H., Takenoya, F., Guan, J.L., et al. (2003) Hypothalamic neuronal networks and feeding-related peptides involved in the regulation of feeding. *Anat Sci Int* 78, 123–138.

Gagliardino, J.J., Pessacq, M.T., Hernandez, R.E., Rebolledo, O.R. (1978) Circadian variations in serum glucagon and hepatic glycogen and cyclic amp concentrations. *J Endocrinol*. 78:297–298.

Gilbert, S.F. (2003). *Developmental biology*. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc.

Gluckman, P. D., K. A. Lillycrop, et al. (2007). Metabolic plasticity during mammalian development is directionally dependent on early nutritional status. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(31): 12796-800.

Gluckman, P. D., M. A. Hanson, et al. (2005). Environmental influences during development and their later consequences for health and disease: implications for the interpretation of empirical studies. *Proc Biol Sci* 272(1564): 671-7.

Gluckman, P. D. and M. A. Hanson (2004). Developmental origins of disease paradigm: a mechanistic and evolutionary perspective. *Pediatr Res* 56(3): 311-7.

Gluckman, P. D., M. A. Hanson, et al. (2005). Predictive adaptive responses and human evolution. *Trends Ecol Evol* 20(10): 527-33.

Gluckman, P. D., M. A. Hanson, et al. (2005). Environmental influences during development and their later consequences for health and disease: implications for the interpretation of empirical studies. *Proc Biol Sci* 272(1564): 671-7.

Gluckman, P. D. and M. A. Hanson (2004a). The developmental origins of the metabolic syndrome. *Trends Endocrinol Metab* 15(4): 183-7.

Gooley, J.J., Schomer, A. & Saper, C.B. (2006) The dorsomedial hypothalamic nucleus is critical for the expression of foodentrainable circadian rhythms. *Nat Neurosci* 9, 398–407.

Goriki, A., Hatanaka, F., Myung, J., Kim, J.K., Yoritaka, T., et al. (2014) A Novel Protein, CHRONO, Functions as a Core Component of the Mammalian Circadian Clock. *PLoS Biol* 12(4): e1001839. doi:10.1371/journal.pbio.1001839

Gorman, M.R., Goldman, B.D., Zucker, I. (2001) Mammalian photoperiodism. In: Takahashi, J.S., Turek, F.W., Moore, R.Y. (Eds.), *Handbook of Behavioral Neurobiology*, vol. 12. Kluwer Academic/Plenum Publishers, *Circadian Clocks*. New York, pp. 481–528

Gothilf, Y., Coon, S.L., Toyama, R., Chitnis, A., Namboodiri, M.A., Klein, D.C. (1999). Zebrafish serotonin N-acetyltransferase-2: marker for development of pineal photoreceptors and circadian clock function. *Endocrinology* 140:4895–4903.

Greenberg, A. S. and M. S. Obin (2006). Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism. *Am J Clin Nutr* 83(2): 461S-465S.

Grace, C. J., I. Swenne, et al. (1990). Protein-energy malnutrition induces changes in insulin sensitivity. *Diabete Metab* 16(6): 484-91.

Grandin, L.D., Alloy, L.B., Abramson, L.Y. (2006) The social zeitgeber theory, circadian rhythms, and mood disorders: review and evaluation. *Clin Psychol Rev*. Oct;26(6):679-94.

Grimaldi, B., Bellet, M.M., Katada, S., Astarita, G., Hirayama, J., Amin, R.H., Granneman, J.G., Piomelli, D., Leff, T., Sassone-Corsi, P. (2010). PER2 controls lipid metabolism by direct regulation of PPAR $\gamma$ . *Cell Metab*. Nov 3;12(5):509-20

Grundy, S. M., H. B. Brewer, Jr., et al. (2004). Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation* 109(3): 433-8.

Guilding, C., Hughes, A.T., Brown, T.M., et al. (2009) A riot of rhythms: neuronal and glial circadian oscillators in the mediobasal hypothalamus. *Mol Brain* 2, 28.

Guilleminault, C; Tilkian, A; Dement, WC (1976). The sleep apnea syndromes. *Annual Review of Medicine* 27: 465–484.

GUIMARÃES, L. H. C. T. et al. (2008) Physically active elderly women sleep more and better than sedentary women. *Sleep Medicine, Netherland*, v. 9, n. 5, p. 488-493

Guo, H., Brewer, J.M., Lehman, M.N., et al. (2006) Suprachiasmatic regulation of circadian rhythms of gene expression in hamster peripheral organs: effects of transplanting the pacemaker. *J Neurosci* 26, 6406–6412

Gupta, R., P. C. Deedwania, et al. (2004). Prevalence of metabolic syndrome in an Indian urban population. *Int J Cardiol* 97(2): 257-61.

Haffner, S. M., R. A. Valdez, et al. (1992). Prospective analysis of the insulin-resistance syndrome (syndrome X). *Diabetes* 41(6): 715-22.

Hagemann, D., Meier, J.J., Gallwitz, B., et al. (2003) Appetite regulation by ghrelin – a novel neuro-endocrine gastric peptide hormone in the gut-brain-axis. *Z Gastroenterol* 41, 929–936.

Hales, C. N. and D. J. Barker (1992). Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* 35(7): 595-601.

Hales, C. N. and D. J. Barker (2001). The thrifty phenotype hypothesis. *Br Med Bull* 60: 5-20.

Hales, C. N., D. J. Barker, et al. (1991). Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *BMJ* 303(6809): 1019-22.

Hales, C. N. and D. J. Barker (1992). Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* 35(7): 595-601.

Hall, B. (1979) Uniformity of human milk. *Am J Clin Nutr* 32:304–312.

Han, J. C., D. A. Lawlor, et al. (2010). Childhood obesity." *Lancet* 375(9727): 1737-48.

Farooqi, S. and S. O'Rahilly (2006). Genetics of obesity in humans." *Endocr Rev* 27(7): 710-18.

Handler, A.M., Konopka, R.J. (1979). Transplantation of a circadian pacemaker in *Drosophila*. *Nature* 279:236–238.

Hassan, J., Busto, M., Iyengar, B., Campos, A.R. (2000). Behavioral characterization and genetic analysis of the *Drosophila melanogaster* larval response to light as revealed by a novel individual assay. *Behav Genet* 30:59–69.

- Hattar, S., Liao, H.W., Takao, M., Berson, D.M., Yau, K.W. (2002). Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science* 295:1065–1070
- Hawkins, P., C. Steyn, et al. (2000). Cardiovascular and hypothalamic-pituitary-adrenal axis development in late gestation fetal sheep and young lambs following modest maternal nutrient restriction in early gestation. *Reprod Fertil Dev* 12(7-8): 443-56.
- Helfrich-Forster, C., Winter, C., Hofbauer, A., Hall, J.C., Stanewsky, R. (2001). The circadian clock of fruit flies is blind after elimination of all known photoreceptors. *Neuron* 30:249–261.
- Heywood, R. (1987). The use of animals in testing. *ATLA* 14(4): 329-33.
- Hirota, T. & Fukada, Y. (2004) Resetting mechanism of central and peripheral circadian clocks in mammals. *Zoolog Sci* 21, 359–368.
- Hofman, P. L., F. Regan, et al. (2004). Premature birth and later insulin resistance. *N Engl J Med* 351(21): 2179-86.
- Hoogerwerf, W.A., Hellmich, H.L., Cornelissen, G., et al. (2007) Clock gene expression in the murine gastrointestinal tract: endogenous rhythmicity and effects of a feeding regimen. *Gastroenterology* 133, 1250–1260.
- Hoogerwerf, W.A. (2009) Role of biological rhythms in gastrointestinal health and disease. *Rev Endocr Metab Disord* 10, 293–300.
- Hsieh, M.C., Yang, S.C., Tseng, H.L., et al. (2010) Abnormal expressions of circadian-clock and circadian clock-controlled genes in the livers and kidneys of long-term, high-fat-diet-treated mice. *Int J Obes (Lond)* 34, 227–239.
- Hsu, C.T., Patton, D.F., Mistlberger, R.E., et al. (2010) Palatable meal anticipation in mice. *PLoS One* 5, e12903.
- Hurd, M.W., Cahill, G.M. (2002). Entraining signals initiate behavioral circadian rhythmicity in larval zebrafish. *J Biol Rhythms* 17:307–314.
- IDF, I. D. F. (2006). The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome. International Diabetes Federation.
- Ishikawa, K., Shimazu, T. (1976) Daily rhythms of glycogen synthetase and phosphorylase activities in rat liver: influence of food and light. *Life Sci.* 19:1873–1878.
- Ishikawa, K., Shimazu, T. (1980) Circadian rhythm of liver glycogen metabolism in rats: effects of hypothalamic lesions. *Am J Physiol.* 238:E21–E25
- Jespersen, J. & Fitz-Randolph, J. (1999). *From Sundials to Atomic Clocks: Understanding Time and Frequency*, 2nd Edition. Mineola, NY: Dover.



- Jessop, T. S., Limpus, C. J. & Whittier, J. M. (2002). Nocturnal activity in the green sea turtle alters daily profiles of melatonin and corticosterone. *Hormones and Behavior* 41: 357–365.
- Johnson, M.S., Thomson, S.C., Speakman, J.R. (2001) Limits to sustained energy intake, I: lactation in the laboratory mouse *Mus musculus*. *J Exp Biol* 204:1925–1935
- Jud, C., Albrecht, U. (2006). Circadian rhythms in murine pups develop in absence of a functional maternal circadian clock. *J. Biol. Rhythms*. 21, 149–154.
- Kaeffer, B., Legrand, A., Moyon, T., Frondas-Chauty, A., Billard, H., et al. (2011) Non-invasive exploration of neonatal gastric epithelium by using exfoliated epithelial cells. *PLoS One*. 6(10): e25562.
- Kalra, S.P., Bagnasco, M., Otukonyong, E.E., et al. (2003) Rhythmic, reciprocal ghrelin and leptin signaling: new insight in the development of obesity. *Regul Pept* 111, 1–11.
- Kalsbeek, A., Fliers, E., Hofman, M.A., et al. (2010) Vasopressin and the output of the hypothalamic biological clock. *J Neuroendocrinol* 22, 362–372.
- Kalsbeek, A., Foppen, E., Schalijs, I., et al. (2008) Circadian control of the daily plasma glucose rhythm: an interplay of GABA and glutamate. *PLoS One* 3, e3194.
- Kalsbeek, A., Buijs, R.M., van Heerikhuize, J.J., et al. (1992) Vasopressin-containing neurons of the suprachiasmatic nuclei inhibit corticosterone release. *Brain Res* 580, 62–67.
- Kalsbeek, A. & Buijs, R.M. (1992) Peptidergic transmitters of the suprachiasmatic nuclei and the control of circadian rhythmicity. *Prog Brain Res* 92, 321–333.
- Kalsbeek, A., Ruiters, M., La Fleur, S.E., et al. (2006) The hypothalamic clock and its control of glucose homeostasis. *Prog Brain Res* 153, 283–307.
- Kalsbeek, A., Strubbe, J.H. (1998) Circadian control of insulin secretion is independent of the temporal distribution of feeding. *Physiol Behav*. 63:553–558.
- Kalsbeek, A., Fliers, E., Romijn, J.A., et al. (2001) The suprachiasmatic nucleus generates the diurnal changes in plasma leptin levels. *Endocrinology* 142, 2677–2685
- Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M. (2000). *Principles of neuroscience*. New York: McGraw-Hill.
- Karlsson, B., Knutsson, A., Lindahl, B. (2001) Is there an association between shift work and having a metabolic syndrome? Results from a population based study of 27,485 people. *Occupation and Environment Medicine* 58:747-752
- Kaur, J. (2014). A comprehensive review on metabolic syndrome. *Cardiology Research and Practice*: 21.

- Kazimi, N., Cahill, G.M. (1999). Development of a circadian melatonin rhythm in embryonic zebrafish. *Brain Res Dev Brain Res* 117:47–52.
- Kelly, P.A., Bachelot, A., Kedzia, C., Hennighausen, L., Ormandy, C.J., Kopchick, J.J., Binart, N. (2002) The role of prolactin and growth hormone in mammary gland development. *Mol Cell Endocrinol* 197:127–131.
- Kida, K., Nishio, T., Yokozawa, T., Nagai, K., Matsuda, H., Nakagawa, H. (1980) The circadian change of gluconeogenesis in the liver in vivo in fed rats. *J Biochem.* 1980; 88:1009–1013.
- Kittrell, E.M., Satinoff, E. (1988). Diurnal rhythms of body temperature, drinking and activity over reproductive cycles. *Physiol. Behav.* 42, 477–484.
- Klarsfeld, A., Malpel, S., Michard-Vanhee, C., Picot, M., Chelot, E., Rouyer, F. (2004). Novel features of cryptochrome-mediated photoreception in the brain circadian clock of *Drosophila*. *J Neurosci* 24:1468–1477.
- Kleitman, N. (1963). *Sleep and Wakefulness*. Chicago:University of Chicago Press.
- KNUTSSON, A. (2003) Health disorders of shift workers. *Occupational Medicine.* 53:103-108
- Knutsson, A. & Boggild, H. (2010) Gastrointestinal disorders among shift workers. *Scand J Work Environ Health* 36, 85–95.
- Kobayashi, H., Oishi, K., Hanai, S., et al. (2004) Effect of feeding on peripheral circadian rhythms and behaviour in mammals. *Genes Cells* 9, 857–864.
- Kohsaka, A., Laposky, A.D., Ramsey, K.M., et al. (2007) High-fat diet disrupts behavioral and molecular circadian rhythms in mice. *Cell Metab* 6, 414–421.
- Kojima, M. & Kangawa, K. (2002) Ghrelin, an orexigenic signaling molecule from the gastrointestinal tract. *Curr Opin Pharmacol* 2, 665–668.
- Konturek, P.C., Brzozowski, T. & Konturek, S.J. (2011) Gut clock: implication of circadian rhythms in the gastrointestinal tract. *J Physiol Pharmacol* 62, 139–150.
- Kornmann, B., Schaad, O., Bujard, H., et al. (2007) Systemdriven and oscillator-dependent circadian transcription in mice with a conditionally active liver clock. *PLoS Biol* 5, e34.
- Kraves, S. & Weitz, C.J. (2006) A role for cardiotrophin-like cytokine in the circadian control of mammalian locomotor activity. *Nat Neurosci* 9, 212–219
- Kreier, F., Kalsbeek, A., Ruiters, M., et al. (2003) Central nervous determination of food storage – a daily switch from conservation to expenditure: implications for the metabolic syndrome. *Eur J Pharmacol* 480, 51–65.

- Kreier, F., Fliers, E., Voshol, P.J., et al. (2002) Selective parasympathetic innervation of subcutaneous and intra-abdominal fat – functional implications. *J Clin Invest* 110, 1243–1250.
- Kriegsfeld, L.J., Korets, R. & Silver, R. (2003) Expression of the circadian clock gene *Period 1* in neuroendocrine cells: an investigation using mice with a *Per1::GFP* transgene. *Eur J Neurosci* 17, 212–220.
- Krishnan, B., Levine, J.D., Lynch, M.K., Dowse, H.B., Funes, P., Hall JC, Hardin PE, Dryer SE. 2001. A new role for cryptochrome in a *Drosophila* circadian oscillator. *Nature* 411:313–317.
- Kudo, T., Akiyama, M., Kuriyama, K., et al (2004) Night-time restricted feeding normalises clock genes and *Pai-1* gene expression in the db/db mouse liver. *Diabetologia* 47:1425–1436
- Kuriyama, K., Sasahara, K., Kudo, T., Shibata, S. (2004) Daily injection of insulin attenuated impairment of liver circadian clock oscillation in the streptozotocin-treated diabetic mouse. *FEBS Lett* 572:206–210
- Kwong, W. Y., A. E. Wild, et al. (2000). Maternal undernutrition during the preimplantation period of rat development causes blastocyst abnormalities and programming of postnatal hypertension. *Development* 127(19): 4195-202.
- Kylin, E. (1923). Studien ueber das Hypertonie-Hyperglyca “mie-Hyperurika” miesyndrom". *Zentralblatt fuer Innere Medizin*, 44: 105-127.
- Langley-Evans, S. C. (2006). Developmental programming of health and disease. *Proc Nutr Soc* 65(1): 97-105.
- Langley-Evans, S. C. (2000). Critical differences between two low protein diet protocols in the programming of hypertension in the rat. *Int J Food Sci Nutr* 51(1): 11-7.
- Langley-Evans, S. C. (1996). Intrauterine programming of hypertension in the rat: nutrient interactions. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 114(4): 327-33.
- Lax, P., Larue-Achagiotis, C., Martel, P., et al. (1998) Repeated short-fasting modifies the macronutrient self-selection pattern in rats. *Physiol Behav* 65, 69–76.
- La Fleur, S.E., Kalsbeek, A., Wortel, J., Buijs, R.M. (1999) A suprachiasmatic nucleus generated rhythm in basal glucose concentrations. *J Neuroendocrinol.* 11:643–652.
- la Fleur, S.E., Kalsbeek, A., Wortel, J., Fekkes, M.L., Buijs, R.M. (2001) A daily rhythm in glucose tolerance: a role for the suprachiasmatic nucleus. *Diabetes.* 50:1237–1243
- Lamia, K.A., Storch, K.F., Weitz, C.J. (2008) Physiological significance of a peripheral tissue circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:15172–15177.

Lawlor, D. A., A. Fraser, et al. (2010). Association of existing diabetes, gestational diabetes and glycosuria in pregnancy with macrosomia and offspring body mass index, waist and fat mass in later childhood: findings from a prospective pregnancy cohort. *Diabetologia* 53(1): 89-97.

Lecoultrre, V., Ravussin, E. & Redman, L.M. (2011) The fall in leptin concentration is a major determinant of the metabolic adaptation induced by caloric restriction independently of the changes in leptin circadian rhythms. *J Clin Endocrinol Metab* 96, E1512–E1516.

Lee, C., Etchegaray, J.P., Cagampang, F.R., et al. (2001) Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock. *Cell* 107, 855–867.

Lee, A., Ader, M., Bray, G.A., Bergman, R.N. (1992) Diurnal variation in glucose tolerance. Cyclic suppression of insulin action and insulin secretion in normal-weight, but not obese, subjects. *Diabetes*. 41:750–759.

Leibowitz, S.F. (1992) Neurochemical-neuroendocrine systems in the brain controlling macronutrient intake and metabolism. *Trends Neurosci* 15, 491–497.

Leighton, B., Kowalchuk, J.M., Challiss, R.A., Newsholme, E.A. (1988) Circadian rhythm in sensitivity of glucose metabolism to insulin in rat soleus muscle. *Am J Physiol*. 1988; 255:E41–45.

Leibowitz, K. L., R. H. Moore, et al. (2012). Maternal obesity associated with inflammation in their children. *World J Pediatr* 8(1): 76-9.

LI, F. et al. (2004) Tai chi and self-rated quality of sleep and daytime sleepiness in older adults: a randomized controlled trial. *Journal of the American Geriatrics Society, United States*, v. 52, n. 6, p. 892-900

Li, X., Sankrithi, N. & Davis, F.C. (2002) Transforming growth factor-alpha is expressed in astrocytes of the suprachiasmatic nucleus in hamster: role of glial cells in circadian clocks. *Neuroreport* 13, 2143–2147.

Li, J.D., Hu, W.P., Boehmer, L., et al. (2006) Attenuated circadian rhythms in mice lacking the prokineticin 2 gene. *J Neurosci* 26, 11615–11623.

Li, N., Cai, Y., Zuo, X., Xu, S., Zhang, Y., Chan, P., Zang, Y.A. (2008) Suprachiasmatic nucleus slices induce molecular oscillations in fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 377: 1179 – 1184.

Liu, A.C., Welsh, D.K., Ko, C.H., et al. (2007) Intercellular coupling confers robustness against mutations in the SCN circadian clock network. *Cell* 129, 605–616.

Lowden, A., Moreno, C., Holmback, U., et al. (2010) Eating and shift work – effects on habits, metabolism and performance. *Scand J Work Environ Health* 36, 150–162.

- Lu, X.Y., Shieh, K.R., Kabbaj, M., et al. (2002) Diurnal rhythm of agouti-related protein and its relation to corticosterone and food intake. *Endocrinology* 143, 3905–3915.
- Lopes de Souza, S., R. Orozco-Solis, et al. (2008). Perinatal protein restriction reduces the inhibitory action of serotonin on food intake. *Eur J Neurosci* 27(6): 1400-8.
- Lucas, A. (1991). Programming by early nutrition in man. *Ciba Found Symp* 156: 38-50; discussion 50-5.
- Lucas, A. (1994). Role of nutritional programming in determining adult morbidity. *Archives of Disease in Childhood* 71: 288
- Mairan, J. J. D. de (1729). Observation botanique. In: *Histoire de l'Académie Royale des Sciences, Année 1729*. Paris: Imprimerie Royale (1731), pp. 35.
- Malpel, S., Klarsfeld, A., Rouyer, F. (2002). Larval optic nerve and adult extra-retinal photoreceptors sequentially associate with clock neurons during *Drosophila* brain development. *Development* 129: 1443–1453.
- Maningat, P.D., Sen, P., Rijnkels, M., Sunehag, A.L., Hadsell, D.L., Bray, M., Haymond, M.W. (2009) Gene expression in the human mammary epithelium during lactation: the milk fat globule transcriptome. *Physiol Genomics* 37:12–22.
- Mapara, M., B. S. Thomas, et al. (2012). Rabbit as an animal model for experimental research. *Dent Res J (Isfahan)* 9(1): 111-118.
- Marcheva, B., Ramsey, K.M., Buhr, E.D., Kobayashi, Y., Su, H., Ko, C.H., Ivanova, G., Omura, C., Mo, S., Vitaterna, M.H., et al. (2010) Disruption of the clock components CLOCK and BMAL1 leads to hypoinsulinaemia and diabetes. *Nature*. 466:627–631.
- Mazzoni, E.O., Desplan, C., Blau, J. (2005). Circadian pacemaker neurons transmit and modulate visual information to control a rapid behavioral response. *Neuron* 45: 293–300
- McCurdy, C.E., Bishop, J.M., Williams, S.M., Grayson, B.E., Smith, M.S., Friedman, J.E., Grove, K.L. (2009). Maternal high-fat diet triggers lipotoxicity in the fetal livers of nonhuman primates. *J. Clin. Invest.* 119, 323–335.
- McDonald, R. B. (1997). Some considerations for the development of diets for mature rodents used in long-term investigations. *J Nutr* 127(5 Suppl): 847S-850S.
- Mendoza, J., C. Graff, H. Dardente, P. Pevet, E. Challet, J. (2005) Feeding cues alter clock gene oscillations and photic responses in the suprachiasmatic nuclei of mice exposed to a light/dark cycle. *Neurosci.* 25, 1514
- Mendoza, J., P. Pévet, E. Challet. (2007) Circadian and photic regulation of clock and clock-controlled proteins in the suprachiasmatic nuclei of calorie-restricted mice. *European Journal of Neuroscience* 25, 3691.

- Mendoza, J., P'evet, P., Challet, E. (2008) High-fat feeding alters the clock synchronization to light. *The Journal of Physiology*. 586:5901-5910.
- Metz, R., Qu, X., Laffin, B., Earnest, D.J., Porter, W. (2006) Circadian clock and cell cycle gene expression in mouse mammary epithelial cells and in the developing mouse mammary gland. *Dev Dyn* 235:263–271.
- Mieda, M., Williams, S.C., Richardson, J.A., et al. (2006) The dorsomedial hypothalamic nucleus as a putative foodentrainable circadian pacemaker. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 12150–12155.
- Miki, H., Yano, M., Iwanaga, H., et al. (2003) Total parenteral nutrition entrains the central and peripheral circadian clocks. *Neuroreport* 14, 1457–1461.
- Mikolayunas, C.M., Thomas, D.L., Dahl, G.E., Gressley, T.F., Berger, Y.M. (2008) Effect of prepartum photoperiod on milk production and prolactin concentration of dairy ewes. *J Dairy Sci* 91:85–90.
- Mistlberger, R. & Rusak, B. (1987) Palatable daily meals entrain anticipatory activity rhythms in free-feeding rats: dependence on meal size and nutrient content. *Physiol Behav* 41, 219–226.
- Mistlberger, R.E., Lukman, H., Nadeau, B.G. (1998) Circadian rhythms in the Zucker obese rat: assessment and intervention. *Appetite* 30:255–267
- Mistlberger, R. E. (2009) Food-anticipatory circadian rhythms: concepts and methods. *European Journal of Neuroscience*. 30:1718-1729.
- Mistlberger, R.E. (2011) Neurobiology of food anticipatory circadian rhythms. *Physiol Behav* 104, 535–545.
- Moore, R.Y. (1996) Neural control of the pineal gland. *Behav Brain Res* 73, 125–130.
- Moore, R.Y. (1997) Circadian rhythms: basics neurobiology and clinical applications. *Annu Rev Med*. *Annu Rev Med* 48: 253-266.
- Morikawa, Y., Nakagawa, H., Miura, K., et al. (2007) Effect of shift work on body mass index and metabolic parameters. *Scand J Work Environ Health* 33, 45–50.
- Muhlbauer, E., Gross, E., Labucay, K., Wolgast, S., Peschke, E. (2009) Loss of melatonin signalling and its impact on circadian rhythms in mouse organs regulating blood glucose. *Eur J Pharmacol*. 606:61– 71.
- Muhlhausler, B. S. (2007). Programming of the appetite-regulating neural network: a link between maternal overnutrition and the programming of obesity? *J Neuroendocrinol* 19(1): 67-72.

- Nakahara, D., Nakamura, M., Iigo, M. & Okamura, H. (2003). Bimodal circadian secretion of melatonin from the pineal gland in a living CBA mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 100: 9584–9589.
- Nascimento, E., Guzman Quevedo, O., Delacourt, N., Aragao, R. d. S., Perez-Garcia, G., de Souza, S. L., Manhaes-de-Castro, R., Bolanos Jimenez, F. J., Kaeffer, B. (2013). Long-lasting effect of perinatal exposure to L-tryptophan on circadian clock of primary cell lines established from male offspring born from mothers fed on dietary protein restriction. *Plos One*, 8 (2).
- Neville, M.C., Morton, J. (2001) Physiology and endocrine changes underlying human lactogenesis II. *J Nutr* 131:3005S–3008S.
- Nijland, M. J., N. E. Schlabritz-Loutsevitch, et al. (2007). Non-human primate fetal kidney transcriptome analysis indicates mammalian target of rapamycin (mTOR) is a central nutrient-responsive pathway. *J Physiol* 579(Pt 3): 643-56.
- Novakova, M., Sladek, M., Sumova, A. (2010). Exposure of pregnant rats to restricted feeding schedule synchronizes the SCN clocks of their fetuses under constant light but not under a light-dark regime. *J. Biol. Rhythms.* 25, 350–360.
- Nüsslein-Volhard, C., Dahm, R., editors. (2002). *Zebrafish*. Oxford: Oxford University Press.
- Oftedal, O. (2000) Use of maternal reserves as a lactation strategy in large mammals. *Proc Nutr Soc* 59:99–106.
- OISHI, K., ITOH, N. (2013) Disrupted daily light-dark cycle induces the expression of hepatic gluconeogenic regulatory genes and hyperglycemia with glucose intolerance in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 432:111-115.
- Ong, K. K. and R. J. Loos (2006). Rapid infancy weight gain and subsequent obesity: systematic reviews and hopeful suggestions. *Acta Paediatr* 95(8): 904-8.
- Orozco-Solis, R., S. Lopes de Souza, et al. (2009). Perinatal undernutrition-induced obesity is independent of the developmental programming of feeding. *Physiol Behav* 96(3): 481-92.
- Orozco-Solis, R., R. J. Matos, et al. (2010a). Nutritional programming in the rat is linked to long-lasting changes in nutrient sensing and energy homeostasis in the hypothalamus. *PLoS One* 5(10): e13537.
- Orozco-Solis, R., R. J. Matos, et al. (2010b). Perinatal nutrient restriction induces long-lasting alterations in the circadian expression pattern of genes regulating food intake and energy metabolism. *Int J Obes (Lond)* 35(7): 990-1000.
- Otto, B., Cuntz, U., Fruehauf, E., et al. (2001) Weight gain decreases elevated plasma ghrelin concentrations of patients with anorexia nervosa. *Eur J Endocrinol* 145, 669–673.

- Ozanne, S. E., C. L. Wang, et al. (1996). Altered muscle insulin sensitivity in the male offspring of protein-malnourished rats. *Am J Physiol* 271(6 Pt 1): E1128-34.
- Ozanne, S.E.;& Hales, C.N. (2002) Early programming of glucose-insulin metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 13,368–373.
- Panda, S., Antoch, M.P., Miller, B.H., Su, A.I., Schook, A.B., Straume, M., Schultz, P.G., Kay, S.A., Takahashi, J.S., Hogenesch, J.B. (2002) Coordinated Transcription of Key Pathways in the Mouse by the Circadian Clock. *Cell* 109; 3: 307-320
- Panda, S., Provencio, I., Tu, D.C., Pires, S.S., Rollag, M.D., Castrucci, A.M., Pletcher, M.T., Sato, T.K., Wiltshire, T., Andahazy, M., Kay, S.A., Van Gelder, R.N., Hogenesch, J.B. (2003). Melanopsin is required for nonimage- forming photic responses in blind mice. *Science* 301:525–527.
- Peek, C.B., Affinati, A.H., Ramsey, K.M., Kuo, H.Y., Yu, W., Sena, L.A., Ilkayeva, O., Marcheiva, B., Kobayashi, Y., Omura, C., Levine, D.C., Bacsik, D.J., Gius, D., Newgard, C.B., Goetzman, E., Chandel, N.S., Denu, J.M., Mrksich, M., Bass, J. (2013). Circadian clock NAD<sup>+</sup> cycle drives mitochondrial oxidative metabolism in mice. *Science*. 2013 Nov 1;342(6158):1243417.
- Peirson, S.N., Butler, J.N., Duffield, G.E., et al. (2006) Comparison of clock gene expression in SCN, retina, heart, and liver of mice. *Biochem Biophys Res Commun* 351, 800–807.
- Peret, J., Chanez, M., Pascal, G. (1976) Schedule of protein ingestion and circadian rhythm of certain hepatic enzyme activities involved in glucose metabolism in the rat. *Nutr Metab.* 20:143–157.
- Pérez García, G., Guzmán-Quevedo, O., Aragão, R.S., Lopes de Souza, S., Bolaños-Jiménez, F. (2011) Effects of perinatal protein-restriction on hippocampal neurogenesis in response to a learning task. 11<sup>th</sup> European Nutrition Conference, Madrid
- Peschke, E., Peschke, D. (1998) Evidence for a circadian rhythm of insulin release from perfused rat pancreatic islets. *Diabetologia*. 41:1085–1092.
- Petry, C. J., M. W. Dorling, et al. (2001). Diabetes in old male offspring of rat dams fed a reduced protein diet. *Int J Exp Diabetes Res* 2(2): 139-43.
- Petrik, J., B. Reusens, et al. (1999). A low protein diet alters the balance of islet cell replication and apoptosis in the fetal and neonatal rat and is associated with a reduced pancreatic expression of insulin-like growth factor-II. *Endocrinology* 140(10): 4861-73.
- PIMENTA, et. al. (2012) Trabalho noturno e risco cardiovascular em funcionários de universidade pública. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 58:168-177
- Pittendrigh, C., Daan, S. (1976) A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. *Journal of comparative physiology*. 106:333–355.



Plagemann, A., T. Harder, et al. (1999). Morphological alterations of hypothalamic nuclei due to intrahypothalamic hyperinsulinism in newborn rats. *Int J Dev Neurosci* 17(1): 37-44.

Plagemann, A., T. Harder, et al. (2000). Hypothalamic nuclei are malformed in weanling offspring of low protein malnourished rat dams. *J Nutr* 130(10): 2582-9.

Plaut, K., Casey, T. (2012) Does the circadian system regulate lactation? *Animal* 6:394–402.

Plautz, J.D., Kaneko, M., Hall, J.C., Kay, S.A. (1997). Independent photoreceptive circadian clocks throughout *Drosophila*. *Science* 278:1632–1635.

Polidarová, L., Sládek, M., Nováková, M., Parkanová, D., Sumová, A. (2013) Increased Sensitivity of the Circadian System to Temporal Changes in the Feeding Regime of Spontaneously Hypertensive Rats - A Potential Role for Bmal2 in the Liver. *PLoS ONE* 8(9): e75690

Poore, K. R., A. J. Forhead, et al. (2002). The effects of birth weight on basal cardiovascular function in pigs at 3 months of age. *J Physiol* 539(Pt 3): 969-78.

Poore, K. R. and A. L. Fowden (2004). Insulin sensitivity in juvenile and adult Large White pigs of low and high birthweight. *Diabetologia* 47(2): 340-8.

Prentice, A. M. (2005). Early influences on human energy regulation: thrifty genotypes and thrifty phenotypes. *Physiol Behav* 86(5): 640-5.

Prosser, H.M., Bradley, A., Chesham, J.E., et al. (2007) Prokineticin receptor 2 (Prokr2) is essential for the regulation of circadian behavior by the suprachiasmatic nuclei. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 648–653.

Ravelli, G. P., Z. A. Stein, et al. (1976). Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. *N Engl J Med* 295(7): 349-53.

Reeves, P. G. (1997). Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. *J Nutr* 127(5 Suppl): 838S-841S.

Refinetti, R. (2006) *Circadian physiology*, 2nd ed

Reilly, T., Atkinson, G., Waterhouse, J. (2000) Chronobiology and physical performance. In: Garret WE., Kirkendall DT (ed). *Exercise and sport science*. 1ed. Philadelphia: Williams & Wilkins, Cap.24, p.351-372.

Reeves, P. G. (1997). Components of the AIN-93 Diets as Improvements in the AIN-76A Diet. *American Society for Nutritional Sciences: Symposium: Animal Diets for Nutritional and Toxicological Research*.

Reznick et. al. (2013) Altered feeding differentially regulates circadian rhythms and energy metabolism in liver and muscle of rats. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1832:228-238.

Ribeiro, S., P. Campos, et al. (1995). O rato como animal de laboratório: histórico, dados biológicos e análise crítica de seu uso. *Rev Farm Bioquím* 31(1): 21-8.

Richter, C. P. (1965). *Biological Clocks in Medicine and Psychiatry*. Springfield, IL: Charles C Thomas.

Rodrigues, S. L., M. P. Baldo, et al. (2010). Association of waist-stature ratio with hypertension and metabolic syndrome: population-based study. *Arq Bras Cardiol* 95(2): 186-91.

Rose, A.J., Richter, E.A. (2005) Skeletal muscle glucose uptake during exercise: how is it regulated? *Physiology (Bethesda)*. 20:260–270.

Rudic, R.D., McNamara, P., Curtis, A.M., et al. (2004) BMAL1 and CLOCK, two essential components of the circadian clock, are involved in glucose homeostasis. *PLoS Biol* 2, e377

Ruiter, M., La Fleur, S.E., van Heijningen, C., van der Vliet, J., Kalsbeek, A., Buijs, R.M. (2003) The daily rhythm in plasma glucagon concentrations in the rat is modulated by the biological clock and by feeding behavior. *Diabetes*. 52:1709–1715.

Rutter, J., Reick, M., Wu, L.C., McKnight, S.L. (2001). Regulation of Clock and NPAS2 DNA binding by the Redox state of NAD cofactors. *Science* 293: 510-514

Sadacca, L.A., Lamia, K.A., deLemos, A.S, et al. (2011) An intrinsic circadian clock of the pancreas is required for normal insulin release and glucose homeostasis in mice. *Diabetologia* 54, 120–124.

Sakamoto, K., Oishi, K., Nagase, T., Miyasaki, K., Ishida, N. (2002). Circadian expression of clock genes during ontogeny in the rat heart. *Neuroreport* 13: 1239-1242.

Salén, J. (1995). Animal models: principles and problems. In: Rollin BE, Kessel ML. *The experimental animal in biomedical research: care, husbandry and well-being: an overview by species*. CRC Press: 560p.

Salgado-Delgado et. al. (2010) Food intake during normal activity phase prevents obesity and circadian desynchrony in a rat model of night work. *Endocrinology*. 151(3):1019-1029

Sanchez, J., Oliver, P., Pico, C., et al. (2004) Diurnal rhythms of leptin and ghrelin in the systemic circulation and in the gastric mucosa are related to food intake in rats. *Pflugers Arch* 448, 500–506.

Sato, et al. (2014), The role of the endocrine system in feeding-induced tissue-specific circadian entrainment. *Cell Reports* 8, 393–401

Schanaider, A. and P. Silva (2004). Uso de animais em cirurgia experimental. *Acta Cir Bras* 19(4): 441-7.

Scheer, F.A., Hilton, M.F., Mantzoros, C.S., Shea, S.A. (2009) Adverse metabolic and cardiovascular consequences of circadian misalignment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106:4453–4458.

Scheer, F.A., Hu, K., Evoniuk, H., Kelly, E.E., Malhotra, A., Hilton, M.F., Shea, S.A. (2010) Impact of the human circadian system, exercise, and their interaction on cardiovascular function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107:20541–20546.

Scheer, F.A., Michelson, A.D., Frelinger, A.D., Evoniuk, H., Kelly, E.E., McCarthy, M., Doamekpor, L.A., Barnard, M.R., Shea, S.A. (2011) The human endogenous circadian system causes greatest platelet activation during the biological morning independent of behaviors. *PLoS One.* 6:e24549.

Scheer, F.A., Shea, S.A. (2013) Human circadian system causes morning peak in prothrombotic plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) independent of sleep/wake cycle. *Blood* 23;123(4):590-3

Scheer, F.A., Hilton, M.F., Mantzoros, C.S., et al. (2009) Adverse metabolic and cardiovascular consequences of circadian misalignment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 4453–4458.

Schibler, U., Ripperger, J. & Brown, S.A. (2003) Peripheral circadian oscillators in mammals: time and food. *J Biol Rhythms* 18, 250–260.

Schmid, S.M., Hallschmid, M., Jauch-Chara, K., et al. (2008) A single night of sleep deprivation increases ghrelin levels and feelings of hunger in normal-weight healthy men. *J Sleep Res* 17, 331–334

Schrader, J.A., Walaszczyk, E.J., Smale, L. (2009). Changing patterns of daily rhythmicity across reproductive states in diurnal female Nile grass rats (*Arvicanthis niloticus*). *Physiol. Behav.* 98, 547–556

Sekaran, S., Lupi, D., Jones, S.L., Sheely, C.J., Hattar, S., Yau, K.W., Lucas, R.J., Foster, R.G., Hankins, M.W. (2005). Melanopsin-dependent photoreception provides earliest light detection in the mammalian retina. *Curr Biol* 15:1099–1107.

Selmaoui, B. & Touitou, Y. (2003). Reproducibility of the circadian rhythms of serum cortisol and melatonin in healthy subjects: a study of three different 24-h cycles over six weeks. *Life Sciences* 73: 3339–3349.

Seron-Ferre, M., Ducsay, C.A., Valenzuela, G.J.(1993). Circadian rhythms during pregnancy. *Endocr. Rev.* 14, 594–609.

Seron-Ferre, M., Valenzuela, G.J., Torres-Farfan, C. (2007). Circadian clocks during embryonic and fetal development. *Birth Defects Res. C Embryo Today* 81, 204–214.

Shaw, J. E., R. A. Sicree, et al. (2010). Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract* 87(1): 4-14.

Shea, S.A., Hilton, M.F., Hu, K., Scheer, F.A. (2011) Existence of an endogenous circadian blood pressure rhythm in humans that peaks in the evening. *Circ Res* 108:980–984.

Shi, S., Ansari, T.S., McGuinness, O.P., Wasserman, D.H., and Johnson, C.H. (2013). Circadian Disruption Leads to Insulin Resistance and Obesity. *Current Biology* 23, 372–381

Simpson, S. & Galbraith, J. J. (1906). Observations on the normal temperature of the monkey and its diurnal variation, and on the effect of changes in the daily routine on this variation. *Transactions of the Royal Society of Edinburgh* 45: 65–104.

Sindelar, D.K., Palmiter, R.D., Woods, S.C., et al. (2005) Attenuated feeding responses to circadian and palatability cues in mice lacking neuropeptide Y. *Peptides* 26, 2597–2602.

Silveira, P. P., A. K. Portella, et al. (2007). Developmental origins of health and disease (DOHaD). *J Pediatr (Rio J)* 83(6): 494-504.

Sladek, M., Rybova, M., Jindrakova, Z., et al. (2007) Insight into the circadian clock within rat colonic epithelial cells. *Gastroenterology* 133, 1240–1249.

Sládek, M., Jindráková, Z., Bendová, Z., Sumová, A. (2007) Postnatal ontogenesis of the circadian clock within the rat liver. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292: R1224–R1229.

Snoeck, A., C. Remacle, et al. (1990). Effect of a low protein diet during pregnancy on the fetal rat endocrine pancreas. *Biol Neonate* 57(2): 107-118.

Sollberger, A. (1964) The Control of Circadian Glycogen Rhythms. *Ann N Y Acad Sci.* 117:519–554.

Speakman, J.R. (2000) The cost of living: field metabolic rates of small mammals. *Adv Ecol Res* 30:177–297.

Speakman, J.R., McQueenie, J. (1996) Limits to sustained metabolic rate: the link between food intake, basal metabolic rate and morphology in reproducing mice, *Mus musculus*. *Physiol Zool* 69:746–769.

Stanewsky, R., Kaneko, M., Emery, P., Beretta, B., Wager-Smith, K., Kay, S.A., Rosbash, M., Hall, J.C. (1998). The cryb mutation identifies cryptochrome as a circadian photoreceptor in *Drosophila*. *Cell* 95:681–692.

- Stephan, F.K. (1989) Entrainment of activity to multiple feeding times in rats with suprachiasmatic lesions. *Physiol Behav* 46, 489–497.
- Stephan, F.K. (2002) The ‘other’ circadian system: food as a Zeitgeber. *J Biol Rhythms* 17, 284–292.
- Stokkan, K.A., Yamazaki, S., Tei, H., et al. (2001) Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science* 291, 490–493.
- Storch, K.F. & Weitz, C.J. (2009) Daily rhythms of foodanticipatory behavioral activity do not require the known circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 6808–6813.
- Stokkan, S. Yamazaki, H. Tei, Y. Sakaki, M. Menaker. (2001) Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science* 291, 490
- Stutz, A.M., Staszkiwicz, J., Ptitsyn, A., et al. (2007) Circadian expression of genes regulating food intake. *Obesity (Silver Spring)* 15, 607–615.
- Suter, M., Bocock, P., Showalter, L., Hu, M., Shope, C., McKnight, R., Grove, K., Lane, R., and Aagaard-Tillery, K. (2011). Epigenomics: maternal high-fat diet exposure in utero disrupts peripheral circadian gene expression in nonhuman primates. *The FASEB Journal* 714-726
- Suwazono Y et al. (2008) A longitudinal study on the effect of shift work on weight gain in male Japanese workers. *Obesity* 16, 1887.
- Symonds, M. E., S. P. Sebert, et al. (2009). Nutritional programming of the metabolic syndrome. *Nat Rev Endocrinol* 5(11): 604-10.
- Szosland, D. (2010) Shift work and metabolic syndrome, diabetes mellitus and ischaemic heart disease. *Int J Occup Med Environ Health* 23, 287–291
- Tanoue, S., Krishnan, P., Krishnan, B., Dryer, S.E., Hardin, P.E. (2004). Circadian clocks in antennal neurons are necessary and sufficient for olfaction rhythms in *Drosophila*. *Curr Biol* 14:638–649.
- Tarlow, E. M., Hau, M., Anderson, D. J. & Wikelski, M. (2003). Diel changes in plasma melatonin and corticosterone concentrations in tropical Nazca boobies (*Sula granti*) in relation to moon phase and age. *General and Comparative Endocrinology* 133: 297–304.
- Tarttelin, E.E., Bellingham, J., Bibb, L.C., Foster, R.G., Hankins, M.W., Gregory-Evans, K., Gregory-Evans, C.Y., Wells, D.J., Lucas, R.J. (2003). Expression of opsin genes early in ocular development of humans and mice. *Exp Eye Res* 76:393–396.

- Taylor, R. W., A. M. Grant, et al. (2005). Early adiposity rebound: review of papers linking this to subsequent obesity in children and adults. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 8(6): 607-12.
- Tasaka, Y., Inoue, S., Maruno, K., Hirata, Y. (1980) Twenty-four-hour variations of plasma pancreatic polypeptide, insulin and glucagon in normal human subjects. *Endocrinol Jpn.* 1980; 27:495–498.
- Tempel, D.L. & Leibowitz, S.F. (1989) PVN steroid implants: effect on feeding patterns and macronutrient selection. *Brain Res Bull* 23, 553–560.
- Toscano, A. E.; Manhaes-De-Castro, R.; Canon, F. (2008) Effect of a low-protein diet during pregnancy on skeletal muscle mechanical properties of offspring rats. *Nutrition [S.I.]*, v. 24, n. 3, p. 270-8, Mar
- Tschop, M., Weyer, C., Tataranni, P.A., et al. (2001) Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes* 50, 707–709.
- Tucker, H.A., Merkel, R.A. (1987) Applications of hormones in the metabolic regulation of growth and lactation in ruminants. *Fed Proc* 46: 300–306.
- Turek, F.W., Joshu, C., Kohsaka, A., et al. (2005) Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. *Science* 308, 1043–1045.
- Uemura, H., S. Katsuura-Kamano, et al. (2014). Serum hepatic enzyme activity and alcohol drinking status in relation to the prevalence of metabolic syndrome in the general Japanese population. *PLoS One* 9(4): e95981.
- Valassi, E., Scacchi, M. & Cavagnini, F. (2008) Neuroendocrine control of food intake. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 18, 158–168.
- Vallone, D., Lahiri, K., Dickmeis, T., Foulkes, N.S. (2007) Start the Clock! Circadian Rhythms and Development *Developmental Dynamics* 236:142–155.
- Vallone, D., Lahiri, K., Dickmeis, T., Foulkes, N.S. (2005). Zebrafish cell clocks feel the heat and see the light. *Zebrafish* 2:171–187.
- Van Cauter, E., Blackman, J.D., Roland, D., Spire, J.P., Refetoff, S., Polonsky, K.S. (1991) Modulation of glucose regulation and insulin secretion by circadian rhythmicity and sleep. *J Clin Invest.* 88:934– 942.
- Van Cauter, E.; Copinschi, G. (1999) Human growth hormone secretion: basic and clinical research. Inc Totowa, NJ: Humana Press; Interactions between growth hormone secretion and sleep.
- Van Cauter, E.; Spiegel, K. (1999) *Neurobiology of Sleep and Circadian Rhythms*. New York: Marcel Dekker. Circadian and sleep control of endocrine secretions.

- van Someren, E.J. & Riemersma-van der Lek, R.F. (2007) Live to the rhythm, slave to the rhythm. *Sleep Med Rev* 11, 465–484
- Vernon, R.G., Denis, R.G.P., Sorensen, A., Williams, (2002) G. Leptin and the adaptations of lactation in rodents and ruminants. *Horm Metab Res* 34:678–685.
- Vickers, M. H., B. H. Breier, et al. (2000). Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279(1): E83-7.
- Vickers, M. H., B. H. Breier, et al. (2003). Sedentary behavior during postnatal life is determined by the prenatal environment and exacerbated by postnatal hypercaloric nutrition. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285(1): R271-3.
- Vickers, M. H., S. Krechowec, et al. (2003a). Maternal undernutrition leads to lethargy and hyperphagia combined with increased hepatic lipid accumulation, reduced muscle mass and obesity in offspring. *Pediatr. Res* 53, 39A.
- Vieira, E., Marroqui, L., Batista, T.M., et al. (2012) The clock gene *Rev-erbalpha* regulates pancreatic beta-cell function: modulation by leptin and high-fat diet. *Endocrinology* 153, 592–601.
- Villalpando, S., del Prado-Manriquez, M., Stafford, J., Delgado, G. (1995) Diurnal variations in the fatty acid composition of milk fat from marginally nourished women. *Arch Med Res* 26 Spec No: S139–S143.
- Villalpando, S., T. Shamah-Levy, et al. (2010). Trends for type 2 diabetes and other cardiovascular risk factors in Mexico from 1993-2006. *Salud Publica Mex* 52 Suppl 1: S72-9.
- Valenzuela, A. A., A. Maiz, et al. (2010). [Prevalence of metabolic syndrome among Chilean adults]. *Rev Med Chil* 138(6): 707-14.
- Voet, D. D. (2004) *Voet's Biochemistry*. Third edition. p. 3
- Wager-Smith, K., Kay, S.A. (2000) Circadian rhythm genetics: from flies to mice to humans. *Nat Genet* 26:23–27.
- Walmsley, L., Hanna, L., Moulard, J., Martial, F., West, A., Smedley, A.R., et al. (2015) Colour As a Signal for Entraining the Mammalian Circadian Clock. *PloS Biol* 13(4): e1002127.
- Waterhouse, J., Buckley, P., Edwards, B., Reilly, T. (2003) Measurement of, and some reasons for, differences in eating habits between night and day workers. *Chronobiol Int.* 20(6):1075-92.
- Weinert, D. (2005). Ontogenetic development of the mammalian circadian system. *Chronobiol Int.* 2005;22(2):179-205

- Westerterp-Plantenga, M.S., Ijeda, M.J. & Wijckmans- Duijsens, N.E. (1996) The role of macronutrient selection in determining patterns of food intake in obese and nonobese women. *Eur J Clin Nutr* 50, 580–591.
- Wets-Eberhard, M. (2003). *Developmental plasticity and evolution*. Oxford University Press.
- Whichelow MJ, Sturge RA, Keen H, Jarrett RJ, Stimmler L, Grainger S. Diurnal variation in response to intravenous glucose. *Br Med J*. 1974; 1:488–491. [PubMed: 4817160]
- Williams, P. J., L. O. Kurlak, et al. (2007). Hypertension and impaired renal function accompany juvenile obesity: the effect of prenatal diet. *Kidney Int* 72(3): 279-89.
- WHO, W. H. O. (1999). *Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications: Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus*.
- WHO, W. H. O. (2012). *Obesity and Overweight*. 2014.
- WHO, W. H. O. (1996). *World health statistic annual 1995*. Geneva.
- Wilson, P. W., R. B. D'Agostino, et al. (2005). Metabolic syndrome as a precursor of cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus. *Circulation* 112(20): 3066-72.
- Woldt, E., Sebt, Y., Solt, L.A., Duhem, C., Lancel, S., Eeckhoutte, J., Hesselink, M.K.C., Paquet, C., Delhay, S., Shin, Y., Kamenecka, T., Schaart, G., Lefebvre, P., Nevière, R., Burris, T.P., Schrauwen, P., Staels, B., and Duez, H. (2013) Rev-erb- $\alpha$  modulates skeletal muscle oxidative capacity by regulating mitochondrial biogenesis and autophagy. *Nat Med*. 19(8): 1039–1046
- Wong, M.L., Licinio, J., Yildiz, B.O., et al. (2004) Simultaneous and continuous 24-hour plasma and cerebrospinal fluid leptin measurements: dissociation of concentrations in central and peripheral compartments. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 258–265.
- Wynne, K., Stanley, S., McGowan, B., et al. (2005) Appetite control. *J Endocrinol* 184, 291–318.
- Woerle, H.J., Meyer, C., Dostou, J.M., Gosmanov, N.R., Islam, N., Popa, E., Wittlin, S.D., Welle, S.L., Gerich, J.E. (2003) Pathways for glucose disposal after meal ingestion in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 284:E716–725. [PubMed: 12475753]
- Wyse, C.A. & Coogan, A.N. (2010) Impact of aging on diurnal expression patterns of CLOCK and BMAL1 in the mouse brain. *Brain Res* 1337, 21–31.
- Yannielli, P.C., Molyneux, P.C., Harrington, M.E., et al. (2007) Ghrelin effects on the circadian system of mice. *J Neurosci* 27, 2890–2895.



- Yi, C.X., Challet, E., Pevet, P., et al. (2008) A circulating ghrelin mimetic attenuates light-induced phase delay of mice and light-induced Fos expression in the suprachiasmatic nucleus of rats. *Eur J Neurosci* 27, 1965–1972.
- Yi, C.X., Serlie, M.J., Ackermans, M.T., et al. (2009) A major role for perifornical orexin neurons in the control of glucose metabolism in rats. *Diabetes* 58, 1998–2005.
- Yi, C.X., Sun, N., Ackermans, M.T., et al. (2010) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulates glucose production via the hepatic sympathetic innervation in rats. *Diabetes* 59, 1591–1600.
- Yildiz, B.O., Suchard, M.A., Wong, M.L., et al. (2004) Alterations in the dynamics of circulating ghrelin, adiponectin, and leptin in human obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 10434–10439.
- Young, M., Razeghi, P., Cedars, A., Guthrie, P., Taegtmeier, H. (2001a) Intrinsic diurnal variations in cardiac metabolism and contractile function. *Circ Res.* 89:1199–1208. [PubMed: 11739286]
- Young, M.E., Razeghi, P. & Taegtmeier, H. (2001b) Clock genes in the heart: characterization and attenuation with hypertrophy. *Circ Res* 88, 1142–1150.
- Young, M. E., Bray, M. S. (2007) Potential role of peripheral circadian clock dyssynchrony in the pathogenesis of cardiovascular dysfunction. *Sleep Medicine.* 8:656-667.
- Yoo, S.H., Yamazaki, S., Lowrey, P.L., et al. (2004) PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 5339–5346.
- Xu, B., Kalra, P.S., Farmerie, W.G., et al. (1999) Daily changes in hypothalamic gene expression of neuropeptide Y, galanin, proopiomelanocortin, and adipocyte leptin gene expression and secretion: effects of food restriction. *Endocrinology* 140, 2868–2875.
- Zimmet, P. Z. (1992). Kelly West Lecture. Challenges in diabetes epidemiology--from West to the rest." *Diabetes Care* 15(2): 232-52.
- Zhang, E.E., Liu, Y., Dentin, R., Pongsawakul, P.Y., Liu, A.C., Hirota, T., Nusinow, D.A., Sun, X., Landais, S., Kodama, Y., et al. (2010) Cryptochrome mediates circadian regulation of cAMP signaling and hepatic gluconeogenesis. *Nat Med.* 2010; 16:1152–1156.

# Thèse de Doctorat

André de Sà Braga Oliveira

**Effets de la gestation et de la malnutrition périnatale sur les rythmes circadiens**

**Efeitos da gestação e da desnutrição perinatal sobre os ritmos circadianos**

## RÉSUMÉ

Les individus qui sont exposés à une carence nutritionnelle pendant le développement périnatal, présentent à l'âge adulte, un risque plus élevé de développer de l'obésité, un diabète de type 2 et des maladies cardiovasculaires par rapport aux personnes du même âge avec une alimentation équilibrée. Ici, nous étudions si une restriction protéique périnatale agit sur la capacité de synchronisation des fibroblastes de rates et sur leur descendance. Les régimes à faible teneur en protéines (8 g%) et à teneur normale (20 g%) ont été offerts à des rats femelles pendant la grossesse et l'allaitement. Le rythme circadien de la prise alimentaire et de la glycémie des animaux témoins et en restriction protéique pendant la grossesse et la lactation malnutrition des mères correspondantes ont été enregistrés. Des fibroblastes, provenant de l'extrémité caudale de ces rates et de leur progéniture ont été établis en culture primaire et soumis à un choc de sérum pour ré-induire les oscillations de la transcription de *bmal1*, *per1* et *per2*. L'expression génique relative de ces transcrits a été analysée par Réaction en Chaîne par Polymérase quantitative (sigle anglais qPCR). La courbe des taux du glucose sanguin total des mères en restriction protéique pendant la grossesse était significativement inférieure à celui d'avant la grossesse, sans montrer, cependant, des altérations dans le rythme de la prise alimentaire. Les fibroblastes de mères en restriction protéique ont montré des différences significatives dans les niveaux d'expression de *bmal1* à 6 après synchronisation (Zeitgeber Time6 ; ZT6) et à ZT18 par rapport aux témoins. En revanche, les fibroblastes des embryons en restriction protéique montraient des différences significatives pour la *per1* à ZT0 et ZT24 et pour *per2*. Il a été également constaté que les fibroblastes de la progéniture n'avaient pas les mêmes rythmes de l'expression des gènes de ces transcriptions par rapport à leurs mères, à la fois pendant la période embryonnaire ainsi que après 14 jours de sevrage, sauf pour le gène de *per2*, qui présentait des oscillations similaires entre les embryons et de leurs mères. Nos résultats montrent que ces réponses périnatales et postnatales reflètent la plasticité du développement et des «décisions» des descendants de première génération afin d'optimiser leur propre développement, et ce, avec des conséquences durables.

**Mots-clé :** Gestation. Dénutrition. Fibroblastes

## ABSTRACT

Individuals exposed to a nutritional deficiency during perinatal development have, once they reach adulthood, a higher risk of developing obesity, type 2 diabetes and cardiovascular disease compared with individuals of the same age fed on a balanced nutrition. Here, we have explored whether protein restriction during the perinatal period acts on the capacity of synchronization of *in vitro* propagated fibroblasts sampled in dyads. Low Protein (8 g% of protein) or Isocaloric (18 g% protein) diets were offered during gestation and lactation. Circadian food intake and glycemia during pregnancy and lactation of Low-Protein and Control mothers were registered. High density cultures of fibroblasts from dyads [mother (Day-17 Gestation; Day-65 after fecundation) and first generation offspring (Day-17 embryo and D-35 young adult) were submitted to a serum shock to re-induce oscillations of *bmal1*, *per1*, and *per2* transcripts. Relative expression of transcripts were assayed by quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR). The curves of total blood glucose levels of Low Protein mothers during pregnancy were significantly lower than those before pregnancy with independent alterations in the rhythm of food consumption. Fibroblasts from Low Protein mothers exhibited significant differences in the expression levels of *bmal1* at ZT 6 and ZT 18 in relation to those of controls. In contrast, fibroblasts of Low Protein embryos were affected by protein restriction during early life for *per1* gene at ZT 0 and ZT 24 and for *per2* at ZT 24. Moreover, it was observed that offspring didn't have the same gene expression rhythms than their respective mothers both during embryonic life as for 14 days after weaning, except for *Per2* gene, which presented similar oscillations between embryos and their respective mothers. Our results revealed that responses to perinatal and postnatal environment reflect the plasticity of development and the "decisions" made by the first generation offspring optimizing early development with lasting consequences.

**Key words:** Pregnancy. Protein malnutrition. Fibroblasts