Clarissa Bueno

**Estudo da Ontogênese dos Ritmos Biológicos
em Neonatos Humanos e Ratos**

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Fisiologia
Humana do Instituto de Ciências
Biomédica da Universidade de São
Paulo, para obtenção do Título de
Doutor em Ciências.

São Paulo
2011

Clarissa Bueno

**Estudo da Ontogênese dos Ritmos Biológicos
em Neonatos Humanos e Ratos**

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Fisiologia
Humana do Instituto de Ciências
Biomédica da Universidade de São
Paulo, para obtenção do Título de
Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Fisiologia
Humana

Orientador: Luiz Menna-Barreto
Versão Original

São Paulo
2011

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Bueno, Clarissa.

Estudo da ontogênese dos ritmos biológicos em neonatos humanos e ratos / Clarissa Bueno. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Luiz Silveira Menna Barreto.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Cronobiologia.

Versão do título para o inglês: Study of the ontogenesis of biological rhythms in humans and rats newborns.

Descritores: 1. Biociências 2. Biologia 3. Fisiologia 4. Cronobiologia 5. Ritmos biológicos 6. Ritmo circadiano I. Barreto, Luiz Silveira Menna II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB070/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Clarissa Bueno.

Título da Tese: Estudo da ontogênese dos ritmos biológicos em neonatos humanos e ratos.

Orientador(a): Luiz Silveira Menna Barreto.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Presidente: Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

FOLHA DE PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS (CEPSH)

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Sales Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (35) (11) 3091-7733. Telefax: (35) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 10 de agosto de 2006.

PARECER 727/CEP

Prezada Senhora,

Atendendo sua solicitação, a *Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB*, em sua 67ª reunião realizada em 09.08.06, analisou o projeto de sua responsabilidade intitulado: "*Análise comparativa da ritmicidade biológica em recém-nascidos de termo e pré-termo*".

Informo a V.Sa. que, após análise e discussão, o referido projeto foi **aprovado por esta Comissão**.

Esclareço a V.Sa. que dentro de 12 meses, relatório do referido projeto deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP.

Atenciosamente,

Prof. Dr. LUIZ VICENTE RIZZO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Ilma. Sra.
CLARISSA BUENO
Departamento de Fisiologia e Biofísica
Instituto de Ciências Biomédicas - USP

FOLHA DE PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS (CEPSH)

São Paulo, 21 de outubro de 2005.

Il^{mo(s)}. S^{rs}(a).

Prof. Dr. Luiz Silveira Mena-Barreto
Departamento de Fisiologia e Biofísica
Instituto de Ciências Biomédicas
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

REFERENTE: **Projeto de Pesquisa** "Análise comparativa da ritmicidade biológica em bebês de termo e pré-termo" - **Registro CEP: 597/05**

Prezado(a) Senhor(a)

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, em reunião ordinária realizada em 21 de outubro de 2005, analisou o projeto de pesquisa acima citado, considerando-o como **APROVADO**, bem como, seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Lembramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final, em função da duração da pesquisa), de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, item IX.2 letra c.

O primeiro relatório está previsto para 21 de outubro de 2006.

Atenciosamente,

Dra. Maria Teresa Zulini da Costa
Coordenadora
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP-HU/USP

AGRADECIMENTOS

Como em uma orquestra, este trabalho foi executado por muitas mãos; e como realizar de outra forma um estudo que versa sobre as delicadas relações endógenas que regem a organização temporal dos organismos vivos e sua interação com o ambiente? Assim, são muitos aqueles que merecem meus agradecimentos, sem hierarquia de participação.

Agradeço àquele que me acolheu em seu laboratório no início da faculdade, estabelecendo uma relação de amizade que permanece há dezessete anos. Menna, obrigada por ter me ensinado a olhar os fenômenos biológicos por outra perspectiva! Agradeço também aos membros da banca, onde reencontro pessoas que me iniciaram no caminho da Cronobiologia e agora participam do final deste ciclo. Em especial agradeço ao professor Ranvaud, em cujo laboratório permaneci por um ano, o que permitiu a realização da coleta de dados em um momento de transição do nosso grupo.

Igualmente recorro todos aqueles que se encontram no grupo ou nele estiveram (saudades do GMDRB!) e as inestimáveis contribuições dos nossos seminários e conversas vespertinas, que muitas vezes são reeditadas com o auxílio do mundo virtual. Não menciono os muitos nomes dessa lista, mas sei que todos se reconhecerão nela.

Aos meus orientadores em Barcelona, Antoni Díez-Noguera e Trinitat Cambras, responsáveis pelo desenvolvimento da parte deste estudo realizada em animais e pela orientação estatística, meus *Moltès Gracies!* Agradeço também as minhas sócias pelos anos de parceria e por terem “financiado” minha ida à Barcelona, representando-me junto aos hospitais.

Essencial foi a contribuição da equipe de enfermagem do Hospital Universitário da USP, responsável pela maior parte da coleta de dados dos recém-nascidos humanos, que se dedicaram a este trabalho apesar dos transtornos que causamos na rotina atribulada do hospital. Agradeço também à equipe médica responsável pela Unidade de Cuidado Neonatal pelo apoio na realização deste trabalho.

Especialmente, agradeço aos bebês e suas famílias, as quais concordaram em que seu filho mesmo saudável participasse de uma pesquisa científica, com o intuito de contribuir para o melhor cuidado de futuros bebês prematuros. Estas famílias empenharam-se ao longo de meses na coleta de dados com uma tenacidade admirável.

E falando em família... agradeço aos meus pais pelo ambiente de harmonia e solidariedade que souberam criar e aos meus irmãos por terem mantido esta união. Obrigada à minha família por nunca ter tentado se enquadrar aos padrões sociais mais comuns e onde a vespertinidade sempre foi um elo de união e não um problema a ser resolvido.

RESUMO

BUENO, C. Estudo da ontogênese dos ritmos biológicos em neonatos humanos e ratos. 2011. 97 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

O desenvolvimento dos ritmos biológicos em neonatos humanos e em ratos tem sido descrito como a transição de um padrão polifásico para um padrão com predomínio de um ritmo circadiano. Fatores ambientais poderiam modificar esta evolução, como já demonstrado em ratos, e neste contexto insere-se o estudo da ritmicidade biológica em recém-nascidos pré-termo mantidos em unidades de cuidado neonatal, tradicionalmente consideradas pobres em ritmos de 24 horas. O presente trabalho tem como objetivo estudar a evolução da ritmicidade no ciclo vigília/sono, atividade/repouso, temperatura do punho e alimentação na fase neonatal e sua relação com fatores ambientais que poderiam interferir na expressão destes ritmos em neonatos humanos. Paralelamente, pretendemos caracterizar o desenvolvimento dos ritmos biológicos em ratos mantidos sob luz constante durante a lactação e a atuação de fatores como melatonina e exercício físico nesta evolução. Assim, realizando um estudo longitudinal com o auxílio de novos métodos de coleta (actímetro e termistor com memória) identificamos ritmo circadiano na temperatura do punho precocemente, enquanto a atividade motora tem predomínio de um padrão ultradiano, bem como o ciclo vigília/sono e o comportamento alimentar. Observamos um incremento significativo da potência do ritmo circadiano para todas as variáveis logo após a alta hospitalar, exceto o comportamento alimentar, que se torna arritmico. Nos experimentos com ratos sob o paradigma de luz constante, utilizamos melatonina durante a lactação e após o desmame, bem como disponibilizamos uma roda para dois outros grupos de animais, durante a lactação e após o desmame. Observamos o desenvolvimento de um ritmo circadiano na atividade motora e na temperatura para todos os animais, o qual instalou-se de forma mais precoce para os animais que tinham uma roda disponível. Já os animais que receberam melatonina após o desmame apresentam uma tendência no sentido de retardar a instalação de um padrão circadiano e naqueles que receberam melatonina durante a lactação encontramos uma redução permanente no período do ritmo circadiano apenas nas fêmeas. O desenvolvimento de ritmicidade circadiana mesmo em condições desfavoráveis demonstra a importância evolutiva dos ritmos circadianos na adaptação dos organismos a um ambiente cíclico. Sugerimos que um modelo de múltiplos osciladores explicaria esta evolução, garantindo plasticidade ao sistema de temporização para adaptar-se a modificações nas relações de fase com o ambiente ao longo da ontogênese.

Palavras-chave: Ritmo. Circadiano. Recém-nascido. Roedor. Sono.

ABSTRACT

BUENO, C. Study of the ontogenesis of biological rhythms in newborns humans and rats. 2011. 97 p. Ph. D. thesis (Human Physiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

The development of biological rhythms in human newborns and rats is described as the transition from an ultradian pattern to one with a dominant circadian rhythm. Environmental factors can change this evolution, as has already been demonstrated in rats; in this context we can insert the study of biological rhythmicity in preterm newborns maintained in neonatal care units, environments traditionally considered poor in 24 hours rhythms. The present study intends to evaluate the evolution of rhythms in sleep/wake cycle, activity/rest, wrist temperature and feeding along the neonatal phase and its relation to environmental factors which can influence the expression of these rhythms in human newborns. Simultaneously, we intend to characterize the development of biological rhythms in rats reared under constant light during lactation and the action of melatonin and physical exercise in this evolution. Through a longitudinal study and with new methods of data collection (actimeters and thermistors with memory) we identified a circadian rhythm in wrist temperature precociously, while motor activity has a dominant ultradian pattern, as well as sleep/wake cycle and feeding behavior. We observed a significative increase in the circadian rhythm potency for all variables just after hospital discharge, except feeding behavior, which becomes arrhythmic. In the experiments with rats under constant light, we used melatonin during lactation and after weaning, as well as two other groups had a wheel available during lactation and after weaning. We observed the development of a circadian rhythm in motor activity and temperature for all animals, which started earlier for animals which had a wheel available. Otherwise, animals who received melatonin after weaning presented a delay in the beginning of the circadian pattern and in the ones who received melatonin during lactation we found a permanent reduction in the period of the circadian rhythm only for females. The development of circadian rhythmicity even in disturbing conditions demonstrate the evolutive importance of circadian rhythms in the adaptation of living organisms to a cyclic environment. We suggest that a model with multiple oscillators could explain this evolution and grant plasticity to timekeeping system, allowing its adaptation to changes in its phase relation with environment along the ontogenesis.

Keyword: Rhythm. Circadian. Newborn. Rodent. Sleep.

LISTA DE SIGLAS

B11: primeiro bloco de 10 dias da etapa 1 de registro da atividade motora dos animais
B12: segundo bloco de 10 dias da etapa 1 de registro da atividade motora dos animais
B13: terceiro bloco de 10 dias da etapa 1 de registro da atividade motora dos animais.
CC: grupo de animais controle
CS: parto cesárea
CVS: ciclo vigília/sono
DD: escuro constante
E1: etapa 1 do experimento em animais
E2: etapa 2 do experimento em animais (quando foram retiradas as intervenções)
E3: etapa 3 do experimento em animais (quando foi reintroduzida a melatonina na água)
GI: grupo I (recém-nascidos nascidos entre 28 e 30 semanas de idade pós-concepcional)
GII: grupo II (recém-nascidos nascidos entre 30 e 32 semanas de idade pós-concepcional)
GIII: grupo III (recém-nascidos nascidos entre 32 e 34 semanas de idade pós-concepcional)
GIV: grupo IV (recém-nascidos nascidos entre 34 e 36 semanas de idade pós-concepcional)
GV: grupo V (recém-nascidos nascidos de termo)
IC: idade pós-concepcional
IGC: idade gestacional corrigida (conta-se a idade em semanas pós-concepcionais até o momento em questão)
ID: identificação do sujeito
LD: claro/escuro
LL: luz constante
IG: idade gestacional
MD: grupo de animais que recebeu melatonina após o desmame
ML: grupo de animais que recebeu melatonina durante a lactação
NS: não significativo
NSQ: núcleos supraquiasmáticos
NAT: enzima N-acetiltransferase
P: contribuição relativa de determinada frequência no conjunto da ritmicidade global determinada pelo método do Lomb Scargle
PN: parto normal
PVA: porcentagem de variância
RD: grupo de animais que teve uma roda à disposição após o desmame
RL: grupo de animais que teve uma roda à disposição durante a lactação
RNPT: recém-nascido pré-termo
RNT: recém-nascido de termo
SCI: sistema de controle da temperatura do ar da incubadora
TA: temperatura ambiente
TP: temperatura do punho
TR: grupo de animais que teve um termistor implantado na cavidade peritoneal
TX: temperatura axilar

SUMÁRIO

<u>1 INTRODUÇÃO</u>	14
<u>1.2 OBJETIVOS</u>	24
 <u>2 ESTUDO DOS RITMOS BIOLÓGICOS EM RECÉM-NASCIDOS HUMANOS</u>	26
<u>2.1 CASUÍSTICA E MÉTODOS</u>	26
2.1.1 Coleta de dados na fase hospitalar	27
2.1.1.1 Diários	28
2.1.1.2 Atividade/repouso.....	28
2.1.1.3 Temperatura	29
2.1.1.4 Luminosidade	29
2.1.2 Coleta de dados na fase domiciliar	30
<u>2.2 ANÁLISE</u>	31
2.2.1 Análise da temperatura	31
2.2.2 Análise da atividade/repouso	33
2.2.3 Análise do ciclo vigília/sono	33
2.2.4 Análise do ciclo de alimentação	34
2.2.5 Análise dos horários de procedimento	34
2.2.6 Análise da iluminação ambiente	35
2.2.7 Comparação entre grupos	35
<u>2.3 RESULTADOS</u>	35
2.3.1 Temperatura	35
2.3.2 Atividade motora	43
2.3.3 Diário de sono/vigília, alimentação e procedimentos	47
2.3.4 Iluminação ambiente	50
2.3.5 Resultados da coleta domiciliar	51
<u>2.4 DISCUSSÃO PARCIAL</u>	55

<u>3 ESTUDO DOS RITMOS BIOLÓGICOS EM RATOS NEONATOS</u>	61
3.1 <u>MATERIAIS E MÉTODOS</u>	61
3.2 <u>ANÁLISE</u>	63
3.3 <u>RESULTADOS</u>	64
3.4 <u>DISCUSSÃO PARCIAL</u>	70
<u>4 DISCUSSÃO FINAL</u>	75
<u>5 LIMITAÇÕES DO ESTUDO</u>	79
<u>6 CONCLUSÕES</u>	81
<u>REFERÊNCIAS</u>	83
ANEXOS	91
ANEXO A - Termo de consentimento esclarecido	92
ANEXO B – Diário hospitalar de atividades	94
ANEXO C – Diário domiciliar de atividades	96

1 INTRODUÇÃO

Os organismos vivos estão em constante transformação; a qual se expressa em mudanças que podem se desenvolver ao longo de uma vida inteira (como o processo de amadurecimento e envelhecimento) ou em ciclos que se completam em curtas frações de tempo, como os processos envolvidos nos ciclos do batimento cardíaco. Nos exemplos mencionados é fácil perceber a presença de um componente endógeno envolvido nestas variações fisiológicas, entretanto, em fenômenos que apresentam um claro correlato ambiental o reconhecimento deste componente endógeno foi historicamente controverso.

Encontramos relatos de oscilações rítmicas na matéria viva desde a era pré-cristã, sendo uma das descrições mais detalhadas a de Andróstenes de Thasos em 325 a.C., descrevendo o movimento periódico das folhas do tamarindo. Entretanto, a investigação científica destes fenômenos iniciou-se a partir de 1729, com os experimentos do astrônomo francês Jean Jacques de Mairan, o qual estudou os movimentos das folhas da planta *Mimosa pudica*, que permanecem abertas durante o dia e fecham-se à noite. Ao manter a planta em obscuridade constante por alguns dias o pesquisador demonstrou a manutenção do ritmo de abertura e fechamento das folhas com um período de cerca de 24 horas, independente da informação do claro/escuro ambiental, o que sugeria a presença de um mecanismo endógeno marcador de tempo, inaugurando um padrão de experimentos que se refinou nos séculos posteriores. A partir de então, foi possível identificar a presença de oscilações rítmicas endogenamente geradas em diversas variáveis fisiológicas na maioria dos organismos vivos, caracterizando os assim chamados ritmos biológicos, segundo sua definição inicial.

Ritmos biológicos também podem ser compreendidos como quaisquer oscilações rítmicas presentes na matéria viva e foram classificados por Franz Halberg de acordo com o seu período em ritmos circadianos (com período próximo a 24 horas), ritmos ultradianos (com período inferior a 20 horas) e infradianos (com período superior a 28 horas) (1). Estes ritmos podem estar sincronizados a um ciclo geofísico, o que é particularmente evidente para os ritmos circadianos, como o ritmo de atividade/repouso de animais sincronizado ao claro/escuro ambiental. Esta sincronização pode ser estabelecida por meio de mecanismos de arrastamento, no qual pistas ambientais, denominadas *zeitgebers*, promovem o ajuste da fase e do período do ritmo endógeno àquele do ciclo ambiental, estabelecendo uma relação de fase estável. Este ajuste ocorre de forma progressiva ao longo de ciclos transientes e envolve modificações funcionais no sistema de temporização endógeno. Ritmos biológicos e ciclos ambientais também podem estar sincronizados por mecanismos de mascaramento, os quais

envolvem a atuação direta dos ciclos externos sobre a expressão dos ritmos biológicos, de forma transitória e independente do sistema de temporização, cessando assim que esta atuação é suspensa.

Desde a descrição dos ritmos biológicos e seu caráter endógeno, os pesquisadores têm se dedicado a elucidar os mecanismos envolvidos na sua geração e interação com o ambiente. Estudos de lesão em diferentes regiões do sistema nervoso central permitiram a identificação dos núcleos supraquiasmáticos (NSQs), estrutura bilateral localizada no hipotálamo anterior cuja lesão promove perda da ritmicidade da secreção de corticosterona e do comportamento de atividade/repouso, entre outros, em ratos (2). Os NSQs são formados por células com capacidade oscilatória intrínseca e que podem ser consideradas osciladores individuais (3), hipótese esta que tem recebido suporte de estudos com paradigma de conflito de *zeitgebers* demonstrando a presença simultânea de dois ritmos circadianos com períodos distintos (4).

Os núcleos supraquiasmáticos recebem informações fóticas do ambiente através do trato retino-hipotalâmico, composto por fibras provenientes de células fotorreceptoras localizadas na camada de células ganglionares da retina, que contêm o pigmento melanopsina (5). Os NSQs, por sua vez, enviam eferências para múltiplas áreas do hipotálamo e outras regiões do sistema nervoso; entre elas são enviadas projeções à glândula pineal, que tem a secreção do seu hormônio, a melatonina, inibida na fase clara e estimulada por via simpática na fase escura. A melatonina é produzida a partir da serotonina e tem como passo limitante a enzima N-acetiltransferase (NAT), que apresenta um ritmo circadiano robusto (6). Assim, a presença da melatonina durante a fase escura atuaria como um marcador temporal interno, sinalizando a condição ambiental de dia/noite para o restante do organismo e permitindo a sincronização dos diversos fenômenos fisiológicos.

Estímulos não fóticos também podem atuar sobre os NSQs por uma via envolvendo o folheto intergeniculado. Enquanto o ciclo claro/escuro é bem reconhecido como um importante *zeitgeber* para a maioria dos seres vivos, apenas recentemente os estímulos não fóticos tiveram seu papel caracterizado como agentes promotores de arrastamento. Mrosovsky (7) demonstrou que ritmos de manipulação de gaiolas, interação social e presença periódica de roda podem atuar sincronizando ritmos de atividade/repouso em roedores. Mistelberg (8) também demonstrou que hamsters com ablação dos NSQs exibem um ritmo robusto de atividade sincronizado a horários restritos de oferta de alimentos.

Mais recentemente foi descrito um complexo sistema de alças de retroalimentação envolvendo a transcrição de genes nas células dos NSQs, determinando seu período de oscilação. Estes genes, denominados genes relógios, são expressos de forma ubíqua pelo

organismo, atuando como osciladores periféricos em órgãos como rins, fígado e pâncreas; e no sistema digestivo podem ser sincronizados por ciclos de oferta de alimentos (9). Assim, todo o organismo estaria envolvido em um complexo sistema de temporização, responsável pela geração dos ritmos biológicos e sua interação com o ambiente.

Em ratos, a neurogênese dos NSQs ocorre entre os dias embrionários 10 e 17 e evoluem com aumento do seu tamanho e amadurecimento neuronal até o 10^o dia pós-natal, quando atingem um padrão similar ao de animais adultos. É também no 10^o dia pós-natal que as projeções dos tratos retino-hipotalâmico e genículo-hipotalâmico para os NSQs adquirem o padrão do adulto (10). Utilizando a captação de C-desoxiglicose foi possível demonstrar que os NSQs já apresentam oscilação intraútero e têm seu padrão rítmico dirigido pelo sistema de temporização materno (11). Fetos de roedores cujas mães tiveram seus NSQs lesados no início da gestação exibem alterações no ritmo de atividade metabólica dos NSQs, atividade da NAT na glândula pineal e, após o nascimento, também pode ser observada alteração no padrão rítmico de atividade e ingestão de água da ninhada (12,13). Na primeira semana de vida, a expressão rítmica de filhotes de roedores parece ser dirigida pelo sistema de temporização materno (coordenação materna) via núcleos supraquiasmáticos e glândula pineal, cuja lesão implicaria na perda da sincronização de parâmetros comportamentais da ninhada.

Em primatas, a neurogênese nos NSQs ocorre entre 27 e 48 dias de gestação e os núcleos estão funcionalmente inervados no que seria correspondente a 25 semanas de idade pós-concepcional de um feto humano. O amadurecimento dos NSQs em primatas também continua após o nascimento, de modo que a distribuição neuronal atinge um padrão semelhante ao do adulto ao final do primeiro ano de vida (14). É possível observar oscilação rítmica na atividade metabólica dos NSQs de primatas intraútero, bem como a presença de ritmos circadianos em variáveis como frequência cardíaca fetal no terceiro trimestre de gestação em humanos. A ritmicidade fetal em mamíferos seria sincronizada pelo sistema de temporização materno por meio de sinalização transplacentária, na qual a melatonina poderia ter um papel significativo, permitindo que os ritmos biológicos fetais estejam sincronizados ao claro/escuro do ambiente. Sabemos que em babuínos a atividade metabólica e expressão gênica nos NSQs são responsivos à luz desde o nascimento, momento a partir do qual o recém-nascido passa a ser exposto diretamente ao ciclo claro/escuro. Além disso, o padrão de atividade/repouso de babuínos neonatos pode ser arrastado por ciclos de luminosidade de intensidade relativamente baixa (14).

Em roedores sabemos que as células ganglionares da retina com fotorrecepção intrínseca (as quais expressam melanopsina) exibem resposta à luz desde o primeiro dia pós-natal; muito antes da visão formadora de imagens ter se desenvolvido. Além disso, a quantidade de células ganglionares capazes de responder diretamente à luz diminui drasticamente até a vida adulta, como resultado de massiva morte neuronal na retina, cedendo lugar às conexões responsáveis pela formação de imagens. Animais com degeneração precoce das camadas externas da retina mantêm maior quantidade de células ganglionares positivas para melanopsina na vida adulta (15), mas faltam até o momento estudos deste tipo realizados em primatas.

O desenvolvimento do ritmo de melatonina também foi estudado em roedores, sendo possível detectar melatonina na glândula pineal destes animais desde as primeiras horas de vida e ritmo de melatonina circulante a partir do 6^o dia pós-natal, possivelmente refletindo o estabelecimento da inervação proveniente do gânglio cervical superior (16). O desenvolvimento do sistema de síntese de melatonina não parecer ser afetado pela exposição a diferentes padrões de ciclo claro/escuro, nem pela exposição à luz constante nas primeiras semanas de vida (17). Sugere-se que a melatonina transmitida pelo leite materno exerça um papel na sincronização da ritmicidade dos filhotes aos ritmos maternos logo após o nascimento. É possível encontrar um ritmo de melatonina com amplitude elevada no leite materno em ratas lactantes, o qual reflete os níveis plasmáticos circulantes e apresenta valores muito próximos a estes; por outro lado, o nível de melatonina plasmática observado nos filhotes parece refletir mais sua própria produção endógena (18).

Em humanos, Munoz-Hoyos não detectou ritmo de melatonina plasmática nas primeiras 72 horas de vida, mas observou elevação de seus níveis em recém-nascidos privados de luz por óculos de proteção (19,20). O ritmo de 6-sulfatoximelatonina urinária estabelece-se entre 9 e 15 semanas pós-concepcionais em recém-nascidos de termo e um atraso de 2 a 3 semanas é observado no desenvolvimento deste ritmo em recém-nascidos pré-termo, bem como redução da sua amplitude, o que também estaria relacionado a intercorrências pré e perinatais (21,22). Em humanos a melatonina também está presente no leite materno, bem como observa-se um ritmo circadiano de triptofano, aminoácido necessário para sua síntese (23).

Nos últimos anos a ontogênese da expressão dos genes relógio tem sido objeto de alguns estudos, sendo possível identificar a presença de RNA mensageiro de diversos genes desta categoria nos NSQs fetais. Em primatas, foi encontrada expressão oscilatória de dois genes relógios nos NSQs e na glândula adrenal fetal (24), entretanto, em roedores apenas o

gene *Per1* teve ritmicidade demonstrada no final da gestação, sendo que os demais habitualmente iniciam sua expressão rítmica nos primeiros 10 dias pós-natais e, a partir de então, também é possível identificar ritmicidade em alguns genes controlados pelos genes relógio (10). Trata-se de um achado interessante na medida que já se tem demonstrado a presença de ritmos em diversos parâmetros fisiológicos mesmo na vida pré-natal e Serron-Ferre et al. sugerem que o sistema de temporização fetal funcionaria como um oscilador periférico regido pelo sistema materno (24).

Durante o desenvolvimento perinatal, influências ambientais podem interferir na organização das estruturas do sistema de temporização endógeno, e, consequentemente, na posterior manifestação da ritmicidade circadiana no animal adulto. Cambras et al. (25) demonstraram que ratos mantidos em condições de luz constante (LL) durante a lactação apresentam uma transição mais evidente de um padrão ultradiano para um padrão circadiano de atividade motora e desenvolvem um ritmo circadiano estável ao longo dos primeiros dias de vida, sob uma intensidade luminosa que habitualmente provoca arritmicidade na espécie. Posteriormente, ao serem novamente colocados em condições de luz constante na vida adulta (26), estes animais mantinham um padrão circadiano de atividade/repouso, enquanto aqueles que haviam permanecido em escuro constante (DD) durante a lactação, uma vez expostos a LL na vida adulta, tornavam-se arrítmicos. O desenvolvimento deste padrão circadiano depende do número de dias durante a lactação nos quais o animal é submetido a LL, com um mínimo de 12 dias para obter a resposta e com um período crítico entre o 10⁰ e o 20⁰ dia pós-natal (27).

Nos estudos sobre a ontogênese da ritmicidade biológica em humanos, investigando desde recém-nascidos até idosos, parece evidente que o sistema de temporização modifica-se ao longo da vida, com mudanças no seu padrão de funcionamento endógeno e na sua relação com o ambiente. Os estudos iniciais em lactentes datam de meados do século XX, com o trabalho clássico de Kleitman e Engelman demonstrando assimetria entre o dia e a noite no comportamento de sono de um grupo de crianças desde a 3^a semana de vida, a qual se tornou mais evidente a partir do segundo mês (28). Em 1961, Parmelee (29) descreveu o comportamento de sono/vigília de uma criança desde o nascimento até 35 semanas de vida, identificando a emergência de um padrão de 24 horas a partir da 6^a semana e consolidação após a 12^a semana, com um padrão de evolução não linear.

Posteriormente, Hellbrugge (30) estudando ritmos de temperatura corporal, resistência elétrica da pele, diurese e comportamento de sono/vigília em crianças de diferentes idades

definiu a evolução da ritmicidade do ciclo vigília/sono (CVS) como a transição de um padrão polifásico (composto por múltiplas frequências ultradianas) para um padrão monofásico (com predomínio do ritmo circadiano). Nesta ocasião foi identificado predominantemente um ritmo de cerca de 4 horas no CVS, atribuído por Hellbrugge ao comportamento alimentar.

Estudos posteriores, com metodologias de análise mais sofisticadas, identificaram ritmos ultradianos de diferentes períodos no CVS de crianças no primeiro ano de vida (31, 32). Utilizando observação comportamental, Menna-Barreto et al. (31) encontraram ritmos ultradianos na faixa de 4 a 8 horas em lactentes de 3 a 13 meses, sem predomínio de uma frequência em particular. O mesmo autor avaliando 3 crianças ao longo do primeiro ano de vida mostrou uma evolução não linear do ritmo circadiano do CVS, com um padrão de progressão e regressão na sua potência (contribuição relativa daquele período na composição do padrão de ritmicidade da variável), além de ampla variabilidade individual (33).

O momento de emergência de um padrão circadiano no CVS de bebês ainda é um assunto controverso, sendo tradicionalmente descrito um ritmo circadiano sincronizado a partir dos primeiros 4 meses de vida. Um estudo recente mostra que a duração mais longa de sono auto-regulado aumenta nos primeiros 4 meses, apresentando mínima variação a partir de então e voltando a prolongar-se apenas após os 10 meses (34). Entretanto, outros autores demonstram a presença de um ritmo circadiano sincronizado já ao final do primeiro mês, eventualmente relacionado às rotinas domiciliares (35). No estudo de Shimada identificou-se um ritmo circadiano sincronizado do CVS em 50% das crianças ao final do 1^o mês de vida, em 90% dos indivíduos aos 2 meses e em 100% ao final de 3 meses, ao considerar-se a idade pós-concepcional, não havendo diferença significativa entre os recém-nascidos de termo e pré-termo (36).

Jenni et al. descreveram a evolução do comportamento de atividade/repouso de lactentes desde a fase neonatal até 6 meses de vida, identificando a presença de um componente circadiano já nas primeiras 2 semanas para alguns bebês (37). A magnitude do componente de 24 horas sofreu incremento não linear segundo uma curva de saturação, atingindo a assíntota entre 5 e 10 meses de vida, sugerindo que a consolidação robusta do padrão circadiano de atividade/repouso ocorreria somente no segundo semestre e não nos primeiros 3 meses como proposto previamente. Nesse trabalho os autores também encontraram importante variabilidade individual e oscilações na potência do circadiano.

Atualmente, novos instrumentos de coleta têm sido utilizados na investigação da ontogênese dos ritmos de atividade/repouso. Sadeh (38) foi o primeiro a utilizar actímetros no estudo de ritmos biológicos na infância, desenvolvendo um algoritmo que permite a

inferência de parâmetros de sono a partir dos dados de movimento. O actímetro é um sensor que detecta aceleração de movimento, realizando registro contínuo em intervalos pré-determinados e armazenando-os em sua memória, o que permite a coleta de dados ao longo de várias semanas. Algoritmos aplicados a esta série de dados permitem a definição de parâmetros de sono, tais como tempo total de sono e de vigília, entre outros. Estudos comparando o registro do actímetro com dados de polissonografia mostram uma concordância de 89% a 94% nos primeiros 6 meses de vida, porém com melhor valor preditivo para sono que para vigília (39). Ao avaliar o registro do actímetro em relação à observação comportamental, encontra-se uma taxa de concordância baixa no primeiro mês de vida, com incremento significativo (88%) a partir dos 3 meses (40) e, comparativamente ao diário de sono, o actímetro apresenta um melhor registro dos episódios de vigília noturna após 1 mês de idade (41). O actímetro também foi utilizado em recém-nascidos pré-termo em unidades de cuidado neonatal por Sung et al. (42) demonstrando boa relação com os dados derivados da observação comportamental, porém com melhor acurácia para o modo de baixo limiar de atividade entre 30 e 36 semanas de idade pós-concepcional.

Korte et al. (43) avaliaram concomitantemente a evolução do padrão de ingestão alimentar e do ritmo de atividade/repouso obtido por meio da actimetria em recém-nascidos de termo e pré-termo monitorados entre 3 e 10 dias de vida, identificando ritmo circadiano em vários bebês de termo já nesta idade e em apenas um recém-nascido pré-termo. Por outro lado, o padrão de ingestão alimentar apresentava apenas componentes ultradianos, entre 2 e 4 horas, sugerindo um desenvolvimento independente da ritmicidade do CVS e do comportamento alimentar. Este resultado está de acordo com os estudos prévios de Löhr e Siegmund (32), nos quais o comportamento alimentar permanece com um padrão ultradiano, enquanto o CVS evolui em direção a um padrão circadiano nos primeiros meses de vida.

Embora o ciclo claro/escuro seja considerado o principal *zeitgeber* para os mamíferos, é possível que outros fatores ambientais exerçam um papel importante na sincronização da ritmicidade em recém-nascidos. A diversidade de hipóteses sobre a relação entre o comportamento alimentar e o CVS ainda está longe de ser esclarecida e se beneficiaria de mais estudos longitudinais. A interação social e rotinas de cuidados com os recém-nascidos são sinais ambientais potencialmente relevantes como demonstram alguns autores. Nishihara et al, em 2002, avaliaram o padrão de atividade/repouso de recém-nascidos de termo e de suas mães por meio da actimetria, encontrando ritmo circadiano precocemente, cuja potência aumentou entre a 3^a e a 12^a semanas de vida (44). Por outro lado, as mães apresentavam ritmo circadiano de menor amplitude na 3^a semana de vida dos seus bebês e a presença de

frequências ultradianas no seu comportamento de atividade/repouso, com uma forte sincronização entre os ritmos maternos e do recém-nascido.

Wulff e Siegmund monitoraram famílias ao longo do final da gestação e após o nascimento até a 15^a semana de vida, flagrando o surgimento de frequências ultradianas no comportamento de atividade/repouso materno no terceiro trimestre de gestação (44, 45). Além disso, algumas mulheres apresentavam prolongamento do período endógeno do ritmo circadiano durante a gestação e, após o nascimento, havia uma alta concordância no espectro de frequências entre a mãe e o bebê, sendo que em alguns destes já era detectado ritmo circadiano entre 3 e 14 dias de vida.

Embora o ciclo vigília/sono seja provavelmente o ritmo biológico mais frequentemente estudado em recém-nascidos, outras variáveis biológicas também têm sido caracterizadas quanto à presença de ritmicidade. Estudos em humanos e animais sugerem que o ritmo circadiano de temperatura surgiria mais precocemente que o ritmo de atividade/repouso, ao longo da ontogênese (30, 46). Mirmiran, em 1991, encontrou ritmo circadiano na temperatura retal de recém-nascidos pré-termo entre 26 e 32 semanas de idade gestacional (47). No estudo de Tenreiro et al. (48), bebês pré-termo de 24 a 29 semanas de idade gestacional, mantidos em unidades de cuidado neonatal com nutrição parenteral, bem como luz e temperatura constantes, foram monitorados desde as primeiras 24 horas de vida. Precocemente estes bebês apresentaram ritmos transitórios de frequência cardíaca e temperatura, maiores do que 24 horas, que sugeriam um ritmo endogenamente gerado, não sincronizado ao ambiente. Já Guilleminault (49), monitorando a temperatura retal, encontrou ritmo circadiano em bebês de termo apenas a partir da 6^a semana de vida.

A dificuldade de coleta longitudinal de dados de temperatura central tem sido uma limitação para o estudo do seu padrão rítmico. Embora a temperatura retal seja considerada o melhor parâmetro para estudos cronobiológicos, seus inconvenientes, como desconforto e tempo de coleta limitado, restringem seu uso em ambientes naturais e em estudos longitudinais, onde são necessárias longas séries temporais. Assim, o nosso laboratório tem proposto um novo método de coleta de temperatura em estudos cronobiológicos, utilizando um termistor com memória programável, o que permite a coleta de séries longas.

Davidson, em 2003, (50) propôs o uso do ibutton Thermochron® (Maxim Dallas, Dallas, Texas, EUA) para registro da temperatura central em animais e, em 2006, van Someren descreveu as características do aparelho, confirmando a acurácia do registro (51) A seguir, Areas (2006) avaliou seu uso em diferentes regiões cutâneas, identificando um ritmo circadiano robusto na temperatura do punho, com acrofase durante a fase noturna (52). Em

2008, Sarabia confirmou este padrão, descrevendo a curva de temperatura do punho como uma imagem especular da curva da temperatura retal, embora as modificações da temperatura do punho precedam àquelas da temperatura central em cerca de 1 hora (53).

O desenvolvimento de novos equipamentos, como actímetros e termistores, expande a possibilidade de estudos com séries temporais longas, permitindo melhor avaliação do processo de consolidação de um ritmo circadiano sincronizado em recém-nascidos e da sua relação com potenciais fatores ambientais de arrastamento e mascaramento.

Dentro deste contexto, o estudo de recém-nascidos pré-termo é particularmente interessante pelo fato destes bebês representarem um grupo de indivíduos expostos precocemente aos ciclos ambientais, em uma idade na qual teríamos um sistema de temporização imaturo. Por outro lado, as unidades de cuidado neonatal são consideradas ambientes pobres em ritmos de 24 horas (incubadoras com temperatura e iluminação relativamente constantes) e predomínio de ritmos na faixa ultradiana representados pelos horários de alimentação e de intervenção da equipe hospitalar.

O impacto da organização temporal do ambiente hospitalar sobre o desenvolvimento dos ritmos biológicos em recém-nascidos carece de estudos mais detalhados. Uma das primeiras demonstrações de interferência da manutenção de iluminação constante veio do estudo de Mann, em 1986, demonstrando que recém-nascidos pré-termo mantidos em berçários com alternância de claro/escuro apresentavam melhor ganho de peso que os bebês mantidos sob o sistema tradicional de luz constante (54). Em 2002, Brandon obteve o mesmo resultado comparando bebês mantidos em ciclo claro/escuro desde 32 semanas pós-concepcionais e bebês mantidos em penumbra até 36 semanas de idade (55). Enquanto alguns autores demonstram uma sincronização mais precoce em recém-nascidos mantidos em unidades neonatais com ciclo de claro/escuro, outros não encontram esta relação (56).

Além da questão da iluminação, o padrão de alimentação e intervenções deve ser levado em consideração. Glotzbach (57) constatou o predomínio de ritmos ultradianos na temperatura cutânea e retal, frequência cardíaca e atividade em recém-nascidos pré-termo, as quais eram compatíveis com os horários de alimentação e intervenções relacionadas, contrastando com seu estudo prévio em recém-nascidos de termo, nos quais foi possível identificar ritmo circadiano para as mesmas variáveis no primeiro mês de vida (58).

Em estudo prévio realizado no nosso laboratório com recém-nascidos pré-termo mantidos no berçário nas duas primeiras semanas de vida, encontramos um ritmo de sono/vigília com período de 3hs predominante, compatível com os horários de aleitamento do berçário. Entretanto, a análise dos despertares induzidos e espontâneos mostrou a presença

deste mesmo ritmo para os despertares induzidos e não para os despertares espontâneos, sugerindo um possível efeito mascarador da alimentação realizada de forma regular (59).

Enquanto os autores (29,31,32) indicam um aumento progressivo da contribuição relativa do componente circadiano no contexto da ritmicidade total do CVS, acompanhada por uma queda das frequências ultradianas, o comportamento alimentar permanece com um predomínio do período de 3hs, de modo que até o momento não foi possível demonstrar uma influência sincronizadora do comportamento alimentar sobre o CVS nas primeiras semanas de vida.

O desenvolvimento do padrão de sono/vigília de prematuros comparado ao de recém-nascidos de termo também é motivo de controvérsia entre os autores. Alguns pesquisadores defendem que a ritmicidade de determinados parâmetros de sono emerge em idades pós-concepcionais semelhantes em bebês de termo e pré-termo (60). Os prematuros tenderiam a passar mais tempo dormindo no primeiro mês de vida em relação aos recém-nascidos de termo, porém, ao aproximar-se de 37 semanas pós-concepcionais, seu padrão temporal de sono começaria a assemelhar-se ao de bebês de termo (61). Isto daria suporte à idéia segundo a qual ainda seria necessário um amadurecimento dos NSQs e de suas vias aferentes e eferentes durante a vida pós-natal para que o sistema de temporização infantil pudesse expressar ritmos endógenos passíveis de serem sincronizados por ciclos ambientais .

Por outro lado, MacMillen demonstrou em seu trabalho que, uma vez expostos ao ciclo claro/escuro ambiental e aos cuidados de uma única pessoa, um grupo de bebês pré-termo demorava um tempo similar ao de bebês de termo expostos às mesmas condições para apresentar um ritmo circadiano sincronizado do CVS (62). Comparando a idade pós-concepcional de início do ritmo circadiano entre bebês pré-termo e de termo, os primeiros exibiam um ritmo de 24 horas bem mais precocemente que as crianças de termo.

Além da controvérsia a respeito do impacto imediato do ambiente hospitalar sobre a manifestação da ritmicidade biológica, também é possível que diferentes padrões de iluminação no início da vida possam moldar determinadas características do comportamento de sono, que persistiriam futuramente como uma estampagem (“imprinting”). Assim sugerem os estudos previamente descritos (25, 26, 27), que demonstram que roedores, uma vez mantidos sob iluminação constante durante a lactação, desenvolvem e mantêm um ritmo circadiano em condições que habitualmente provocam perda da ritmicidade na espécie. Em humanos, levantamentos epidemiológicos de matutinidadade/vespertinidade encontram um claro desvio da curva em direção à matutinidadade em populações de adolescentes e adultos jovens nascidos pré-termo e mantidos sob luminosidade constante durante a vida neonatal (63, 64).

As evidências de impacto imediato das condições cíclicas ambientais no desenvolvimento da organização temporal de recém-nascidos, com a perspectiva de efeitos de longo prazo modificando funcionalmente o sistema de temporização endógeno, colocam o estudo da ritmicidade de neonatos mantidos em unidades de cuidado neonatal como uma questão científica e clinicamente relevante. Com os novos métodos de monitoramento de atividade e temperatura acreditamos que novas informações possam ser agregadas ao conhecimento atual sobre o assunto. Por outro lado, estudos invasivos em recém-nascidos são eticamente controversos, demandando, portanto, a utilização de outros modelos animais para melhor esclarecimento dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento dos ritmos biológicos. Considerando que recém-nascidos ainda são mantidos sob iluminação constante em várias unidades de cuidado neonatal brasileiras e as evidências provenientes de estudos em ratos de que a luz constante durante a lactação destes animais levaria a modificações permanentes na expressão dos ritmos biológicos, a utilização do paradigma de LL durante a lactação em ratos neonatos emerge como um modelo interessante a ser possivelmente relacionado com a evolução de recém-nascidos humanos.

1.2 OBJETIVOS

Objetivo geral

- Estudar a evolução da ritmicidade circadiana na fase neonatal e sua relação com fatores ambientais que poderiam interferir na expressão destes ritmos, utilizando para tanto protocolos de estudo longitudinal com neonatos humanos e ratos.

Objetivos específicos em humanos

- Analisar a evolução dos ciclos vigília/sono, atividade/repouso e temperatura em bebês de termo e pré-termo durante sua permanência no berçário e, posteriormente, sua adaptação ao ambiente domiciliar e evolução até os 6 meses de idade corrigida.
- Procurar identificar fatores intra-hospitalares capazes de influenciar a ritmicidade na fase neonatal, com enfoque particular na alimentação, iluminação e temperatura e avaliar a resposta da expressão rítmica à modificação da ação destes fatores após a alta hospitalar.

- Identificar diferenças e semelhanças na resposta de recém-nascidos de termo e pré-termo aos fatores discriminados acima. Assim, procuramos determinar a influência de possíveis sincronizadores ou fatores de mascaramento ambiental sobre um sistema nervoso em diferentes estágios de amadurecimento.

Objetivos específicos em roedores

- Caracterizar o desenvolvimento da ritmicidade em outros parâmetros biológicos (temperatura) além da atividade motora, em animais submetidos ao claro constante durante a lactação.
- Identificar se intervenções realizadas durante a lactação e na fase de desmame, como exposição à melatonina *ad libitum* e exercício físico, em animais mantidos sob luz constante, poderiam alterar o desenvolvimento do ritmo de atividade locomotora dos mesmos.

Os experimentos em modelo animal (roedores) foram realizados pela pesquisadora no laboratório dos professores Antoni Díez-Noguera e Trinitat Cambras, no Departamento de Fisiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Barcelona, Espanha, em parceria com os mesmos.

2 ESTUDO DOS RITMOS BIOLÓGICOS EM RECÉM-NASCIDOS HUMANOS

2.1 CASUÍSTICA E MÉTODOS

O projeto foi submetido à avaliação de seus aspectos éticos, tendo sido aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa dos seguintes setores: Instituto de Ciências Biomédicas – USP e Hospital Universitário e foram incluídas apenas as crianças cujos responsáveis assinaram o termo de consentimento informado (anexo A).

Foram estudados 7 recém-nascidos de termo (RNT) e 19 recém-nascidos pré-termo (RNPT) admitidos no berçário e UTI neonatal do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (USP) no período de março de 2006 a outubro de 2008.

Os critérios de inclusão para os RNTs foram: idade gestacional superior a 37 semanas e permanência de pelo menos 5 dias no berçário e/ou UTI neonatal e os RNPTs foram incluídos quando apresentassem idade gestacional entre 28 e 36 semanas. Além disso, todas as crianças deveriam ter valor de Apgar de 5^o minuto maior ou igual a 7, sem história compatível com hipoglicemia sintomática ou evidência de doença neurológica e sem sedação contínua no momento do estudo.

Todos os recém-nascidos pré-termo apresentavam exame neurológico adequado para a idade pós-concepcional e não tiveram qualquer intercorrência neurológica durante o tempo do estudo. Como exames complementares, foram realizados: ultrassonografia de crânio, exame do líquido cefalorraquidiano, eletroencefalografia e potencial evocado auditivo e visual, todos normais.

O quadro a seguir mostra os dados de cada sujeito quanto ao sexo, à idade gestacional, tipo de parto, peso ao nascimento, Apgar, início da coleta em dias de vida e em idade pós-concepcional, tempo de permanência na UTI e no berçário, número de dias coletados durante a etapa intra-hospitalar e idade pós-concepcional no momento da alta hospitalar. Os recém-nascidos pré-termo foram divididos em 4 grupos de acordo com a idade gestacional (IG) ao nascimento (representados em escalas de cinza na tabela abaixo), sendo GI: 28 a 29 semanas e 6 dias; GII: 30 a 31 semanas e 6 dias; GIII: 32 a 33 semanas e 6 dias; GIV: 34 a 35 semanas e 6 dias.

Quadro 1: ID: identificação do sujeito; IG: idade gestacional ao nascimento; NL: parto normal, CS: cesárea; PN: peso ao nascimento; RNT: recém-nascido de termo; IC: idade pós-concepcional; T: transferência.

ID	Sexo	IG em semanas	Parto	PN (gramas)	Apgar 5 ^o min	Dias de vida início da coleta	IC no início da coleta (em semanas)	Dias na UTI/berçário	N ^o dias de coleta	IC na alta (em semanas)
BRU	Fem	39 3/7	NL	3450	10	4	RNT	Não / 13	9	RNT
LAR	Fem	37 6/7	NL	1735	9	3	RNT	Não/ 11	11	RNT
GIO	Fem	42 2/7	CS	3275	10	3	RNT	Não/16	13	RNT
GUT	Masc	38 3/7	NL	3920	9	2	RNT	Não/7	5	RNT
PED	Masc	38 6/7	CS	3215	9	2	RNT	Não/11	9	RNT
KAY	Masc	41 1/7	CS	2670	9	1	RNT	6 / 7	12	RNT
FER	Fem	39	CS	3460	9	7	RNT	30 / 7	30	RNT (T)
RLU	Masc	34 2/7	NL	2705	9	2	34 4/7	Não/ 15	14	36 4/7
CAU	Masc	35 5/7	CS	2460	10	0	35 5/7	Não/11	11	37 1/7
GUS	Masc	34	NL	2210	9	2	34 1/7	Não/7	6	34 6/7
WAL	Masc	35 2/7	NL	2345	8	0	35 2/7	Não/11	11	36 5/7
ERJ	Masc	35 6/7	CS	2370	9	1	36	Não/6	5	36 5/7
KAI	Masc	32 3/7	NL	1310	9	2	32 5/7	16 / 28	42	38 4/7
BRY	Masc	33 6/7	NL	2012	9	0	33 6/7	Não/7	7	34 5/7
CADU	Masc	32 6/7	CS	1625	7	2	33	9/42	50	40 1/7
MED	Fem	32 1/7	CS	1290	7	9	33 2/7	51 / 3	45	39 6/7 (T)
LED	Masc	32 5/7	CS	1835	8	2	33	6 / 13	14	35 3/7
VIT	Fem	30	NL	1235	9	6	30 5/7	11 / 46	51	38
PAH	Masc	31 5/7	NL	1830	9	2	32	12 / 49	59	40 4/7
MAT	Masc	31 2/7	NL	1575	9	3	31 5/7	4 / 25	26	35 5/7
VTH	Masc	30 3/7	NL	1330	7	4	31	40 / 7	36	37
HEL	Fem	28 3/7	CS	1110	9	9	29 2/7	21 / 80	92	42 3/7
PED	Masc	28	NL	920	8	9	29 2/7	40 / 50	81	406/7
GAB	Masc	29 6/7	NL	1115	9	4	30 3/7	32 / 53	81	42 1/7
ERK	Masc	29 5/7	NL	1415	9	6	30 4/7	14 / 63	71	40 5/7
GCA	Fem	28 4/7	CS	1465	9	2	28 6/7	13 / 53	63	38

Grupos

	RNT
	GI
	GII
	GIII
	GIV

Os bebês participantes foram acompanhados durante sua permanência no berçário e UTI neonatal, cujas condições ambientais são descritas a seguir, e nesta etapa foram registrados dados sobre episódios de sono, alimentação e procedimentos, de forma contínua (formato de diários), atividade/repouso e temperatura.

2.1.1 Coleta de dados na fase hospitalar

Todos os recém-nascidos foram mantidos no berçário e/ou UTI neonatal, de acordo com a gravidade do seu estado clínico no momento. A rotina hospitalar não foi alterada em função do nosso estudo.

O berçário do Hospital Universitário é composto por 6 salas para atendimento de neonatos de risco, onde encontra-se um número variável de berços e/ou incubadoras, dependendo da demanda. As salas são iluminadas por lâmpadas fluorescentes que permanecem acesas durante as 24 horas e possuem janelas, as quais permitem a entrada de luz externa. A intensidade de luz que chega a cada bebê pode variar de acordo com a sua distância da janela. A UTI é composta por uma única sala, iluminada por lâmpadas fluorescentes durante as 24 horas, e possui janelas obscurecidas por filme (insulfim).

As incubadoras são cobertas por um lençol branco que reveste até a metade da altura do vidro da incubadora, na região do segmento cefálico do bebê. Para os bebês que estão em berço aquecido ou berço comum não há proteção ocular específica.

Os horários de alimentação são fixos, mais freqüentemente a cada 3 horas, mas em algumas semanas foram utilizados intervalos de 2 horas, devido às condições clínicas da criança. As intervenções da enfermagem concentram-se nestes horários. O modo de oferta da dieta esteve vinculado à condição clínica do paciente e habitualmente o tipo de leite oferecido modifica-se ao longo do dia de acordo com sua disponibilidade.

2.1.1.1 Diários

Os diários de sono, alimentação e procedimentos foram preenchidos pela equipe de enfermagem, previamente treinada e supervisionada pela pesquisadora responsável. Nesta planilha (anexo B) foram anotados os horários de sono e vigília dos bebês e se os despertares foram induzidos ou espontâneos. Também foram anotados os horários de intervenção da equipe hospitalar e os horários e tipo de alimentação (sonda, mamadeira ou seio materno). Os horários dos procedimentos dolorosos (descritos pela Academia Americana de Pediatria) e eventuais medicamentos analgésicos utilizados também foram registrados na planilha correspondente, bem como qualquer outra intercorrência.

2.1.1.2 Atividade/repouso

A coleta dos dados de atividade/repouso foi realizada continuamente durante a internação com o actímetro Micro-Mini-Motionlogger® – Ambulatory Monitoring Inc (Ardsley, Nova York, EUA), aparelhos que permitem a coleta de dados de aceleração de movimento a cada minuto, fixado no tornozelo do paciente com gaze e Micropore® - 3M (Sumaré, São Paulo, Brasil).

2.1.1.3 Temperatura

A temperatura foi coletada continuamente através de um termistor Thermochron® – Maxim Dallas (Dallas, Texas, EUA), que armazena os dados em janelas temporais pré-determinadas de 10 minutos e que foi fixado no punho esquerdo das crianças com Micropore-3M®. Paralelamente, a temperatura da incubadora foi registrada com um termistor colocado na face interna do teto da mesma, com medidas a cada 10 minutos e, também, através do sensor acoplado à própria incubadora e cujo registro de temperatura foi anotado a cada 4 horas, segundo rotina da enfermagem. Para os bebês que estavam em berço comum, o termistor foi colocado na parede, acima do berço, de modo a medir a temperatura ambiente.

De modo a verificar a confiabilidade da medida da temperatura ambiente realizada pelo termistor, realizamos um teste com 3 incubadoras desocupadas, nas quais a temperatura foi medida por três termistores (1 afixado à face interna do teto da incubadora, 1 pendurado no centro da mesma e um 3^o na face externa do teto da incubadora). A temperatura foi medida a cada 10 minutos por 3 horas consecutivas e a temperatura medida pelo sistema de controle do ar da incubadora foi registrada igualmente a cada 10 minutos. Outros três testes foram realizados da mesma forma, porém agora com bebês dentro da incubadora.

2.1.1.4 Luminosidade

A intensidade luminosa do ambiente (luz incidente) foi aferida para 5 sujeitos (2 RNTs, 1 RNPT do grupo I e 2 RNPTs do grupo IV) por meio de aparelho de fabricação nacional, idealizado no nosso laboratório e denominado Tempatilumi, que possui funções de actímetro, termistor e luxímetro e armazena dados de intensidade luminosa a cada 1 minuto, segundo programação prévia. O Tempatilumi□ foi afixado à parede do berçário e UTI neonatal, no nível dos olhos dos bebês. Durante a coleta, 3 recém-nascidos permaneceram inicialmente em incubadora e a seguir em berço comum e um recém-nascido permaneceu durante todo o tempo de coleta em berço comum.

2.1.2 Coleta de dados na fase domiciliar

Após a alta, todas as crianças que integraram a etapa hospitalar do estudo foram reavaliadas ao longo do primeiro ano de vida quanto ao seu desenvolvimento neurológico e pediátrico. Entre estas, 6 crianças foram acompanhadas ambulatorialmente (sendo uma de cada grupo etário, exceto GIII, o qual teve 2 bebês nesta etapa), com reavaliações mensais e visitas domiciliares, participando da etapa domiciliar do trabalho. Outros 4 bebês tiveram seus dados de sono/vigília, alimentação, atividade/repouso ou temperatura coletados apenas no primeiro mês após a alta hospitalar. O quadro a seguir ilustra o tempo de coleta de cada sujeito.

Quadro 2: Tempo de coleta de cada sujeito. A idade está representada na primeira linha em semanas pós-concepcionais até 42 semanas. A partir de então, está representada em meses de vida. Legenda abaixo

Idade corrigida																							
Sujeitos	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	1m	2m	3m	4m	5m	6m	8m	10m	12m
BRU												A											
LAR											A												
GIO																A							
GUT											A												
PED												A											
KAY															A								
FER																A							
RLU								A															
CAU									A														
GUS							A																
WAL								A															
ERJ									A														
KAI										A													
BRY						A																	
CADU												A											
MED													A										
LED							A																
VIT										A													
PAH												A											
MAT							A																
VTH									A														
HEL														A									
PDH												A											
GAB														A									
ERK												A											
GCA											A

Recém-nascidos de termo

Recém-nascidos pré-termo

Momento da alta hospitalar

A não participação de todos os sujeitos na etapa domiciliar, bem como a interrupção no primeiro mês, deve-se à desistência por parte dos responsáveis.

Durante a etapa domiciliar, a mãe foi orientada a preencher os diários de sono e alimentação (anexo C) de forma contínua durante 15 dias no mês. Intercorrências com o bebê, como doenças, internações e viagens, também foram anotadas. Foram anotados, ainda, se os despertares foram espontâneos ou induzidos e os horários de dormir dos pais e local onde a criança dorme. Nesta etapa também monitoramos a atividade/repouso por meio de actimetria, bem como foi realizado o controle da temperatura do punho com uso do termistor. A coleta desses dados foi realizada durante 15 dias a cada mês até os 6 meses de idade corrigida.

No domicílio as mães estiveram livres para escolher as rotinas de alimentação e atividades e todas optaram pelo sistema de aleitamento de livre demanda. Da mesma forma, o local de dormir da criança, o padrão de iluminação e rotina de atividades permaneceu aquele estipulado pela família.

2.2 ANÁLISE

Os bebês foram agrupados quanto a sua condição de pré-termo e de termo, sendo a análise dos dados realizada de forma separada para cada um dos grupos previamente mencionados e posteriormente comparada entre os mesmos.

A divisão das séries temporais dos RNPTs foi realizada utilizando-se a idade pós-concepcional (ou também denominada idade gestacional corrigida - IGC) dos recém-nascidos em semanas até 40 semanas completas (quando atingem o termo) e, a partir de então, em meses. Assim, as séries temporais utilizadas para a análise de cada parâmetro são compostas por 7 dias, correspondendo à semana pós-concepcional do recém-nascido e semanas de 5 ou 6 dias foram utilizadas quando houve perda de dados. A análise rítmica para cada variável encontra-se detalhada na sequência.

2.2.1 Análise da temperatura

Inicialmente foram construídas curvas com os dados brutos da temperatura obtida através do termistor e, a seguir, construímos plexogramas com períodos de 24 horas com estes dados. Com isto, pretendemos fazer uma inspeção visual, com o intuito de verificar se havia concentração de valores díspares em horários específicos. Os dados espúrios foram definidos

como aqueles que estavam fora da faixa de dois desvios padrão da média. Estes dados foram retirados e substituídos pela temperatura média do horário calculada com os demais valores.

Para comparação entre os diferentes métodos de coleta da temperatura ambiente (experimentos utilizando 3 termistores em incubadoras desocupadas ou com bebês), utilizamos o método de correlação de Pearson.

Os dados de temperatura do punho dos recém-nascidos foram analisados individualmente pelo método do Cosinor (31), que atribui curvas coseno de frequência próxima às 24hs à série de dados, aqui utilizado com o objetivo de identificar a acrofase das séries temporais. Estes dados também foram submetidos ao programa El Temps para análise de séries temporais, no qual são construídos termogramas e a seguir aplicados algoritmos (periodograma de Lomb Scargle) para avaliação do espectro de frequências (65). No periodograma, o eixo X representa o período em minutos dos diferentes ritmos e P (eixo Y) refere-se à contribuição relativa de cada frequência no contexto da ritmicidade global encontrada no parâmetro estudado. Também realizamos a análise espectral, que atribui curvas seno e coseno de diferentes períodos a cada série, fornecendo dados quanto à potência espectral de cada um desses componentes rítmicos.

Realizamos, ainda, análise por meio da matriz espectral seriada, a qual calcula a potência espectral dos primeiros 20 harmônicos diariamente, mostrando a evolução do espectro de frequências ao longo dos dias. Calculamos a média da potência diária dos primeiros 14 harmônicos, pareados segundo a idade pós-concepcional para cada um dos grupos etários mencionados (GI, GII, GIII, GIV e GV).

A seguir, selecionamos séries temporais de 10 a 15 dias consecutivos de 13 RNPTs entre 34 e 36 semanas de idade corrigida e 4 RNTs, durante a internação hospitalar, para comparação dos resultados obtidos por meio dos diferentes parâmetros de temperatura. Selecionamos este intervalo de idade por ser um momento em que a maioria dos bebês já apresentava um ritmo estabelecido. Comparamos para cada sujeito a temperatura do punho (TP), temperatura axilar (TX), temperatura ambiente (TA) (da incubadora e da sala medidas pelo termistor) e temperatura medida pelo sistema de controle do ar da incubadora (SCI), utilizando o método de correlação de Pearson. Realizamos também a análise do padrão rítmico de TP, TX, TA e SCI, por meio do método do Cosinor do programa El Temps, para definição das acrofases, e análise do espectro de frequências por meio do periodograma de Lomb Scargle para TP e TA. Comparamos os resultados de período entre TP e TA, bem como de potência, por meio do método de Wilcoxon para amostras pareadas, e os resultados da acrofase foram comparados pelo teste de Rayleigh, o qual define a presença de uma tendência

estatisticamente significativa de agrupamento destas acrofases em uma determinada faixa de horário.

2.2.2 Análise da atividade/repouso

Os dados do actímetro coletados a cada 1 minuto foram agrupados em blocos de 10 minutos, divididos em séries temporais de 5 a 7 dias, sendo excluídos os valores correspondentes aos horários em que o aparelho foi retirado do bebê, segundo as anotações da enfermagem e da mãe.

Devido à possível interferência do frequente manuseio do recém-nascido pela equipe de enfermagem, não utilizamos, inicialmente, o algoritmo para definição de sono e vigília a partir dos dados da actimetria. Os valores absolutos foram utilizados na construção das séries temporais e submetidos à análise espectral através do método do Lomb Scargle e utilizados para a construção de actogramas.

Também foi realizada análise por meio da matriz espectral seriada, calculando a potência diária dos primeiros 20 harmônicos e, a seguir, determinamos a média das potências calculadas dos primeiros 14 harmônicos, pareadas segundo a idade pós-concepcional, para cada um dos grupos etários.

A seguir, selecionamos séries temporais de 10 a 15 dias consecutivos de 12 RNPTs entre 34 e 36 semanas de idade corrigida e 3 RNTs, durante a internação hospitalar, para comparação dos períodos e acrofases do ritmo circadiano, esta última pelo teste de Rayleigh. Selecionamos este intervalo de idade por ser um momento em que a maioria dos bebês já apresentava um ritmo estabelecido.

2.2.3 Análise do ciclo vigília/sono

Os dados de vigília/sono obtidos através do diário foram divididos em intervalos de 10 minutos, agrupados em séries temporais de 5 a 7 dias, correspondentes à idade pós-concepcional. Para cada intervalo foi atribuído um valor arbitrário 5 ou 1 para sono e vigília, respectivamente.

Os dados faltantes foram completados de acordo com o comportamento mais frequente no horário; se o mesmo tiver excedido a 6 horas contínuas sem coleta, este horário foi excluído e a série temporal, recortada de modo a colar-se o horário correspondente do próximo dia em que houve coleta, desde que esta distância não exceda a dois dias. Isto é

possível devido à grande regularidade das rotinas na unidade de cuidado neonatal. Os dados do diário de sono também foram comparados aos dados obtidos por meio da actimetria.

Estes dados foram submetidos ao programa El Temps para análise de séries temporais, no qual são construídos actogramas e a seguir aplicados algoritmos (periodograma de Lomb Scargle) para identificação do espectro de frequências presente nas séries temporais.

Também analisamos o padrão temporal dos despertares, os quais foram divididos em despertares induzidos e espontâneos, analisados em séries distintas. As séries foram agrupadas em sequências de 7 dias consecutivos, de acordo com a idade pós-concepcional, e divididas em intervalos de 10 minutos aos quais foram atribuídos valores arbitrários do seguinte modo: 5 para despertares induzidos, 1 para ausência de despertares induzidos e, para análise dos despertares espontâneos, os intervalos receberam um valor 9 para despertares espontâneos e 1 para ausência de despertares espontâneos. Estas séries também foram submetidas ao periodograma de Lomb Scargle.

2.2.4 Análise do ciclo de alimentação

Os dados de alimentação/jejum obtidos por meio do diário foram divididos em intervalos de 10 minutos, agrupados em séries temporais de 5 a 7 dias, correspondentes à idade pós-concepcional. Para cada intervalo foi atribuído um valor 5 ou 1 para alimentação e jejum, respectivamente. A exclusão dos dados faltantes foi realizada da mesma forma que para os dados de sono/vigília. Estas séries temporais foram submetidas ao periodograma de Lomb Scargle, da mesma forma que as séries desenvolvidas para o CVS.

2.2.5 Análise dos horários de procedimento

Os dados de manuseio foram divididos em intervalos de 10 minutos, agrupados em séries temporais de 5 a 7 dias, da mesma forma que os parâmetros anteriores. Foi atribuído um valor 5 ao intervalo na presença de manuseio do recém-nascido e na ausência de manuseio foi atribuído um valor 1. A exclusão dos dados faltantes foi realizada da mesma forma que para os dados do CVS. Estas séries também foram submetidas à análise com o periodograma de Lomb Scargle, da mesma forma que as anteriores.

Os dados de sono/vigília, alimentação e manuseio foram comparados de modo a definir relações de mascaramento e/ou arrastamento.

2.2.6 Análise da iluminação ambiente

Os dados coletados pelo Tempatilumi foram divididos em intervalos de 10 minutos e agrupados em séries temporais de 7 dias, de acordo com as semanas pós-concepcionais do recém-nascido, e analisados pelo periodograma de Lomb Scargle para determinação do espectro de frequências e pelo método Cosinor para identificação das acrofases.

2.2.7 Comparação entre grupos

Correlacionamos a idade gestacional corrigida e a idade pós-natal com os resultados do valor de P e do período do ritmo circadiano de atividade/repouso e temperatura, obtidos pelo método do Lomb Scargle. Utilizamos para tanto o método de correlação de Spearman, de modo a verificar modificações nos parâmetros mencionados de acordo com o aumento da idade pós-concepcional e/ou da idade pós-natal. Esta correlação foi realizada para cada grupo e para o conjunto de sujeitos.

Comparamos os recém-nascidos pré-termo entre 29 e 31 semanas de idade pós-concepcional e ao atingirem 39 a 41 semanas de idade corrigida (próxima ao termo), utilizando o método de Mann Whitney, em que a variável independente foi a idade e as variáveis dependentes foram a potência e período do ritmo circadiano de atividade/repouso e da temperatura. Também utilizamos como variáveis independentes no teste de Mann Whitney os 5 grupos etários pré-definidos e o grupo de recém-nascidos pré-termo ao atingirem idade gestacional próxima do termo (39 a 41 semanas) comparativamente ao grupo de recém-nascidos de termo. As variáveis dependentes foram a potência e o período do ritmo circadiano de atividade/repouso e da temperatura.

Realizamos, ainda, análise a comparativa da potência do ritmo circadiano da temperatura e da atividade/repouso, bem como comparação entre os períodos destes dois ritmos.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Temperatura

Os valores de temperatura da incubadora desocupada foram semelhantes quando medidos pelo sistema de controle do ar da incubadora (SCI) e quando medidos pelos nossos termistores, independentemente da posição (afixado à face interna do teto, pendurado no

centro ou na face externa da incubadora). Entretanto, quando o bebê estava dentro da incubadora, a temperatura medida pelos nossos termistores revelou-se significativamente mais variável que a medida pelo SCI (figuras 1 e 2), revelando uma influência significativa da perda de calor do bebê sobre a temperatura ambiente. Consideramos que a temperatura resultante do ar que entra na incubadora e da irradiação de calor do bebê corresponde à temperatura ambiente real a qual o recém-nascido está exposto e, portanto, utilizamos os dados coletados com o termistor afixado na face interna do teto da incubadora para compor as séries temporais de TA.

Figura 1: Representa os valores de temperatura medidos com termistores em diferentes posições na incubadora desocupada e pelo sistema de controle de ar da própria incubadora.

Comparando os quatro parâmetros (temperatura do punho-TP, temperatura axilar-TX, temperatura ambiente-TA e SCI), observamos que TP apresenta valores inferiores ($34,60 \pm 0,7$ °C) a TX ($36,58 \pm 0,09$ °C) e superiores a TA ($28,65 \pm 1,75$ °C), para recém-nascidos dentro e fora da incubadora ($p < 0,05$). TP também exibe um padrão mais variável que TX (figura 2). Conforme esperado, a temperatura ambiente é inferior quando os bebês são transferidos para berço comum e TP sofre uma queda em média de $1,7 \pm 0,9$ °C e torna-se mais variável, enquanto TX não apresenta mudanças significativas na sua linha de base.

Figura 2: Representa a evolução dos valores de temperatura para cada um dos parâmetros avaliados (TX, TP, TA e SCI). A seta vermelha indica o momento em que o bebê foi transferido da incubadora para berço comum.

Encontramos correlação positiva entre TP e TX para 8 de 10 RNPTs, porém para nenhum dos RNTs. Esta correlação é observada principalmente quando os sujeitos estão dentro da incubadora e para apenas 2 de 5 RNPTs em berço comum. Também encontramos uma correlação positiva entre TP e TA para a maioria dos RNPTs dentro da incubadora, porém não fora dela. Por outro lado, correlação entre a TX e TA só foi encontrada para 3 RNPTs. Também não encontramos correlação significativa entre TA e SCI para nenhum dos sujeitos, dentro da incubadora.

Na análise do padrão rítmico, estudamos toda a série temporal da temperatura do punho dos sujeitos, individualmente, durante o seu tempo de permanência na unidade de cuidado neonatal. Por meio deste estudo longitudinal, observamos a presença de predomínio do ritmo circadiano para a temperatura do punho desde o início da coleta de dados para a maioria dos RNPTs (figura 3) e dos RNTs (figura 4), seguidos por ritmo com período de 12 horas. Nas figuras a seguir representamos o termograma de toda a série coletada, a matriz espectral de toda a série para os primeiros 20 harmônicos, a análise espectral de cada semana de idade pós-concepcional, bem como o periodograma de Lomb Scargle semanal. Na matriz espectral cada linha corresponde a um dia e cada coluna corresponde a um harmônico, sendo o primeiro harmônico de 24 horas. A cor amarela indica o componente de maior potência espectral.

Ao avaliar a evolução ao longo da sequência de semanas em idade corrigida, observamos oscilações quanto à potência e ao período do ritmo circadiano observado e a frequente presença de dois períodos circadianos distintos na mesma série temporal.

Figura 3: Resultados referentes à TP de um RNPT. Da esquerda para a direita, os gráficos correspondem ao 1- termograma, 2- matriz espectral, com a potência diária dos primeiros 20 harmônicos, 3- análise espectral dos primeiros 20 harmônicos, 4- periodograma de Lomb Scargle. Na última coluna, a idade em semanas pós-concepcionais.

Figura 4: Resultados referentes à TP de um RNT. Da esquerda para a direita, os gráficos correspondem ao 1- termograma, 2- matriz espectral, com a potência diária dos primeiros 20 harmônicos, 3- análise espectral dos primeiros 20 harmônicos, 4- periodograma de Lomb Scargle. Na última coluna, a idade em semanas pós-concepcionais.

Ao reunirmos os recém-nascidos de acordo com os grupos previamente definidos e elaborar médias das matrizes espectrais (figura 5), observamos que a presença de ritmo circadiano predominante desde o início das séries é uniforme para todos os grupos, assim como o padrão de progressão e regressão da sua potência espectral.

Figura 5: Representa as médias dos resultados das matrizes espectrais, com valores diários de potência, para os 5 grupos (GI: 28 a 29 6/7; GII: 30 a 31 6/7; GIII: 32 a 33 6/7; GIV: 34 a 35 6/7; GV: RNT).

Ao comparar o padrão rítmico entre os RNTs e RNPTs entre 34 e 36 semanas de idade corrigida, encontramos predomínio do ritmo circadiano de TP para todos os bebês, exceto um RNT. Por outro lado, apenas 50% dos recém-nascidos pré-termo exibiam um ritmo circadiano na temperatura axilar e nenhum dos bebês de termo. Também observamos que a temperatura da incubadora, medida pelo nosso termistor, demonstrou a presença de ritmo de cerca de 24 horas em 78% dos casos, embora a SCI evidenciasse uma temperatura do ar de entrada bastante estável. O período deste ritmo é próximo de 24 hs para a maioria dos sujeitos.

O período da TP, por outro lado, é bastante variável entre 34 e 36 semanas (de 1250 a 1640 minutos) e, além disso, alguns sujeitos exibem mais de um pico dentro da faixa circadiana (quadro 3). O teste de Wilcoxon para amostras pareadas não evidenciou relação significativa entre os períodos ou entre as potências calculadas pelo periodograma de Lomb Scargle para os resultados de TP e TA.

Quadro 3: Representa os períodos de TP e de TA entre 34 e 36 semanas de idade corrigida. Os últimos quatro sujeitos são recém-nascidos de termo. NS: não significativo.

<i>Sujeito</i>	<i>TP período</i> (min)	<i>TA período</i> (min)
EK	1560	1520
KI	1440	1430
RL	1410 / 1590	1440
GB	1350 / 1590	1440
HL	1440	1440
PD	1440	1250
MT	1330	1640
ME	1250	1440
CD	1460	1490
VH	1430	1430
WL	1280	1480
CA	1330 / 1500	NS
KY	1520	1470
LR	1460 / 1640	1570
GI	NS	1440
FE	1460	NS

A acrofase da temperatura do punho tende a ocorrer entre 19h00min e 5h00min para 70% dos sujeitos e o teste de Rayleigh mostra uma tendência de agrupamento significativa das acrofases entre 22h30min e 1h30min (figura 6). Já a acrofase de TA tende a ocorrer ao longo do dia, entre 8h00min e 19h00min, com uma tendência de agrupamento significativa por volta das 15h00min. A temperatura axilar não exibe tendência de agrupamento no teste de Rayleigh, porém só encontramos ritmo circadiano significativo na análise do Cosinor para 6 de 17 sujeitos para TX entre 34 e 36 semanas. À inspeção visual observamos que a acrofase de TX tende a ocorrer cerca de 2 horas após a acrofase de TP e, igualmente, durante a noite.

Figura 6: Resultados dos testes de Rayleigh para a temperatura do punho, ambiente e axilar, mostrando a tendência de agrupamento para as 2 primeiras variáveis. O círculo central representa a elipse de confiança e a seta aponta para o intervalo em que as acrofases tendem a se agrupar.

Sete sujeitos foram transferidos para berço comum nesta etapa e a análise do ritmo circadiano mostra que este tende a aproximar-se de 24 horas para 4 bebês, bem como apresenta aumento da sua potência. Para um sujeito, que não exibia ritmo circadiano até então, este surge após a transferência para o berço. Os outros 2 bebês permaneceram em berço aquecido por alguns dias após a saída da incubadora, o que pode ter influenciado a expressão da ritmicidade circadiana.

Não encontramos correlação significativa pelo teste de Spearman entre o aumento da idade pós-concepcional ou da idade pós-natal e a potência ou o período do ritmo circadiano semanal da temperatura obtidos pelo periodograma de Lomb Scargle para os recém-nascidos pré-termo individualmente, em conjunto ou divididos por grupos. O período do ritmo circadiano é significativamente mais longo para o grupo de recém-nascidos de termo comparativamente aos demais grupos e em relação aos recém-nascidos pré-termo quando estes encontravam-se em idade pós-concepcional próxima do termo (figura 7).

Figura 7: comparação do período do ritmo circadiano entre o grupo de recém-nascidos de termo (RNT) e recém-nascidos pré-termo ao atingirem idade pós-concepcional próxima do termo (entre 39 e 41 semanas).

2.3.2 Atividade motora

Estudamos longitudinalmente o padrão temporal da atividade motora, medida pela actimetria, de cada sujeito individualmente, durante o seu tempo de permanência na unidade de cuidado neonatal. Deste modo, observamos o predomínio de um padrão ultradiano nas primeiras semanas de vida dos recém-nascidos pré-termo (figura 8). A idade de início de um padrão circadiano mais estável é variável, porém ocorre mais frequentemente entre 35 e 37 semanas de idade corrigida (11 de 17 sujeitos). Para 2 bebês encontramos um ritmo circadiano a partir de 33 semanas de idade corrigida e para outros 2, entre 30 e 31 semanas. Os 2 bebês restantes não desenvolveram um padrão circadiano durante todo o tempo de internação. Devemos salientar que, mesmo com o início de um ritmo circadiano de atividade motora, a presença de periodicidade ultradiana é ainda evidente, principalmente em torno de 3 horas, e, em alguns sujeitos, ainda é a mais importante.

Entre os bebês do grupo IV (com idades de 34 a 36 semanas ao nascimento), todos já apresentavam um ritmo circadiano de atividade motora, sendo este predominante para 3 entre 4 sujeitos. Entre os bebês de termo (GV), igualmente o ritmo circadiano já é o predominante desde a primeira semana de vida para 5 de 6 sujeitos. Ainda assim e, principalmente, ao avaliarmos os resultados da matriz espectral (figura 9), observamos a presença de frequências ultradianas de forma significativa. Apenas um bebê de termo, o qual permaneceu internado por mais tempo, não desenvolveu um padrão circadiano na atividade motora.

Figura 8: Resultados referentes à atividade motora de um RNPT. Da esquerda para a direita, os gráficos correspondem ao 1- actograma, 2- matriz espectral, com a potência diária dos primeiros 20 harmônicos, 3- análise espectral dos primeiros 20 harmônicos, 4- periodograma de Lomb Scargle. Na última coluna, a idade em semanas pós-concepcionais. Na matriz gráfica a cor amarela indica o ritmo de maior potência e a primeira coluna corresponde ao primeiro harmônico.

Figura 9: Resultados referentes à atividade motora de um RNT (1-actograma, 2- matriz espectral, com a potência diária dos primeiros 20 harmônicos, 3- análise espectral dos primeiros 20 harmônicos, 4- periodograma de Lomb Scargle). Na última coluna, a idade em semanas pós-concepcionais.

Esta evolução é observada de modo mais evidente ao avaliarmos a média dos resultados da matriz espectral para cada grupo (figura 10), onde podemos ver a presença de um ritmo circadiano muito menos intenso na atividade motora do que aquele obtido para a temperatura, além de uma faixa mais intensa no 8^o harmônico. Este achado é confirmado ao realizarmos a comparação pelo teste de Mann Whitney, onde encontramos potência significativamente maior do ritmo circadiano da temperatura em relação ao da atividade para o conjunto de dados e individualmente para 5 dos 12 sujeito avaliados - aqueles com coleta mais prolongada (figura 11). Além disso, as frequências ultradianas são predominantes para todos os grupos, exceto GV, e este padrão ultradiano é composto por múltiplas frequências, havendo o predomínio do período de 3 horas a partir do primeiro mês de vida para GI e GII.

Figura 10: Representa as médias dos resultados das matrizes espectrais para a atividade, com valores diários de potência, para os 5 grupos.

Figura 11: Média e desvio padrão da potência do ritmo circadiano da temperatura e da atividade motora para cada sujeito (sem estratificação por idade).

Não encontramos correlação significativa entre a idade pós-concepcional e a potência ou o período do ritmo circadiano semanal do comportamento de atividade/repouso obtidos pelo periodograma de Lomb Scargle para os recém-nascidos pré-termo analisados individualmente, em conjunto ou em grupo. Comparando os diferentes grupos pelo teste de Mann Whitney, encontramos diferença estatisticamente significativa apenas para a potência do ritmo circadiano entre o grupo de bebês de termo (GV) e os demais grupos ($p < 0,05$), exceto GI, confirmando o padrão observado na matriz espectral.

Por outro lado, ao parearmos os sujeitos de acordo com a idade pós-natal, encontramos uma correlação estatisticamente significativa, embora com coeficiente de correlação baixo ($R = 0,27$) entre a idade pós-natal e a potência do ritmo circadiano.

Entre os RNPTs que apresentam ritmo circadiano entre 34 e 36 semanas de idade corrigida e os RNTs, há uma tendência significativa de agrupamento das acrofases pelo teste de Rayleigh entre 14 hs 30 min e 17 hs 30 min (figura 12). O período do ritmo circadiano, por sua vez, tende a ser próximo de 24 horas (1431 ± 29 minutos).

Figura 12: Resultado do teste de Rayleigh para as acrofases da atividade motora.

2.3.3 Diário de sono/vigília, alimentação e procedimentos

O ciclo vigília/sono segundo os dados obtidos pelo diário apresentou um padrão estereotipado, com presença quase exclusiva de um ritmo na faixa de 2 a 3 horas e ausência de ritmo circadiano. Este padrão esteve claramente relacionado aos horários de alimentação, a qual também apresentou ritmo ultradiano na mesma faixa de frequência (2 ou 3 horas, dependendo dos horários de prescrição da dieta de cada sujeito) e com potência maior que o observado para o CVS. Os horários de procedimento igualmente apresentaram um padrão ultradiano seguindo o comportamento alimentar, embora em algumas semanas houvesse presença de um ritmo circadiano para os recém-nascidos pré-termo (figura 13).

Entre os recém-nascidos de termo encontramos também predomínio de um ritmo de 2 a 3 horas para o CVS e a alimentação (figura 14). Entretanto, em 5 de 7 sujeitos observamos um ritmo circadiano nos horários de procedimentos em pelo menos metade das semanas analisadas, o qual se refletiu no surgimento de um ritmo circadiano no CVS na semana correspondente e possivelmente estaria relacionado à presença mais assídua da mãe.

1

2

3

Figura 13: Actograma e resultados do periodograma semanal (Lomb Scargle), de acordo com a IGC para 1-CVS, 2-alimentação e 3-horários de manuseio de um RNPT. No actograma as barras escuras correspondem a 1-vigília, 2-presença de dieta e 3-presença de manuseio.

Figura 14: Actograma e resultados do periodograma semanal (Lomb Scargle), de acordo com a IGC para 1-CVS, 2- alimentação e 3- horários de manuseio de um RNT.

Ao analisarmos os padrão de despertares pelo teste T, encontramos uma quantidade diária significativamente maior de despertares induzidos ($7,66 \pm 2,29$) que despertares espontâneos ($2,54 \pm 1,7$) para o conjunto dos sujeitos, bem como individualmente e para cada grupo. A análise do padrão rítmico semanal dos despertares induzidos e espontâneos mostrou a presença de um ritmo com período de 3 horas para os primeiros e nos despertares espontâneos um padrão predominantemente composto por múltiplas frequências ultradianas e eventualmente a presença de um ritmo circadiano.

Figura 15: periodograma dos despertares espontâneos (gráficos acima) e induzidos (abaixo) de um sujeito representativo com 40 semanas de IGC e 41 semanas de IGC, respectivamente.

2.3.4 Iluminação ambiente

A análise rítmica do padrão de iluminação ambiente revelou a presença de um ritmo de 24 horas potente tanto no berçário como na UTI neonatal (figura 16), com sua acrofase ocorrendo por volta das 12 horas para todas as semanas analisadas, coincidindo, portanto, com o padrão de iluminação natural (fora de ambiente fechado). Definindo a fase clara entre 8 h e 20 h e a fase escura entre 20 h e 8 h, a intensidade luminosa média foi de $870 \pm 616,9$ lux na fase clara e de $395 \pm 345,1$ lux na fase escura.

Figura 16: representa o padrão de iluminação no berçário ao longo da permanência de um RNPT do grupo I (1- luminograma*, 2- matriz espectral, com a potência diária dos primeiros 20 harmônicos, 3- análise espectral dos primeiros 20 harmônicos, 4- periodograma de Lomb Scargle) Na última coluna, a idade em semanas pós-concepcionais.

2.3.5 Resultados da coleta domiciliar

Dez sujeitos realizaram coleta de ao menos uma das variáveis logo após a alta domiciliar, entretanto, apenas 6 bebês completaram o tempo de 6 meses de seguimento com os dados de temperatura, actimetria e diário. A idade gestacional corrigida de cada sujeito no momento da alta encontra-se no quadro abaixo.

* luminograma: termo empregado na presente tese para designar a representação gráfica das variações de intensidade luminosa ao longo das 24 horas em uma série de dias consecutivos.

Quadro 4: Sujeitos com dados coletados na transição para o domicílio. As colunas representam na sequência a identificação do recém-nascido, o grupo segundo divisão pela idade gestacional ao nascimento, idade gestacional corrigida no momento da alta e X identifica a variável coletada.

Sujeito	Grupo	IGC na alta	Temperatura	Atividade	Diário
HEL	GI	42 3/7	X	X	X
PDH	GI	40 6/7	X	X	
VIT	GII	38	X	X	X
PAH	GII	40 4/7	X		X
VTH	GII	37		X	
CADU	GIII	39 6/7	X	X	X
BRY	GIII	35	X	X	X
KAI	GIII	38 3/7			X
RLU	GIV	37 1/7	X	X	X
BRU	GV	41 (RNT)	X	X	X

Na transição para o domicílio observamos um incremento abrupto na potência do ritmo circadiano da atividade/repouso ($p < 0,05$ no teste de Wilcoxon para amostras pareadas) e da temperatura, embora este último sem atingir significância estatística (figura 17).

Figura 17: potência obtida pelo método do Lomb Scargle do ritmo circadiano da atividade e da temperatura do punho para cada sujeito na semana anterior e na semana seguinte à alta hospitalar.

A temperatura, que já apresentava predomínio de um padrão circadiano durante a internação hospitalar, mantém este padrão e evolui com incremento na sua potência e maior estabilidade do seu período particularmente a partir do terceiro mês de idade corrigida. Já o ritmo circadiano da atividade/repouso apresenta-se com um período próximo às 24 horas logo após a alta hospitalar. Encontramos correlação significativa entre o aumento da idade pós-concepcional após a alta hospitalar e a potência do ritmo circadiano tanto na temperatura do punho como na atividade/repouso, embora com um coeficiente de correlação baixo no teste de Spearman ($R=0,30$ para a temperatura e $R=0,35$ para a atividade/repouso).

O ritmo circadiano do CVS apresenta aumento abrupto na sua potência logo após a alta e desaparecimento do componente de 3 horas simultaneamente. Representamos a seguir a evolução do padrão rítmico da atividade/repouso (figura 18), temperatura (figura 19) CVS (figura 20) e alimentação (figura 21) para 2 bebês do grupo III (nascidos entre 32 e 34 semanas de idade pós-concepcional), um dos quais teve alta com 40 semanas de IGC (CADU) e outro que teve alta com 35 semanas (BRY). Embora o sujeito BRY tenha recebido alta mais precocemente, a potência e estabilidade do seu ritmo circadiano é maior em relação ao do bebê CADU enquanto este segundo está internado, porém não após a alta hospitalar.

Figura 18: representa a evolução da potência do ritmo circadiano de atividade/repouso de 2 sujeitos (CADU e BRY) do grupo III. A seta aponta o momento da alta hospitalar, a qual ocorreu com 40 semanas de idade corrigida para o sujeito CADU e com 35 semanas de idade corrigida para o BRY.

Figura 19: representa a evolução da potência do ritmo circadiano da temperatura dos mesmos sujeitos (CADU e BRY) do grupo III. A seta aponta para o momento da alta hospitalar.

O CVS, que durante a internação apresentava um ritmo de 2 a 3 horas quase exclusivo, passa a exibir o predomínio de um ritmo circadiano logo após a alta, ainda com frequências ultradianas múltiplas e de baixa potência durante as 2 primeiras semanas. A presença de um ritmo de 2 ou de 3 horas está vinculada ao horário de alimentação prescrito. É interessante observar que em um dos RNPTs que teve alta com 35 semanas de IGC, portanto, várias

semanas antes de atingir o termo, também observamos este padrão logo após a alta. Entretanto, a potência deste ritmo circadiano é baixa comparativamente a bebês que tiveram alta mais tardiamente e este sujeito apresenta um nítido incremento na potência do ritmo circadiano do CVS ao completar 1 mês de idade corrigida (figura 19). Na primeira semana após a alta, quando não observamos ritmo circadiano no CVS para nenhum dos 2 sujeitos representados, a principal frequência encontrada é de 12 horas.

Figura 20: representa a evolução da potência do ritmo circadiano e do ritmo de 3 horas do CVS para os mesmos 2 sujeitos (CADU e BRY) do grupo III. A seta aponta para o momento da alta hospitalar.

Em relação ao comportamento alimentar, este inicialmente mantém-se com um padrão ultradiano entre 2 e 4 horas, com queda significativa da sua potência após a alta, porém ao longo das semanas evolui com ausência de qualquer componente rítmico para 5 dos 6 sujeitos. Nos gráficos abaixo representamos a evolução do ritmo de 3 horas e de um eventual ritmo circadiano no comportamento alimentar. Após o desaparecimento do ritmo de 3 horas, nenhuma outra frequência significativa é encontrada nos meses seguintes.

Figura 21: representa a evolução da potência do ritmo circadiano e do ritmo de 3 horas do comportamento alimentar para os mesmos 2 sujeitos (CADU e BRY) do grupo III. A seta aponta para o momento da alta hospitalar.

Não foi possível avaliar a relação entre o padrão rítmico e o tipo de dieta recebida durante a internação devido à grande variabilidade diária em relação ao tipo de leite ofertado.

Após a alta, apenas duas das seis mães não mantiveram aleitamento materno exclusivo até os 6 meses (CADU E RLU), não sendo possível estabelecer comparações devido ao pequeno número de sujeitos.

Apenas um bebê de termo foi acompanhado após a alta hospitalar, evoluindo de forma semelhante aos recém-nascidos pré-termo. Este sujeito permaneceu internado apenas uma semana, ocasião em que já apresentava ritmo circadiano na temperatura do punho e na atividade motora. Após a alta, a temperatura do punho manteve-se predominantemente circadiana, sem incremento significativo da sua potência até o final do 3^o mês de vida, semelhante ao que ocorreu com os RNPTs considerando-se a idade gestacional corrigida. A atividade motora exibiu incremento significativo na potência do ritmo circadiano após o segundo mês de vida, mostrando um impacto maior da idade pós-natal que da transição para o domicílio. Evolução semelhante ocorreu com o CVS, que apresentava predomínio de um ritmo de 3 horas durante a internação, embora uma frequência circadiana também estivesse presente. Após a alta, o ritmo de 3 horas teve redução significativa na primeira semana, desaparecendo a partir de então, mas a potência do ritmo circadiano sofreu incremento apenas a partir do 3^o mês de vida. Já, o ritmo de 3 horas do comportamento alimentar sofre queda significativa na sua potência após a alta e desaparece a partir do início do 3^o mês, quando este comportamento torna-se arritmico.

2.4 DISCUSSÃO PARCIAL

Considerando-se a evidente relação entre os ritmos circadianos e o ciclo dia/noite no qual se desenvolveram os organismos vivos, o estudo da ontogênese dos ritmos biológicos em recém-nascidos, particularmente prematuros, desperta interesse por investigar o amadurecimento do sistema de temporização endógeno, suas conexões e sua relação com as condições ambientais nas quais estes bebês são mantidos nas primeiras semanas de vida. Nos primeiros estudos, foi relatada a transição de um padrão polifásico de sono/vigília (com dados coletados por meio de diários) composto por múltiplas frequências, para um padrão com predomínio de um ritmo circadiano, após os primeiros 4 meses de vida, o qual instala-se com um padrão de progressão e regressão da sua potência. O ritmo de temperatura, por outro lado, apresenta um componente circadiano mais precocemente, sendo identificado por Mirmiran mesmo em recém-nascidos pré-termo (47).

Entretanto, estes estudos sempre estiveram limitados pela dificuldade de coletas longitudinais, fundamentais ao investigar um organismo em rápida transformação, como o dos recém-nascidos, e pelas dificuldades de análise de sistemas complexos. Neste trabalho utilizamos novos métodos de coleta que permitiram o seguimento contínuo dos nossos sujeitos durante toda a internação e após a alta hospitalar.

Como utilizamos pela primeira vez a temperatura do punho de recém-nascidos, medida pelo termistor Thermochron®, preocupamo-nos em avaliar mais detidamente sua relação com a temperatura axilar e a temperatura ambiente. A temperatura do punho mostrou-se recentemente um bom parâmetro para estudos cronobiológicos, apresentando um ritmo circadiano robusto e possivelmente em antifase em relação à temperatura central (52,53), embora ainda haja questionamento sobre a interferência direta da temperatura ambiente sobre o registro. Assim, inicialmente, comparamos os valores da temperatura da incubadora medidos pelos nossos termistores com os da temperatura do ar medida pelo sistema de controle da incubadora (SCI), encontrando resultados estatisticamente semelhantes quando esta se encontrava desocupada, garantindo a confiabilidade do nosso registro. Por outro lado, quando o bebê está dentro da incubadora, a temperatura registrada pelo nosso termistor é mais variável. O SCI mede a temperatura do ar que entra na incubadora, regulando-a de modo a mantê-la constante. Entretanto, a perda de calor do bebê por irradiação também influencia a temperatura de um ambiente fechado e a troca entre a pele do bebê e a parede da incubadora pode atingir quase 60% da perda total de calor do neonato (66) sendo, provavelmente, a explicação para a variabilidade da temperatura ambiente (TA) encontrada no registro do nosso termistor. Este fato pode explicar a correlação entre a temperatura do punho (TP) e a temperatura ambiente (TA) encontrada quando os bebês estão dentro da incubadora e a ausência de correlação entre TA e SCI. Por outro lado, não há correlação entre TP e TA para bebês em berço comum, indicando que a temperatura do punho registrada nesta situação e, portanto, suas oscilações, não são derivadas da temperatura ambiente. Embora na maioria dos estudos a temperatura da incubadora seja descrita como constante, estes dados geralmente não são detalhados e apenas o estudo de Thomas, 2001, descreve a presença de um ritmo de cerca de 24 horas na temperatura da incubadora, destacando, entretanto, que a temperatura da pele abdominal do bebê não parecia ser determinada pela temperatura ambiente (67).

A temperatura do punho exibe um ritmo circadiano significativo em quase todos os sujeitos, enquanto a temperatura axilar (TX) apresenta ritmo circadiano apenas em 50% dos mesmos. Em estudos prévios utilizando temperatura retal e abdominal (47,48) foi descrita a presença de ritmo circadiano de temperatura em alguns recém-nascidos pré-termo entre 29 e

32 semanas de idade pós-concepcional, precedendo o ritmo circadiano no padrão de atividade motora; Tenreiro (48) encontrou ritmo circadiano na temperatura cutânea de recém-nascidos pré-termo, o qual surgia e desaparecia erratically. Entretanto, no nosso estudo pudemos constatar ser este o ritmo predominante na maioria dos sujeitos desde a segunda semana de vida, mesmo nos recém-nascidos de menor idade gestacional. Não encontramos correlação entre o avanço da idade gestacional corrigida ou da idade pós-natal com a potência do ritmo circadiano de TP, o qual se mantém com relativa estabilidade. Thomas (67), 2001, também utilizando a temperatura da pele abdominal, não encontrou correlação entre a amplitude do ritmo de temperatura com a idade gestacional corrigida, exceto para um subgrupo de prematuros que não haviam apresentado nenhuma intercorrência perinatal, o que não foi o caso dos nossos sujeitos.

A acrofase da TP tende a ocorrer durante a noite, o que está de acordo com o padrão observado em adultos. Sarabia et al. propõem que TP exibe uma relação de fase invertida com o ritmo de temperatura central, o qual tem sua batifase durante a noite em humanos (53). O mesmo autor sugere que o ritmo da TP também apresenta um avanço de fase em relação à temperatura oral, o que está de acordo com a hipótese de Kräuchi de que o ritmo de perda distal de calor conduziria o ritmo da temperatura central (68,69). A termogênese se dá pela produção de calor proveniente dos processos metabólicos e pela atividade motora, enquanto a perda de calor ocorre por mecanismos de condução, convecção, irradiação e evaporação. A perda de calor em neonatos se dá principalmente por irradiação e convecção e as mãos e os pés são os principais locais de perda de calor. Assim, de acordo com a hipótese de Kräuchi teria sentido o desenvolvimento de um ritmo circadiano de TP mais precocemente que o da temperatura central.

A temperatura retal e da pele do abdome são os parâmetros mais utilizados em estudos cronobiológicos, sendo interpretadas como temperatura central e periférica, respectivamente. Brown et al. (70) sugerem que a temperatura axilar poderia representar uma temperatura central, mostrando boa correlação com a temperatura retal, principalmente em bebês com menos de 4 semanas de vida. Devido às restrições culturais ao uso da temperatura retal no nosso meio, optamos por comparar os resultados da temperatura do punho com a axilar. A acrofase do ritmo de temperatura axilar ocorreu cerca de 2 horas após a acrofase da TP, comportando-se, portanto, como uma temperatura periférica, ilação possível diante do fato da TX suceder e não preceder a TP. Uma vez que a perda de calor em neonatos ocorre principalmente nas mãos e nos pés, é razoável que TP esteja com um avanço de fase em relação à TX, considerando ambas temperaturas periféricas.

O período da TP apresenta grande variabilidade inter e intra-individual com períodos tanto inferiores como superiores a 24 horas. Mirimiram (47) encontrou ritmos de temperatura retal em prematuros com períodos superiores a 24 horas, os quais evoluíram para um ritmo de 24 horas ao longo das semanas. Aqui, não encontramos correlação entre o período do ritmo circadiano de temperatura e o avanço da idade pós-concepcional ou pós-natal durante a internação. Assim, além do padrão de progressão e regressão previamente descrito para a potência do ritmo circadiano, também observamos um padrão de progressão e regressão no período do mesmo, em torno das 24 horas. Outro achado interessante foi a presença frequente de mais de um período circadiano na mesma série temporal, tanto durante a internação como após a alta hospitalar. A presença de ritmos circadianos com dois períodos distintos é descrita em situações de conflitos de *zeitgebers* e sugere um sistema de temporização composto por ao menos dois osciladores. No ambiente hospitalar, sinais cíclicos de 24 horas são considerados escassos e, como este padrão se mantém mesmo no domicílio, acreditamos que seja característica do amadurecimento do sistema de temporização endógeno, particularmente no que se refere ao controle do ritmo de temperatura, o qual tarda em sincronizar-se ao ambiente. Em relação ao ritmo de atividade/repouso, também encontramos oscilações quanto ao período e eventualmente a presença de dois ritmos circadianos de períodos distintos na mesma série temporal, embora de forma mais esparsa.

Distintamente do que ocorre com a temperatura, a atividade motora apresenta um padrão predominantemente ultradiano nos RNPTs. Embora ocorra o desenvolvimento de um ritmo circadiano na maioria dos recém-nascidos ao longo das semanas, este tende a ser de baixa potência e menos estável que o ritmo circadiano da temperatura durante a internação. Considerando-se, entretanto, que a presença de um padrão circadiano no ciclo vigília/sono habitualmente é descrita após o primeiro mês de vida (35), em realidade, no nosso estudo este foi observado bem mais precocemente. Encontramos ritmo circadiano em quase todos os bebês de termo, sendo este predominante já na primeira semana, apesar dos ritmos ultradianos ainda serem exuberantes. Mesmo em recém-nascidos prematuros encontramos ritmo circadiano antes de atingirem o termo, embora ainda instável nestes sujeitos.

A maioria dos estudos utilizando actimetria em recém-nascidos focaram-se na validação do método em relação à polissonografia (para bebês de termo), diário e observação comportamental. Wulff, em 2000 e 2001 (44,45) e Nishihara, em 2002 (46), avaliaram o espectro de frequências extraído dos resultados de actimetria de recém-nascidos de termo e suas mães nas primeiras semanas de vida, encontrando concordância entre os padrões. Apenas Korte, 2001, investigou a ritmicidade da atividade/repouso em recém-nascidos pré-termo

(nascidos entre 34 e 36 semanas pós-concepcionais) na primeira semana de vida, identificando o predomínio de frequências ultradianas (71). Por outro lado, os bebês de termo já apresentavam frequência na faixa circadiana na primeira semana de vida, a qual se tornou predominante entre a segunda e a terceira semana.

O nosso estudo permitiu observar o início de um ritmo circadiano de atividade/repouso em prematuros por volta de 35 semanas pós-concepcionais, embora de baixa potência, a qual sofreu um incremento significativo após a alta hospitalar e a partir de 40 semanas pós-concepcionais, sugerindo a influência tanto das condições ambientais quanto do processo de amadurecimento do sistema nervoso central. Devemos considerar que os horários de manuseio e alimentação dos recém-nascidos durante a internação ocorrem geralmente a cada 3 horas, havendo uma pobreza de ritmos circadianos no ambiente. Glotzbach (57) e Bueno (59) já haviam encontrado ritmos ultradianos na faixa de 3 horas no CVS em neonatos, associados à rotina hospitalar. Assim, é possível que o padrão ultradiano observado no nosso e em outros estudos com prematuros mantidos em unidades de cuidado neonatal seja não apenas reflexo do desenvolvimento do sistema de temporização, mas também resultado da ação dos estímulos cíclicos do ambiente em que se encontram, fato este corroborado pela abrupta mudança de padrão no momento da alta, conforme observado no nosso estudo.

Nos recém-nascidos prematuros com tempo de coleta mais longos também pudemos observar um padrão de progressão e regressão na potência do ritmo circadiano da atividade motora. O período deste ritmo também apresenta oscilações, porém tendendo a aproximar-se de 24 horas já ao longo das primeiras semanas após o seu surgimento e encontrando-se mais estável que o da temperatura após a alta. Isto sugere que embora um ritmo circadiano significativo tenha início mais precocemente para a temperatura, o ritmo circadiano de atividade/motora é passível de arrastamento por ciclos ambientais de forma mais consistente.

Embora a maioria dos autores descreva o ambiente das unidades de cuidado neonatal com condições de iluminação relativamente constantes, os registros desta iluminação são feitos apenas por um ou dois dias. Na nossa série temporal, mais densa, pudemos identificar um ritmo de 24 horas na iluminação ambiente, provavelmente devido à existência de janelas, já que as luzes em princípio eram mantidas acesas durante as 24 horas. A presença de um ciclo claro/escuro na nossa unidade poderia ser um fator responsável pela identificação tão precoce de ritmos circadianos nos nossos sujeitos. Até o momento, entretanto, os autores não mostraram relação entre o desenvolvimento de ritmo circadiano para temperatura e sono/vigília em prematuros e a presença de um ambiente cíclico na unidade de cuidado neonatal (56).

Os dados de sono/vigília obtidos por meio do diário exibem, por outro lado, um ritmo quase exclusivo de 2 a 3 horas. Como a potência deste ritmo é maior no comportamento alimentar e diante da mudança do padrão do CVS em função de modificações nos horários de alimentação, acreditamos que a ritmicidade observado no CVS e nos horários de procedimentos seja secundária aos rígidos horários de alimentação do berçário. Esta idéia é corroborada pela maior frequência de despertares induzidos que espontâneos e a presença de um ritmo predominante de 3 horas nos primeiros. A organização temporal da alimentação atuaria sobre o CVS como um fator de mascaramento, uma vez que encontramos mudança abrupta no espectro de frequências do CVS após a alta hospitalar, com o surgimento de um ritmo circadiano predominante nas 2 primeiras semanas, associado a múltiplas frequências ultradianas de menor potência.

Por outro lado, o comportamento alimentar evolui com ausência de qualquer ritmicidade para a maioria dos sujeitos, o que permanece pelos meses seguintes. Na sua descrição inicial da evolução do CVS em recém-nascidos, Hellbrugge encontrou predomínio de um ritmo na faixa de 4 horas, o qual foi associado pelo autor ao comportamento alimentar. Em estudos posteriores, entretanto, foi identificado ritmo ultradiano pouco consistente no padrão de alimentação de bebês (32), embora seja de senso comum a idéia de que o padrão de sono/vigília de neonatos seja dirigido pelo seu comportamento alimentar. Aqui, a associação entre o comportamento de sono/vigília e de alimentação é observada apenas durante a internação e por um mecanismo de mascaramento, de modo que sugerimos que em condições de livre demanda, não só esta associação inexistente, como não há ritmicidade no padrão de alimentação.

Estas novas informações podem ser úteis às famílias, ao fornecerem subsídios para a não obrigatoriedade da alimentação a cada 3 horas. Da mesma forma, a observação de um forte mascaramento sobre o ciclo vigília/sono traz argumentos para reavaliar a organização das unidades de cuidado neonatal, não apenas em relação à alimentação, mas também quanto ao seu padrão de iluminação. Considerando o desenvolvimento fisiológico faz sentido pensar que um ambiente com ritmos de 24 horas mais evidentes seria benéfico na fase neonatal, auxiliando na sincronização desses recém-nascidos ao ambiente durante a internação e posteriormente no seu domicílio.

3 ESTUDO DA ONTOGÊNESE DOS RITMOS BIOLÓGICOS EM RATOS NEONATOS

3.1 MATERIAIS E MÉTODOS

Cinco fêmeas de ratos Wistar grávidas foram levadas ao nosso laboratório com 16 dias de gestação. Os animais eram provenientes do Laboratório Charles River, França, onde permaneciam em ciclo claro/escuro 12:12h (LD), com a fase clara iniciando às 8 horas, com intensidade de 300 lux. Ao chegarem ao nosso laboratório as fêmeas foram mantidas em gaiolas transparentes com ciclo claro/escuro 12:12h seguindo o mesmo padrão do local de origem, até a data do parto, no 21^o dia de gestação. No 2^o dia pós-natal os filhotes foram mesclados de modo a eliminar possíveis variabilidades de origem genética. Ao final, cada mãe permaneceu com 9 ou 10 crias durante a lactação, sendo ao menos 1 sua e ao menos 4 machos e 4 fêmeas. A partir deste momento todos os animais foram mantidos em isolamento ambiental, com temperatura constante e em condições de luz constante (LL), com 300 lux, durante toda a lactação.

Nesta etapa, uma das mães recebeu melatonina em água de bebida, a qual foi fornecida *ad libitum* e outra teve uma roda a sua disposição também *ad libitum*. Para as outras 3 ratas não foi realizada nenhuma intervenção nesta etapa. Durante a lactação o conjunto de mãe e crias foi monitorado por meio de um actímetro, com dois feixes de raios infravermelhos perpendiculares, conectado a um computador, o qual armazena os dados a cada 15 minutos, segundo protocolo previamente estabelecido (figura 22). As mães também tiveram seu comportamento de ingestão de água monitorado por um equipamento formado por raios infravermelhos, também produzido no próprio laboratório.

Figura 22: Imagem do actímetro utilizado para animais, produzido no próprio laboratório de Diez-Noguera.

Após 24 dias de lactação procedeu-se ao desmame, dando início à etapa 1. Nesta, cada filhote foi retirado da mãe e isolado em uma gaiola individual, mantendo as mesmas

condições de luz constante (LL) durante os 30 dias seguintes, quando foram submetidos a diferentes intervenções.

Os animais foram divididos aleatoriamente em 6 grupos, compostos por 8 animais cada, divididos da seguinte forma:

- ML (melatonina na lactação): formado pelos filhotes cuja mãe havia recebido melatonina durante a lactação.
- MD (melatonina no desmame): integrado por filhotes que a partir do desmame começaram a receber melatonina.
- RL (roda na lactação): composto pelos filhotes cuja mãe teve acesso à roda durante a lactação.
- RD (roda no desmame): formado pelos filhotes que passaram a ter a sua disposição uma roda após o desmame.
- CC (controles): grupo que não recebeu nenhuma intervenção.
- TR (temperatura): grupo composto por filhotes amamentados por mães que não receberam intervenção e que após o desmame tiveram um termistor implantado no abdome, para monitoramento da temperatura.

No momento do desmame os animais do grupo TR foram submetidos a uma laparotomia sob anestesia com halotano para inserção de um termistor intraperitoneal com memória Thermochron® – Maxim Dallas (Dallas, Texas, EUA). Com esse termistor coletamos os dados de temperatura a cada 15 minutos durante 21 dias consecutivos. Estes animais foram mantidos em gaiolas individuais com água e alimento sob livre demanda, em luz constante e nenhuma outra intervenção foi realizada durante as etapas seguintes.

Durante os 30 dias da etapa 1 disponibilizamos melatonina *ad libitum* aos grupos ML e MD. Os bebedouros foram protegidos da luz com papel alumínio e as soluções foram trocadas a cada 2 dias, de modo a evitar a oxidação das substâncias. Nestas ocasiões os bebedouros foram pesados, determinando-se a quantidade de água e substância ingeridas.

Os animais dos grupos RL e RD foram colocados em uma gaiola maior que os demais animais, pois as mesmas continham uma roda de atividade.

Todos os animais tiveram sua atividade monitorada por um actímetro, conforme descrito anteriormente, e os machos dos grupos ML, MD e CC também tiveram seu comportamento de ingestão de água monitorado.

Após este período de 30 dias, foram suspensas as intervenções, iniciando a etapa 2. Assim, durante os 15 dias seguintes, os animais dos grupos ML e MD deixaram de receber melatonina e os animais dos grupos RL e RD foram colocados em uma gaiola sem roda, igual a dos outros grupos.

Ao final, procedeu-se a uma última etapa de reposição (etapa 3), na qual voltamos a administrar melatonina aos grupos que anteriormente a haviam recebido (ML e MD) e também ao grupo controle (CC). Os animais permaneceram em condições de luz constante e receberam melatonina durante os 25 dias seguintes

Ao final, os grupos CC, ML, MD, RL e RD foram colocados em escuro constante (DD), com 0 lux, de modo a determinar o período e potência do seu ritmo de atividade locomotora em livre curso. Nessa ocasião os animais do grupo TR foram sacrificados e os termistores foram retirados da cavidade abdominal.

3.2 ANÁLISE

Os dados de atividade motora, registrados por actimetria, foram utilizados para construir actogramas, utilizando o software El Temps, permitindo a inspeção visual do padrão de atividade/repouso. Também foram construídas matrizes gráficas do espectro de potência para cada animal, compreendendo toda a série de dados, o que permite a avaliação da evolução do padrão rítmico.

Os registros da etapa 1 de cada grupo foram divididos em 3 séries de 10 dias (bl1, bl2 e bl3), e a presença de ritmicidade foi avaliada. Utilizamos o algoritmo do periodograma segundo Sokolove e Bushell, incorporado ao programa El Temps. Cada série correspondendo aos dados de cada animal foi submetida a essa análise, determinando-se o período do ritmo circadiano, quando significativamente ($p < 0,05$) presente, e a porcentagem de variância do mesmo. Essa medida expressa a porcentagem que cada frequência detectada na série de dados representa em relação à variabilidade (oscilações) presente na série. A porcentagem de variância (PVA), explicada pelo pico mais alto em relação à linha de significância, foi utilizada como indicador da importância do ritmo de atividade motora. Os primeiros 15 dias da etapa 2 (E2) e a primeira série de 15 dias da etapa 3 (E3) foram analisados do mesmo modo para todos os grupos. Tanto E2 como E3 foram construídas retirando-se os primeiros 3 dias, supondo-se uma fase inicial para observar o efeito da substância administrada ou retirada.

Realizamos, ainda, análise de Fourier (algoritmo também incorporado ao programa El Temps) para cada uma das séries temporais, obtendo a potência do primeiro harmônico (correspondente ao período exibido pelo animal no periodograma de Sokolove Bushell).

Os resultados assim obtidos foram comparados através de ANOVA de múltiplos modelos lineares (programa SPSS), na qual utilizamos como variáveis dependentes a PVA, a potência espectral do primeiro harmônico e o período circadiano, quando presente, e como variáveis independentes o grupo e a série temporal. As 3 séries da etapa 1 foram utilizadas para comparação entre si e também foram comparados os últimos 15 dias da etapa 1, a partir de então, denominada E1, e as etapas E2 e E3.

Os dados de ingestão de água registrados através de medidores de raios infravermelhos foram divididos em 3 séries temporais de 10 dias para cada grupo. Foram construídos actogramas e periodogramas e os resultados de PVA da última série de 10 dias foram comparados entre os grupos por meio da análise de variância.

Os dados de temperatura do grupo TR foram utilizados para a construção de termogramas pelo software El Temps e para a confecção de matrizes gráficas, permitindo uma inspeção visual do conjunto dos dados. A seguir, foram divididos em 2 blocos de 10 dias e submetidos à análise do espectro de frequências através do periodograma de Sokolove e Bushel.

3.3 RESULTADOS

O desenvolvimento do ritmo de atividade motora mostra inicialmente um padrão predominantemente ultradiano, o qual é progressivamente substituído por um ritmo circadiano. A análise da evolução da ritmicidade circadiana, representada pela porcentagem de variância (PVA) e pela potência do primeiro harmônico na análise espectral (P), evidenciou um aumento progressivo da mesma na etapa 1 do experimento ($b13 > b12 > b11$) para todos os grupos, como previamente descrito na literatura, exceto os grupos que tinham a roda (RL e RD). Estes últimos apresentavam uma PVA para o ritmo circadiano significativamente maior que os demais grupos ($p < 0,000$) nas 3 séries analisadas e sem incremento ao longo de E1 (figura 23).

Figura 23: Actogramas individuais da etapa 1 de animais que representam o padrão mais frequentemente observado nos grupos CC, RL, RD, ML e MD. Observamos a presença de um ritmo circadiano significativo nos grupos RL e RD desde o início da coleta.

Uma vez que os grupos RL e RD promoviam um incremento na média global, analisamos exclusivamente os grupos CC, ML e MD. Em relação ao grupo TR apresentaremos os resultados comparando a evolução do ritmo de atividade ao de temperatura separadamente. Seguindo este procedimento pudemos encontrar uma redução significativa na PVA e na P para o grupo MD em relação aos demais ($p < 0,05$) em bl3, sugerindo um atraso na aquisição de um padrão circadiano para estes animais (figura 24).

Figura 24: Actogramas compreendendo todas as etapas do experimento de animais representativos dos grupos CC, RL e MD. As setas vermelhas indicam a transição de E1 para E2 e de E2 para E3, respectivamente.

Em relação ao período na primeira etapa, utilizamos apenas bl3 para a comparação entre grupos, momento no qual já encontrávamos todos os animais com ritmo circadiano

significativo. O grupo RD apresenta período circadiano significativamente menor que os animais controle e o grupo MD ($p=0,016$ e $p=0,044$, respectivamente). Os grupos CC, ML e MD não diferem entre si na análise global.

Na etapa 2, ao retirar-se o tratamento, observamos um incremento significativo na potência espectral para os grupos CC e MD (figura 25). O grupo ML, apesar de também mostrar um aumento na potência espectral, não atinge valores significantes. Para os grupos RL e RD, inversamente, ocorre uma redução na potência após a retirada da roda. A comparação entre os grupos na etapa 2 não exhibe diferença em relação à PVA, potência espectral ou período.

Figura 25: Apresenta a potência espectral nas etapas 1 e 2 para cada grupo.

Na etapa 3, os grupos ML, MD e CC passaram a receber melatonina, o que foi acompanhado por um decremento significativo na potência do ritmo circadiano apenas para o grupo controle.

Ao realizar a análise global, não encontramos diferença de período entre os grupos, entretanto, ao procurar uma possível diferença entre sexos, tornou-se evidente um efeito do fator sexo e do fator tempo (etapa) em relação à evolução do período para os grupos CC, ML e MD. Assim, encontramos um período mais longo em E2 em relação a E1 ($p=0,001$) e um encurtamento de E2 para E3 ($p=0,037$). Entre as fêmeas (figura 26), este aumento de período de E1 para E2 é encontrado nos grupos CC e MD e, como os animais controle não haviam recebido nenhuma intervenção nesta fase, podemos atribuir este incremento a oscilações próprias do desenvolvimento. Em E3, a redução de período também é observada apenas nos grupos CC e MD, quando ambos recebiam melatonina. Entretanto, o grupo ML não exhibe

modificações de período, o qual é significativamente menor que nos grupos CC e MD ($p=0,027$ para ML X CC e $p=0,003$ para ML X MD).

Figura 26: Evolução do período do ritmo circadiano nas fêmeas ao longo das etapas, para os grupos CC, ML e MD.

Os machos, por outro lado, também apresentam um incremento de período de E1 para E2, sem diferenças significativas entre grupos (figura 27). Além disso, não encontramos modificações de período de E2 para E3 para nenhum grupo, diferente do que ocorre com as fêmeas. Isto sugere que a melatonina durante a lactação poderia ter um efeito permanente ao menos nas fêmeas, enquanto efeitos transitórios poderiam ser observados com administração mais tardia da substância.

Figura 27: Evolução do período do ritmo circadiano nos machos, ao longo das etapas, para os grupos CC, ML e MD.

O grupo TR foi analisado separadamente de modo a descrever o desenvolvimento do ritmo de temperatura em animais sob luz constante e compará-lo à evolução do ritmo de atividade/repouso.

Observamos a presença de ritmo circadiano na temperatura de todos os animais nos primeiros 21 dias após o desmame, sendo que em 5 animais este já estava presente nos primeiros 10 dias pós-desmame. Por outro lado, o padrão de atividade exibiu ritmo circadiano significativo nos primeiros 21 dias apenas para 3 animais e esboça o início do mesmo para outros 3, não sendo significativo para os 3 restantes. Para todos os animais com ritmo circadiano significativo de atividade, este tem início na segunda série temporal de 10 dias (figura 28). O período observado tanto para a temperatura como para a atividade foi maior do que 24 horas para todos os animais.

Figura 28: Na série de gráficos superior exibimos os resultados da temperatura e na série inferior os resultados para a atividade de um animal representativo. O gráfico da esquerda representa o termograma na série superior e o actograma na inferior, no centro encontra-se a matriz espectral correspondente e à direita o periodograma da primeira e da segunda série de 10 dias. Na matriz gráfica a cor amarela indica o ritmo de maior potência e a primeira coluna corresponde ao primeiro harmônico.

A análise através da matriz espectral, visualizando o espectro de frequências diário, mostra a predominância do ritmo circadiano da temperatura desde o primeiro dia para os animais individualmente e em grupo, diferentemente do que ocorre com a atividade, o qual apresenta inicialmente o predomínio de frequências ultradianas, principalmente entre 2 e 4 horas, com predomínio do ritmo circadiano após os primeiros 10 dias de vida, com momentos de redução e outros de incremento da sua potência e estabilização a partir de 15 dias do início da coleta (figura 29).

Todos os animais controles monitorados desenvolveram um ritmo circadiano de ingestão de água em bl3. No grupo ML, 2 de 4 animais monitorados desenvolveram ritmo de ingestão de água e nenhum dos animais no grupo MD, sendo que os animais que recebiam melatonina apresentaram ingestão de maior quantidade de água que os animais do grupo CC, possivelmente por efeito do sabor do álcool utilizado como diluente. Durante a lactação, todas as ratas lactantes evoluíram com perda da ritmicidade do comportamento de ingestão de água, associada à arritmicidade na atividade locomotora sob condição de luz constante.

Figura 29: Matriz gráfica da temperatura e da atividade para o grupo TR, evidenciando o predomínio do ritmo circadiano (primeira coluna da matriz) na temperatura desde o primeiro dia de coleta e início do ritmo circadiano da atividade a partir de 10 dias pós-desmame.

3.4 DISCUSSÃO PARCIAL

A ontogênese dos ritmos circadianos em mamíferos é caracterizada pela transição de um padrão polifásico, composto por múltiplas frequências ultradianas para um padrão monofásico, com um ritmo circadiano dominante. Filhotes de roedores em DD prontamente desenvolvem um padrão circadiano, porém em animais expostos à luz constante durante a lactação, esta transição ocorre progressivamente ao longo do primeiro mês após o desmame, como podemos ver pelo aumento da PVA e potência ao longo da etapa 1.

O desenvolvimento de ritmo circadiano de atividade em filhotes de ratos em LL, condição que habitualmente leva à perda de ritmicidade nestes roedores, foi previamente descrita pelo grupo de Díez-Noguera (25,26,27). Aqui, demonstramos pela primeira vez que também o ritmo circadiano de temperatura desenvolve-se nestas condições. Estudos prévios (72), com filhotes de roedores em escuro constante, mostram o surgimento do ritmo circadiano de temperatura mais precocemente que o descrito para o ritmo de atividade, estando presente já durante a fase de lactação, ainda que não tenham sido feitos experimentos com coleta simultânea de ambas variáveis em neonatos de roedores. No nosso experimento demonstramos a presença do ritmo circadiano de temperatura de forma significativamente mais precoce que o observado para a atividade mesmo sob luz constante. Diferentemente da atividade, que passa por uma transição de um padrão polifásico para um padrão monofásico em LL, o que normalmente não ocorre em filhotes em DD, não observamos esta interferência do padrão de luz constante sobre o ritmo de temperatura. Entretanto, como iniciamos a nossa coleta após o desmame, é possível que alguma expressão de interferência estivesse presente durante a lactação, a qual não foi observada.

Em animais com a possibilidade de realizar exercício físico em uma roda não observamos a referida transição, uma vez que estes animais exibem um claro ritmo circadiano dominante desde o início, sem a presença de frequências ultradianas na atividade locomotora. Em um dos grupos com a roda, RD, também observamos um encurtamento do período, o que sugere uma ação sobre o marcapasso circadiano.

É reconhecido na literatura que a presença regular de uma roda pode ser um *zeitgeber* para roedores, induzindo bipartição em dois componentes circadianos em protocolos com conflito de *zeitgebers*, atrasando a ressincronização à inversão do ciclo de claro/escuro e pode produzir modificações de período (4,7). No nosso experimento a roda esteve disponível sob livre demanda, de modo que a única diferença em relação aos animais controles foi a possibilidade de realizar exercício físico e não a adição de uma informação temporal. Ainda

assim, houve uma evidente atuação de reforço do exercício físico sobre a expressão do componente circadiano ao longo do desenvolvimento, sugerindo uma possível ação de indução do acoplamento de osciladores. Esta ação parece ser transitória, uma vez que após a retirada da roda houve redução da PVA e P do componente circadiano, bem como prolongamento do período para os grupos RD e RL. Entretanto, neste momento, todos os grupos já tinham um padrão circadiano bem estabelecido, de modo que não sabemos qual seria o comportamento destes animais ao ser retirada a roda em uma época do desenvolvimento em que habitualmente exibiriam um padrão ultradiano.

Os animais controle exibem um aumento de P e da PVA e prolongamento do período de E1 para E2, para ambos os sexos. Uma vez que estes animais não haviam recebido qualquer intervenção, podemos supor que se trata do processo da maturação do sistema de temporização. Por outro lado, no grupo MD identificamos um atraso no desenvolvimento da ritmicidade circadiana, com P e PVA menores ao final de E1. Isto sugere que a melatonina oferecida continuamente após o desmame poderia ter um efeito que representa uma interferência sobre o sistema circadiano. Isto é corroborado pelo fato que em P3, ao iniciarmos a melatonina para o grupo CC, estes animais também apresentaram redução da potência espectral do primeiro harmônico, enquanto este efeito não é observado no grupo ML. Uma vez que a melatonina foi ofertada continuamente, podemos supor que esta seria uma informação conflitante em relação à informação fótica em uma situação de luz constante. Quando oferecida durante a lactação, o sistema de temporização, em desenvolvimento, adapta-se a uma condição inicialmente perturbadora, de modo que após o desmame este grupo não é afetado pela administração de melatonina. Entretanto, este efeito sobre o grupo MD é transitório, uma vez que em E2, a potência espectral é comparável para todos os grupos e, quando a melatonina é administrada novamente aos animais do grupo MD, este efeito não é mais observado.

O efeito da melatonina sobre o período tem um importante componente de gênero, uma vez que as fêmeas em ML são mais afetadas, com um período mais curto em todas as fases do experimento, mesmo quando a melatonina é retirada, sugerindo aqui um efeito permanente. Na transição de E1 para E2 ocorre um prolongamento do período para os grupos CC e MD, provavelmente como parte do processo de desenvolvimento. Entre E2 e E3 os animais controle apresentam um encurtamento do período, porém como neste momento os três grupos estavam recebendo melatonina, não pudemos identificar se este foi um efeito da substância ou parte do processo de desenvolvimento.

Por outro lado, os machos não apresentaram diferenças significativas de período entre os grupos em qualquer uma das fases do experimento, nem encurtamento de período para o grupo CC em E3, sugerindo que os machos não seriam afetados de maneira significativa pela administração de melatonina. Outra possibilidade é que para os machos o período crítico para que a melatonina possa provocar alterações de período seja mais tardio, uma vez que observamos uma tendência nos machos do grupo MD de ter um período mais curto, que pode não ter atingido significância estatística devido ao baixo número de animais após a divisão por sexo.

Nos filhotes de ratos a melatonina tem níveis mensuráveis na glândula pineal no final da primeira semana de vida, porém nesta fase o ritmo de melatonina do filhote parece ser fortemente dependente do ritmo materno, o que sugere que a transferência desta substância através do leite materno pode ter um importante papel para esta sincronização (6,17). Está presente na literatura que mães lactantes têm uma alta amplitude do ritmo de melatonina no leite, sendo seus níveis muito similares aos níveis séricos (18), o que garante que a melatonina administrada às mães na água de bebida, ao elevar o nível plasmático, tenha sido transferida aos filhotes. Como as ratas lactantes evoluíram com arritmicidade no seu comportamento de ingestão de água, também podemos inferir que, no nosso experimento, a melatonina foi transferida para os filhotes de forma não temporizada. Após o décimo dia de vida, a influência materna sobre o ritmo dos filhotes diminui e fatores ambientais tornam-se os principais agentes arrastadores (12, 73). Deste modo, a fase de lactação seria o mais provável período crítico para o desenvolvimento do sistema envolvido com a sinalização da melatonina, explicando o efeito encontrado sobre a potência do ritmo circadiano e o seu período no grupo que recebeu melatonina durante a lactação.

Embora não haja estudos sobre o ritmo de melatonina em filhotes sob LL durante a lactação, não foram encontradas alterações permanentes no sistema de síntese de melatonina em animais criados nesta condição (17). Em animais adultos, injeções diárias de melatonina podem sincronizar o ritmo de atividade atenuado em roedores sob LL (74), porém não encontramos trabalhos com a administração crônica de melatonina sob condições de luz constante. Aqui temos a hipótese de que a melatonina administrada continuamente promoveria uma interferência sobre a expressão do ritmo de atividade motora em situação de LL, ao levar a uma condição de informação conflitante. Entretanto, uma vez presente durante o período crítico da lactação, o sistema de temporização poderia adaptar-se, de modo que a expressão do ritmo circadiano ocorra na mesma época que os animais controles e sem alteração na sua potência espectral.

Considerando o sistema circadiano composto por múltiplos osciladores, poderíamos supor que durante a lactação o acoplamento destes osciladores seria estabelecido e organizado de modo a adaptar-se às condições externas, de tal modo que a manifestação do ritmo circadiano torna-se possível. O fato de que as fêmeas exibem um encurtamento do período permanentemente sugere que a melatonina durante a lactação de fato age sobre o marcapasso circadiano.

Estudos prévios já encontraram diferenças de gênero no sistema de temporização de roedores (75) e Gorski identificou diferenças estruturais na área pré-óptica relacionadas ao sexo do animal (76). Cambras et al. (26,77) também identificaram padrões distintos entre os gêneros no desenvolvimento da ritmicidade em filhotes de ratos criados em LL, os quais desenvolvem ritmo circadiano, que persiste na vida adulta, principalmente nas fêmeas. Estas desenvolvem e mantêm o ritmo circadiano ao retornar para LL mesmo após terem permanecido em outras condições de iluminação, enquanto para os machos a presença do ritmo circadiano em LL parece ser transitória. A evolução do padrão de ritmicidade também é distinta (77), uma vez que as fêmeas apresentam um componente circadiano significativo, além das frequências ultradianas, logo após o desmame, enquanto os machos habitualmente apresentam apenas periodicidade ultradiana. Além disso, as fêmeas apresentam uma fase de transição bem definida e adquirem um ritmo circadiano predominante mais precocemente que os machos.

Devemos lembrar ainda o papel da melatonina na temporização dos ciclos reprodutivos em várias espécies de mamíferos, ao sinalizar o comprimento do dia e, conseqüentemente, a variação sazonal no fotoperíodo. Os efeitos da melatonina sobre o sistema reprodutivo parecem ser mediados por modificações na secreção de hormônios hipofisários, porém envolvendo um complexo circuito de interneurônios modulando a secreção do hormônio liberador de gonadotrofinas no hipotálamo (78,79). A administração de melatonina exógena promove aumento do pico vespertino de LH, FSH e prolactina no plasma. Por outro lado, a glândula pineal também apresenta receptores para LH e estrógeno (80,81) e poderia ter sua expressão rítmica alterada pela concentração destes hormônios, embora não tenham sido encontradas modificações no perfil de síntese de melatonina associadas ao ciclo estral de ratas (82).

Morin, em 1977, já havia identificado encurtamento do período do ritmo circadiano de atividade locomotora em ratas ovariectomizadas tratadas com estrógeno (83). Esta ação do estrógeno sobre a organização do sistema de temporização, com modificação de suas propriedades fundamentais, também foi ressaltada por Albers (80). Assim, o encurtamento do

período observado nas fêmeas que receberam melatonina durante a lactação pode refletir esta interação entre os dois hormônios, melatonina e estrógeno. No nosso experimento, observamos que a melatonina interfere de forma diferenciada sobre o desenvolvimento do período do ritmo circadiano em LL dependendo do sexo do animal, sugerindo que uma vez administrada durante a lactação, a melatonina poderia ter um efeito permanente sobre o sistema circadiano, levando ao encurtamento do período, ao menos entre as fêmeas.

4 DISCUSSÃO FINAL

Roedores são modelos frequentemente utilizados nos estudos cronobiológicos, tanto na descrição fenomenológica dos ritmos biológicos como na investigação dos seus componentes funcionais e estruturais. A identificação dos núcleos supraquiasmáticos, estruturas fundamentais no sistema de temporização de mamíferos, foi realizada inicialmente em estudos com ratos demonstrando a perda da ritmicidade na secreção de adrenocorticosterona após a lesão dos NSQs (2) e, posteriormente, seu papel no sistema de temporização de outros mamíferos, incluindo primatas foi consolidado. Da mesma forma, grande parte do conhecimento sobre as funções da glândula pineal e seu hormônio, a melatonina, advêm de estudos com roedores pinealectomizados (6,16,84), havendo raras descrições dos efeitos da pinealectomia em humanos.

A investigação dos mecanismos moleculares envolvidos no sistema de temporização endógeno de mamíferos também foi em sua maior parte realizada em roedores, permitindo a identificação dos grupos de genes relógio de mamíferos, suas alças de retroalimentação e sua expressão ubíqua no organismo. A caracterização desses genes como membros de uma organização periférica de osciladores, os quais podem ser arrastados por outros *zeitgebers* além do claro/escuro, como é o caso dos ciclos de alimentação/jejum, também foi feita com roedores (9, 10). O funcionamento básico dessas alças moleculares é o mesmo em uma ampla variedade de organismos e homologia considerável nas sequências dos genes relógio é encontrada desde insetos até mamíferos (85).

A extrapolação das informações extraídas de experimentos em roedores para o conjunto dos mamíferos, incluindo os humanos, foi possível diante da ancestralidade dos ritmos biológicos e da sua organização, sendo possível verificar que diversos princípios básicos dos fenômenos circadianos são semelhantes em diferentes espécies animais, como a presença de um período endógeno em condições de livre curso, seu ajuste aos ciclos ambientais por mecanismos de arrastamento, a relação com o ciclo claro/escuro como um importante *zeitgeber* para a maioria das espécies e respostas dependentes da fase para as diversas variáveis biológicas (ainda que com suas especificidades de acordo com a variável em questão e o animal). Particularmente entre humanos e ratos podemos identificar um paralelismo na expressão rítmica, sendo que ambos apresentam um padrão circadiano na atividade motora/ CVS, temperatura e secreção hormonal, entre outros, sincronizado ao claro/escuro ambiente e com período em livre curso com duração acima de 24 horas, embora haja diferença na alocação das fases, já que estamos tratando de uma espécie diurna

(humanos) e outra noturna (ratos). O perfil temporal polifásico do ciclo vigília/sono de roedores em contraste com o padrão monofásico humano é outra distinção que precisa ser levada em consideração em eventuais analogias entre essas espécies.

Embora para o estudo do desenvolvimento do sistema nervoso central, babuínos sejam considerados os melhores modelos, havendo um pareamento de cada fase do desenvolvimento encefálico destes animais com o de fetos humanos (11,14), a maior parte dos estudos utiliza de fato experimentos com roedores. Homens e ratos fazem parte de espécies altriciais, coincidindo na extrema dependência dos adultos para a sobrevivência inicial e no desenvolvimento extra-uterino (e consideravelmente influenciado pela experiência sensorial) de boa parte das suas funções.

Também em relação ao desenvolvimento dos ritmos biológicos podemos identificar convergência entre homens e ratos. Assim, em ambos encontramos um padrão ultradiano na atividade motora no início da vida, que é progressivamente substituído por um ritmo circadiano. Cambras et al. demonstraram que a permanência em um ambiente com luz constante durante a lactação permite o estabelecimento de um ritmo circadiano na atividade motora em ratos em uma condição que habitualmente leva à arritimicidade no animal adulto, modificando permanentemente o funcionamento do sistema de temporização, já que estes animais uma vez expostos a LL na vida adulta conservam o ritmo circadiano (25,26,27).

Recém-nascidos humanos também estão em um ambiente no qual as luzes permanecem constantemente acesas, em que pese, entretanto, a diferença crucial de que a espécie humana é diurna. Além disso, para os bebês do nosso estudo, fatores de mascaramento na unidade de cuidado neonatal, como a alimentação, parecem ter maior interferência imediata sobre a expressão dos ritmos de atividade motora e do CVS que a condição de iluminação. Esta interferência, entretanto, cessa logo após a alta hospitalar, sendo observada a emergência de um ritmo circadiano mais robusto, o qual persiste desde então. Assim, as condições ambientais nesta fase inicial da vida de neonatos humanos não parece interferir no desenvolvimento posterior dos ritmos biológicos ao menos nos primeiros 6 meses de vida. Há autores, entretanto, que demonstraram a presença de modificações na distribuição dos cronotipos em adolescentes e adultos jovens que foram prematuros e permaneceram sob condição de luz constante, com uma curva claramente desviada para a matutuidade, sugerindo que modificações em um prazo mais longo poderiam ser observadas (63,64).

No nosso estudo identificamos que o ritmo circadiano da temperatura precede o ritmo circadiano na atividade motora em ambas as espécies, confirmando as observações de outros autores (47, 72). Nos recém-nascidos humanos identificamos um ritmo circadiano na

temperatura do punho desde a segunda semana de vida, mas nos ratos, como a coleta só foi iniciada a partir do desmame, estes já exibiam um ritmo circadiano de temperatura desde o primeiro dia. Ainda assim, podemos dizer que a mesma relação entre o padrão sequencial de emergência do ritmo circadiano da temperatura e da atividade/motora é encontrado em ambas as espécies.

A partir do paradigma de luz constante durante a lactação em roedores, Díez-Noguera propôs (1,86) um modelo teórico de múltiplos osciladores acoplados e elementos neutros, no qual a luz constante funcionaria como uma interferência dificultando este acoplamento e com isto produzindo perda da ritmicidade. Entretanto, animais jovens, e com maior plasticidade do sistema nervoso central, ao serem criados em LL, desenvolvem um ritmo circadiano nesta condição, possivelmente pelo estabelecimento de conexões mais robustas entre os osciladores, o que impediria a perda de ritmicidade sob luz constante na vida adulta. Nesse modelo, em um conjunto de osciladores de velocidades similares, mas não idênticas, é possível modificar o período resultante do sistema variando o grau de acoplamento entre os osciladores.

O desenvolvimento de ritmo circadiano mesmo em condições tão desfavoráveis como a de luz constante nos ratos e em ambientes pobres em ritmos de 24 horas e, por outro lado, com ritmos de períodos mais curtos, como os impostos em unidades de cuidado neonatal, demonstra a importância evolutiva dos ritmos biológicos na adaptação dos organismos a um ambiente previsivelmente flutuante. Considerando-se que as pressões seletivas agiriam sobre as relações de fase entre o ritmo biológico e o ciclo ambiental (85), um modelo multioscilaria garantiria plasticidade suficiente ao sistema para adaptar-se a modificações dessas relações de fase ao longo da ontogênese.

O comportamento da expressão rítmica em neonatos humanos corrobora a hipótese de múltiplos osciladores, ao observarmos a transição de um padrão ultradiano para um padrão circadiano no CVS e na atividade motora, em idades distintas e, por outro lado, a evolução mais precoce e menos suscetível à interferência de mascaramento ambiental do ritmo de temperatura do punho. Também é compatível com este modelo a presença de mais de um período circadiano na temperatura do punho, sugerindo ao menos dois conjuntos de osciladores desacoplados, manifestação esta que poderia ser justificada pela imaturidade das conexões e ausência de um *zeitgeber* suficientemente robusto para ancorar o conjunto global de osciladores (48).

No assim chamado modelo de Barcelona (1) propunham-se como osciladores conjuntos neuronais, possivelmente situados nos núcleos supraquiasmáticos. Entretanto, com os estudos posteriores dissecando a organização molecular do sistema de temporização,

tornou-se mais complexo identificar anatomicamente esses elementos oscilatórios, sendo possível mesmo a sua distribuição por todo o organismo.

No nosso estudo em roedores, utilizamos melatonina durante a lactação e após o desmame de ratos jovens procurando identificar outros fatores além da luz constante que pudessem interferir na organização do sistema de temporização endógeno. Apenas nas fêmeas que receberam melatonina durante a lactação encontramos modificação persistente no sistema de temporização, com um período significativamente mais curto do ritmo circadiano. Embora a explicação para esse resultado ainda seja desconhecida, é possível que esta alteração no período das fêmeas seja mediada por receptores de estrógeno, substância capaz de promover encurtamento do período do ritmo circadiano em ratas ovariectomizadas.

Assim, no nosso experimento não pudemos avançar na explicação dos mecanismos pelos quais a presença de luz constante durante a lactação consegue modificar de modo permanente a organização do sistema de temporização. Acreditamos, entretanto, que ao menos parte das modificações promovidas sobre a expressão dos ritmos biológicos pela sua interação com ciclos ambientais possa se dar por mecanismos epigenéticos. Animais *knockout* para o gene relógio *Per3* não exibem arritmicidade sob luz constante (comunicação pessoal Mario Pedrazzoli), sendo uma explicação possível para os achados de Cambras e Díez-Noguera que a condição de LL durante a lactação leve a um silenciamento de *Per3*, de modo que estes animais mantêm o ritmo circadiano em luz constante. Diante dessa nova perspectiva de interação entre os ciclos ambientais e os ritmos biológicos, mesmo modificações transitórias como as observadas em neonatos humanos podem encontrar uma fonte de explicação. São poucos ainda os estudos explorando a regulação epigenética do mecanismo circadiano, entretanto, algumas enzimas, como as kinases e deacetilases de histonas, que interagem com os genes relógio, também estão envolvidas na remodelação de cromatina (87). Masri e Sassone-Corsi, 2010, sugerem que uma rede de fatores de transcrição e proteínas regulatórias, compondo um epigenoma circadiano estabeleça um estado permissivo para a abertura cíclica de determinados *loci* de cromatina, permitindo a expressão de genes controlados pelo relógio específicos para cada tecido (88). Esta remodelação de cromatina poderia estar implicada em uma “memória circadiana”, que permitiu que os organismos evolutivamente se antecipassem a um ambiente cíclico.

5 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

No presente estudo avaliamos recém-nascidos mantidos em uma unidade de cuidado neonatal na qual ainda é mantido o protocolo de claro constante. Sabemos, entretanto, que esta já não é a realidade de grande parte dos serviços, uma vez que a orientação atual é manter os recém-nascidos em condição de penumbra constante. Assim, é possível que nossos resultados não sejam aplicáveis a essa nova população de recém-nascidos. Temos, ainda, como limitação evidente a pequena quantidade de sujeitos participantes, particularmente durante a etapa domiciliar, o que limita a generalização dos resultados. Este número reduzido de sujeitos é decorrente do trabalhoso protocolo do estudo, requerendo o preenchimento de diários por tempo prolongado, o que levou à desistência da maioria das famílias. Além disso, também requer a utilização do actímetro e do termistor, os quais podem ser grandes para a superfície corpórea de um recém-nascido, dificultando a aceitação das famílias.

Também tivemos problemas com os aparelhos, com perdas transitórias ou permanentes de termistores e actímetros, bem como mau funcionamento dos actímetros, o que levou à perda de alguns dias de coleta para a maioria dos sujeitos. Os dados de iluminação só foram coletados para alguns bebês, pois apenas no final da fase de coleta tivemos um aparelho que realizasse o registro e o armazenasse em sua memória e cujo tamanho fosse pequeno o suficiente para ser colocado no berçário. Também tivemos perda de dados do diário durante a internação, devido à dificuldade da equipe de conciliar seu preenchimento com as demandas das rotinas hospitalares.

Este foi um estudo de campo, no qual não interferimos nas rotinas hospitalares e domiciliares, portanto, não havendo a possibilidade de introduzir mudanças experimentais de modo a testar hipóteses. Além disso, verificamos um importante mascaramento imposto pelas rotinas do hospital, particularmente o padrão de alimentação, de modo que todas as nossas observações estão impregnadas por este fator. Sabemos da dificuldade em modificar as rígidas rotinas hospitalares, entretanto, o acúmulo de evidências provenientes dos estudos de ritmos biológicos aponta para prováveis vantagens no estabelecimento de um ambiente cíclico na fase neonatal.

Outras limitações incluíram o tempo limitado da pesquisadora responsável pela opção em comum acordo com o orientador de manter as demais atividades profissionais, o que, por outro lado, possibilitou o contato com outras unidades de cuidado neonatal e suas rotinas. Foi ainda um obstáculo a mudança de unidade dentro da Universidade, colocando-nos em local mais distante daquele onde foi realizada a coleta.

Os experimentos em animais também foram realizados segundo um protocolo de coleta longitudinal, de modo que demandam tempo prolongado e os resultados se significativos ou não são conhecidos apenas no final do experimento. Acreditamos que esses experimentos se beneficiariam de replicação com maior número de animais, sendo possível que alguns resultados não tenham atingido significância estatística devido ao pequeno número de ratos utilizados. Da mesma forma, seria importante utilizar um número maior de mães, de modo a atenuar a variabilidade do grupo e eventualmente dosar melatonina das mesmas, garantindo que tenha havido aumento do nível plasmático e que o mesmo não seja rítmico. Tentamos realizar dosagem de melatonina de alguns filhotes, o que não foi possível por questões técnicas.

Os estudos em animais estiveram limitados pelo tempo curto (6 meses) do estágio realizado no laboratório do professor Antoni Díez-Noguera, o que, entretanto, abre a perspectiva de colaborações futuras.

6 CONCLUSÕES

Estudando a ontogênese dos ritmos biológicos em humanos e em ratos encontramos padrões similares de evolução nas duas espécies. Ambos apresentam predomínio de um ritmo circadiano na temperatura precocemente e antecedendo a expressão deste na atividade/repouso. Em recém-nascidos humanos encontramos ritmo circadiano na temperatura do punho desde 29 semanas de idade pós-concepcional, indicando um sistema circadiano potencialmente funcional desde a fase pré-natal. Por outro lado, a atividade/repouso exhibe inicialmente um padrão ultradiano para ambas as espécies, evoluindo progressivamente para um ritmo circadiano, mesmo em vigência de condições ambientais desfavoráveis, o que evidencia um sistema plástico o suficiente para modificar transitoriamente sua relação com o ambiente de modo a desenvolver uma função importante para sua adaptação futura.

Em humanos o ciclo vigília/sono apresenta um ritmo de 3 horas, fortemente mascarado pelos rígidos horários de alimentação da unidade de cuidado neonatal, o qual, entretanto, desaparece logo após a alta, cedendo lugar a um ritmo circadiano. O comportamento alimentar, por sua vez, evolui com perda de qualquer ritmicidade, o que demonstra que o padrão de alimentação a cada 3 horas é um artifício imposto pelo ambiente e não um comportamento espontâneo do bebê e sua relação rítmica com o CVS potencialmente inexistente em condições naturais.

Nos ratos jovens com a possibilidade de realizar exercícios em uma roda observamos uma evidente atuação de reforço do exercício físico sobre a expressão do componente circadiano, sugerindo uma possível ação de indução do acoplamento de osciladores, embora esta pareça ser uma ação transitória. Nos animais que receberam melatonina durante a lactação encontramos modificação persistente com encurtamento do período do ritmo circadiano apenas para as fêmeas, eventualmente por uma atuação via receptor de estrógeno. Já a melatonina após o desmame mostra uma tendência no sentido de dificultar a consolidação do ritmo circadiano, possivelmente por ser um sinal contraditório em relação à luz constante do ambiente.

Deste modo, sugerimos que o sistema de temporização de humanos e de roedores mesmo encontrando-se em condições ambientais desfavoráveis na fase neonatal é capaz de adaptar-se, desenvolvendo ritmicidade circadiana em diferentes variáveis biológicas. Sistemas de múltiplos osciladores podem estar na base da organização do sistema de temporização endógeno garantindo a plasticidade necessária para as modificações das relações de fase com

o ambiente ao longo da ontogênese e mecanismos epigenéticos emergem com a perspectiva de preencher lacunas na elucidação da delicada relação entre os seres vivos e o seu ambiente.

Novos estudos investigando o desenvolvimento dos ritmos biológicos em recém-nascidos serão necessários, de modo a promover melhor cuidado hospitalar para aqueles que nascem pré-termo e orientações mais adequadas às famílias.

REFERÊNCIAS*

- 1- MARQUES, N.; MENNA-BARRETO, L (Orgs). **Cronobiologia: princípios e aplicações**. 3. ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2003.
- 2- MOORE, R. Y.; EICHLER, V. B. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. **Brain Research**, v. 42, p. 201-206, 1972.
- 3- MILLER, J. D. On the nature of the circadian clock in mammals. **American Journal of Physiology**, v. 264, n. 33, p. 821-832, 1993.
- 4- GORMAN, M. R.; LEE, T. M. Daily novel wheel running reorganizes and split hamster circadian activity rhythms. **Journal of Biological Rhythms**, v. 16, n. 6, p. 541-550, 2001.
- 5- BROWN, R. L.; ROBINSON, P. R. Melanopsin – shedding light on the elusive circadian photopigment **Chronobiology International**, v. 21, n. 2, p. 189-204, 2004.
- 6- TRAVNICKOVA A.; ILLNEROVA, H. Melatonin entrainment of the circadian N-acetyltransferase rhythm in the newborn rat pineal gland. **Journal of Pineal Research**, v. 23, p. 136-141, 1997.
- 7- MROSOVSKY, N. Locomotor activity and non-photoc influences on circadian clocks. **Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 71, n. 3, p. 343-372, 1996.
- 8- MISTELBERGER, R. E. Nonphotic entrainment of circadian activity rhythms in suprachiasmatic nuclei ablated hamsters. **Behavioral Neuroscience**, v. 1, p. 192-202, 1992.
- 9- SCHIBLER, U.; RIPPERGER, J.; BROWN, S. A. Peripheral circadian oscillators in mammals: time and food. **Journal of Biological Rhythms**, v. 18, n. 3, p. 250-260, 2003.
- 10- EL-HENMANY, R.; BENDOÁ, K. M. Z.; SOSNIYENKO, S.; SUMOVÁ, A, Maternal control of the fetal and neonatal rat suprachiasmatic nucleus. **Journal of Biological Rhythms**, v. 23, n. 5, p. 435-444, 2008.
- 11- RIVKEES, S. A. Developing circadian rhythmicity in infants. **Pediatrics**, v. 112, n. 2, p. 373-381, 2003.

* De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

- 12- REPPERT, S. M.; SCHWARTZ, W. J. Maternal suprachiasmatic nuclei are necessary for maternal coordination of the developing circadian system. **Journal of Neuroscience**, v. 6, n. 9, p. 2724-2729, 1986.
- 13- DAVIS, F. C.; GORSKI, R.A. Development of hamster circadian rhythms: role of the maternal suprachiasmatic nucleus. **Journal of Comparative Physiology**, v. 162, n. 5, p. 601-610, 1988.
- 14- RIVKEES, S. A; HAO, H. Developing circadian rhythmicity. **Seminars in Perinatology**, v. 4, n. 4, p. 232-242, 2000.
- 15- RUGGIERO, L.; ALLEN, C. N.; BROWN, R. L.; ROBINSON, D. W. The development of melanopsin-containing retinal ganglion cells in mice with early retinal degeneration. **European Journal of Neuroscience**, v. 29, p. 359-367, 2009.
- 16- KENNAWAY, D. J. Melatonin and development: physiology and pharmacology. **Seminars in Perinatology**, v. 4, n. 4, p. 232-242, 2000.
- 17- ILLNEROVA, H. The effect of constant light from birth on the appearance of diurnal rhythm in serotonin content in the rat epiphysis. **Developmental Biology**, v. 46, p. 418-421, 1975.
- 18- SHAWN, A.; KENNAWAY, R.; KENNAWAY, D. Melatonin in rat milk and the likelihood of its role in postnatal maternal entrainment of rhythms. **American Journal of Physiology Regulatory Integrative Comp. Physiol.**, v. 282, p. 797-804, 2002.
- 19- MUNOZ-HOYOS, A.; JALDO-ALBA, F.; MOLINA-CARBALLO, A.; RODRIGUES-CABEZAS, T.; MOLINA-FONT, J. A.; ACUNA-CASTROVIEJO, D. Absence of plasma melatonin circadian rhythm during the first 72 hours of life in human infants. **Journal of Clinical and Endocrinological Metabolism**, v. 77, n. 3, p. 699-703, 1993.
- 20- JALDO-ALBA, F.; MUNOZ-HOYOS, A.; MOLINA-CARBALLO, A.; MOLINA-FONT, J. A.; ACUNA-CASTROVIEJO, D. Light deprivation increases plasma levels of melatonin during the first 72h of life in human infants. **Acta Endocrinologica**, v. 129, p. 442-445, 1993.
- 21- KENNAWAY, D. J.; STAMP, G. E.; GOBLE, F. C. Development of melatonin production in infants and the impact of prematurity. **Journal of Clinical and Endocrinological Metabolism**, v. 75, n. 2, p. 367-369, 1992.
- 22- KENNAWAY, D. J.; GOBLE, F. C.; STAMP, G. E. Factors influencing the development of melatonin rhythmicity in humans. **Journal of Clinical and Endocrinological Metabolism**, v. 81, n. 4, p. 1525-1532, 1996.
- 23- CUBERO, J.; VALERO, V.; SÁNCHEZ, J.; RIVERO, M.; PARVEZ, H.; RODRÍGUEZ, A. B.; BARRIGDA, C. The circadian rhythm of tryptophan in breast milk affects the rhythms of 6-sulfatoxymelatonin and sleep in newborn. **Neuroendocrinology Letters**, v. 26, n. 6, p. 657-661, 2005.

- 24- SERRON-FERRE, M.; VALENZUELA, G. J.; TORRES-FARFAN, C. Circadian clocks during embryonic and fetal development. **Birth Defects Research** (Part C), v. 81, p. 204-214, 2007.
- 25- CAMBRAS, T.; CANAL, M. M.; TORRES, A.; VILAPLANA, J.; DÍEZ-NOGUERA, A. Manifestation of circadian rhythm under constant light depends on the lighting conditions during lactation. **American Journal of Physiology**, v. 272, p. 1039-1046, 1997.
- 26- CAMBRAS, T.; VILAPLANA, J.; TORRES, A.; CANAL M. M.; CASAMITJANA, A.; CAMPUZANO, A.; DÍEZ-NOGUERA, A. Constant bright light (LL) during lactation in rats prevents arrhythmicity due to LL. **Physiology and Behavior**, v. 63, p. 875-882, 1998.
- 27- CANAL-CORRETGER, M. M; VILAPLANA, J.; CAMBRAS, T.; DÍEZ-NOGUERA, A. Functioning of the rat circadian system is modified by light applied in critical postnatal days. **American Journal of Physiology Regulatory Integrative Comp. Physiol.**, v. 280, p. 1023-1030, 2001.
- 28- KLEITMAN, N.; ENGELMAN, G. Sleep characteristics of infants. **Journal of Applied Physiology**, v. 6, p. 269-282, 1953.
- 29- PARMELEE, A. H. Sleep patterns in infancy. A study of one infant from birth to eight months of age. **Acta Paediatrica**, v. 50, p. 160-170, 1961.
- 30- HELLBRUGGE, T. The development of circadian rhythms in infants. In **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 25, p. 311-323, 1960.
- 31- MENNA-BARRETO, L.; BENEDITO-SILVA, A. A.; MARQUES, N.; ANDRADE, M. M. M.; LOUZADA, F. Ultradian components of the sleep-wake cycle in babies. **Chronobiology International**, v. 10, n. 2, p. 103-108, 1993.
- 32- LOHR, B.; SIEGMUND, R. Ultradian and circadian rhythms of sleep-wake and food-intake behaviour during early infancy. **Chronobiology International**, v. 16, n. 2, p. 129-148, 1999.
- 33- MENNA-BARRETO, L.; ISOLA, A.; LOUZADA, F.; BENEDITO-SILVA, A. A; MELLO, L.. Becoming circadian – a one year study of the development of the sleep-wake cycle in children. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 29, n. 1, p. 125-129, 1996.
- 34- HENDERSON, J. M. T.; HENDERSON, K. G. F.; OWENS, J. L.; BLAMPIED, N. M. Sleeping through the night: the consolidation of self-regulated sleep across the first year of life. **Pediatrics**, v. 126, n. 5, p. 1081-1087, 2010.
- 35- MCGRAW, K.; HOFFMANN, R.; HARKER, C.; HERMAN, J. H. The development of circadian rhythms in a human infant. **Sleep**, v. 22, n. 3, p. 303-310, 1999.

- 36- SHIMADA, M.; TAKAHASHI, K.; SEGAWA, M.; HIGURASHI, M.; SAMEJIN, M.; HORIUCHI, K. Emmerging and entraining patterns of the sleep-wake rhythm in preterm and term infants. **Brain and Development**, v. 21, p. 468-473, 1999.
- 37- JENNI, O. G.; DEBOER, T.; ACHERMANN, P. Development of the 24-h rest-activity pattern in human infants. **Infant Behavior and Development**, v. 29, p. 143-152, 2006.
- 38- SADEH, A.; LAVIE, P.; SCHER, A.; TIROSH, E.; EPSTEIN, R. Actigraphic home-monitoring sleep-disturbed and control infants and young children: a new method for pediatric assessment of sleep-wake patterns. **Pediatrics**, v. 87, n. 4, p. 494-499, 1991.
- 39- SO, K.; BUCKLEY, P.; ADAMSON, M.; HORNE R. S. C. Actigraphy correctly predicts sleep behavior in infants who are younger than six months, when compared with polysomnography. **Pediatric Research**, v. 58, n. 4, p. 761-765, 2005.
- 40- GNIDOVEC, B.; NEUBAUER, D.; ZIDAR, J. Actigraphic assessment of sleep-wake rhythm during the first 6 months of life. **Clinical Neurophysiology**, v. 113, p. 1815-1821, 2002.
- 41- SO, K.; ADAMSON, M. T.; HORNE, R. S. C. The use of actigraphy for assessment of the development of sleep/wake patterns in infants during the first 12 months of life. **Journal of Sleep Research**, v. 16, p. 181-187, 2007.
- 42- SUNG, M.; ADAMSON, M. T.; HORNE, R. S. C. Validation of actigraphy for determining sleep and wake in preterm infants. **Acta Paediatrica**, v. 98, p. 52-57, 2009.
- 43- NISHIHARA, K.; HORIUCHI, S.; ETO, H.; UCHIDA, S. The development of infants' circadian rest-activity rhythm and mothers' rhythm. **Physiology and Behavior**, v. 77, p. 91-98, 2002.
- 44- WULF, K.; SIEGMUND, R. Circadian and ultradian time patterns in human behavior: Part 1: activity monitoring of families from prepartum to postpartum. **Biological Rhythm Research**, v. 31, n. 5, p. 581-602, 2000.
- 45- WULF, K.; DEDEK, A.; SIEGMUND, R. Circadian and ultradian time patterns in human behavior: Part 2: social synchronization during the development of the infant's diurnal activity-rest pattern. **Biological Rhythm Research**, v. 32, n. 5, p. 529-546, 2001.
- 46- LODEMORE, M.; PETERSEN, S. A.; WAILOO, M. P. Development of night time temperature rhythms over the first six months of life. **Archives of Disease in Childhood**, v. 66, p. 521-524, 1991.
- 47- MIRMIRAN, M.; KOK, J. H. Circadian rhythms in early human development. **Early Human Development**, v. 26, n. 2, p. 121-128, 1991.
- 48- TENREIRO, S.; DOWSE, H. B.; MINORS, D.; CHISWICK, M.; SIMMS, D.; WATERHOUSE, J. The development of ultradian and circadian rhythms in

- premature babies maintained in constant conditions. **Early Human Development**, v. 27, p. 33-52, 1991.
- 49- GUILLEMINAULT, C.; LEGER, D.; PELAYO, R.; GOULD, S.; HAYES, B.; MILES, L. Development of circadian rhythmicity of temperature in fullterm normal infants. **Clinical Neurophysiology**, v. 26, p. 21-29, 1996.
 - 50- DAVIDSON, A. J.; AUJARD, F.; LONDON, B.; MENAKER, M.; BLOCK, G. D. Thermochron ibuttons: an inexpensive method for long-term recording of core body temperature in untethered animals. **Journal of Biological Rhythms**, v. 18, n. 5, p. 430-432, 2003.
 - 51- LICHTENBELT, W. D. M.; DAANEN, H. A. M.; WOUTERS, L.; FRONCZEK, R.; RAYMANN, R. J. E. M.; SEVERENS, N. M. W.; VAN SOMEREN, E. J. W. Evaluation of wireless determination of skin temperature using iButtons. **Physiology and Behavior**, v. 88, p. 489-497, 2006.
 - 52- AREAS, R.; DUARTE, L.; MENNA-BARRETO, L.. Comparative analysis of rhythmic parameters of the body temperature in humans measured with thermistors and digital thermometers. **Biological Rhythm Research**, v. 37, n. 5, p. 419-424, 2006.
 - 53- SARABIA, J. A.; ROL, M. A.; MENDIOLA, P.; MADRID, J. A. Circadian rhythm of wrist temperature in normal-living subjects: A candidate of new index of the circadian system. **Physiology and Behavior**, v. 95, n. 4, p. 570-580, 2008.
 - 54- MANN, N. P.; HADDOW, R.; STOKES, L.; GOODLEY, S.; RUTTER, N. Effect of night and day on preterm infants in a newborn nursery: randomised trial. **British Medical Journal**, v. 193, p. 1265-1267, 1986.
 - 55- BRANDON, D. H.; HOLDITCH-DAVIS, D.; BELYEA, M. Preterm infants born at less than 31 weeks' gestation have improved growth in cycled light compared with continuous near darkness. **Journal of Pediatrics**, v. 140, n. 2, p.192-199, 2002.
 - 56- MIRMIRAN, M.; BALDWIN, R. B.; ARIAGNO, R. L. Circadian and sleep development in preterm infants occurs independently from the influences of environmental lighting. **Pediatric Research**, v. 53, n. 6, p. 933-938, 2003.
 - 57- GLOTZBACH, S. F.; EDGAR, D. M.; ARIAGNO, R. L. Biological Rhythmicity in preterm infants prior to discharge from neonatal intensive care. **Pediatrics**, v. 95, n. 2, p. 231-237, 1995.
 - 58- GLOTZBACH, S. F.; EDGAR, D. M.; BOEDDIKER, M.; ARIAGNO, R. L. Biological Rhythmicity in NORMAL infants during the first 3 months of life. **Pediatrics**, v. 94, n. 4, p. 482-488, 1994.
 - 59- BUENO, C; DIAMBRA, L; MENNA-BARRETO, L. Sleep-wake and temperature rhythms in preterm babies maintained in a neonatal care unit. **Sleep Research Online**, v. 4, n. 3, p. 77-82, 2001.

- 60- SHIMADA, M.; SEGAWA, M.; HIGURASHI, M. Development of the sleep and wakefulness rhythm in preterm infants discharged from a neonatal care unit. **Pediatric Research**, v. 33, p. 159-163, 1993.
- 61- ARDURA, J.; ANDRES, J.; ALDANA, J.; REVILLA, M. A. Development of sleep-wakefulness rhythm in premature babies. **Acta Paediatrica**, v. 84, p. 484-489, 1995.
- 62- MACMILLEN, I. C.; KOK, J. S. M.; ADAMSON, T. M.; DEAYTON, J. M.; NOWAK, R. Development of circadian sleep-wake rhythms in preterm and fullterm infants. **Pediatric Research**, v. 20, n. 4, p. 381-384, 1991.
- 63- NATALE, V.; SANSVINI, A.; TROMBINI, E.; ESPOSITO, M. J.; ALESSANDRONI, R.; FALDELLA G. Relationship between preterm birth and circadian typology in adolescence. **Neuroscience Letters**, v. 382, n. 1-2, p. 139-142, 2005.
- 64- STRANG-KARLSSON, S.; KAJANTIE, E.; PESONEN, A. K.; RÄIKKÖNEN, K.; HOVI, P.; LAHTI, J.; HEINONEN, K.; JÄRVENPÄÄ, A. L. ; ERIKSSON, G. J.; ANDERSSON, S.; PAAVONEN, E. J. Morningness propensity in young adults born prematurely: the Helsinki study of very low birth weight adults. **Chronobiology International**, v. 27, n. 9-10, p. 1829-1842, 2010.
- 65- DIEZ-NOGUERA, A. "El Temps" version 1: software. 1999. Disponível em: <http://www.farmacia.far.ub.es/pub/crono/El_temps.zip>. Acesso em: 20 mar. 2011.
- 66- BACH, V.; TELLIEZ, F.; KRIM, G.; LIBERT, J. P. Body temperature regulation in the newborn infant: interaction with sleep and clinical implications. **Neurophysiological Clinics**, v. 26, p. 379-402, 1996.
- 67- THOMAS, K. A. Biological rhythm development in preterm infants: does health status influence body temperature circadian rhythm? **Research in Nursing and Health**, v. 24, p. 170-180, 2001.
- 68- KRÄUCHI, K.; WIRZ-JUSTICE, A. Circadian rhythm of heat production, heart rate and skin and core temperature under unmasking conditions in men. **American Journal of Physiology**, v. 267, n. 3, pt. 2, p. 819-829, 1994.
- 69- KRÄUCHI, K. The thermophysiological cascade leading to sleep initiation in relation to phase of entrainment. **Sleep Medicine Reviews**, v. 11, n. 6, p. 439-51, 2007.
- 70- BROWN, P. J.; DOVE, R. A.; TUFFNELL, C. S.; FORD, R. P. K. Oscillations of body temperature at night. **Archives of Disease in Childhood**, v. 67, p. 1255-1258, 1992.
- 71- KORTE, J.; WULFF, K.; OPPE, C.; SIEGMUND, R. Ultradian and circadian activity-rest rhythms of preterm neonates compared to full-term neonates using actigraphic monitoring. **Chronobiology International**, v. 18, n. 4, p. 697-708, 2001.

- 72- NUESSEIN, B.; SCHMIDT I. Development of circadian cycle of core temperature in juvenile rats. **American Journal of Physiology**, v. 259, n. 2, pt. 2, p. 270-276, 1990.
- 73- REPPERT, S. M. Maternal entrainment of the developing circadian system. **Annals of New York Academy of Science**, v. 453, p. 162-169, 1985.
- 74- MARUMOTO, N.; MURAKAMI, N.; KATAYAMA, T.; KURODA, H.; MURAKAMI, T. Effects of daily injections of melatonin on locomotor activity rhythms in rats maintained under constant bright or dim light. **Physiology and Behavior**, v. 60, n. 3, p. 767-773, 1996.
- 75- ZUCKER, I.; FITZGERALD, F. M.; MORIN, L. P. Sex differentiation of the circadian system in golden hamster. **American Journal of Physiology**, n. 238, p. 97-101, 1980.
- 76- GORSKI, R. A.; GORDON, J. H.; SHRYNE, J. E.; SOUTHAM, A. M. Evidence of a morphological sex difference within the medial preoptic area of the rat brain. **Brain Research**, v. 148, p. 333-346, 1978.
- 77- DÍEZ-NOGUERA, A; CAMBRAS T. Sex differences in the development of the motor activity circadian rhythm in rats under constant light. **Physiology and Behavior**, v. 47, p. 889-894, 1990.
- 78- GOLDMAN, B. D. The circadian timing system and reproduction in mammals. **Steroids**, v. 64, p. 679-685, 1999.
- 79- MALPAUX, B.; MIGAUD, M.; TRICOIRE, H.; CHEMINEAU, P. Biology of mammalian photoperiodism and the critical role of the pineal gland and melatonin. **Journal of Biological Rhythms**, v. 16, n. 4, p. 336-347, 2001.
- 80- ALBERS, H. E. Gonadal hormones organize and modulate the circadian system of the rat. **American Journal of Physiology**, v. 241, p. R62-R66, 1981.
- 81- ITOH, M. T.; HOSAKA, T.; TAKAHASHI, N.; ISHIZUKA, B. Expression of luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor in the rat pineal gland. **Journal of Pineal Research**, v. 41, n. 1, p. 35-41, 2006.
- 82- SKORUPA, A. L.; GARIDOU, M. L.; BOTHOREL, B.; SABOUREAU, M.; PÉVET, P.; NETO, J. C.; SIMONNEAUX, V. Pineal melatonin synthesis and release are not altered throughout the estrous cycle in female rats. **Journal of Pineal Research**, v. 34, n. 1, p. 53-59, 2003.
- 83- MORIN, L. P.; FITZGERALD, K. M.; ZUCKER, I. Estradiol shortens the period of hamster circadian rhythms. **Science**, v. 196, p. 305-307, 1977.
- 84- CASSONE, V. M.; WARREN, W. S.; BROOKS, D. S.; LU, J. Melatonin, the pineal gland and circadian rhythms. **Journal of Biological Rhythms**, v. 8, p. S73-S81, 1993. Suppl.

- 85- PARANJPE, D. A.; SHARMA, V. K. Evolution of temporal order in living organisms. **Journal of Circadian Rhythms**, v. 3, n. 1, p. 7, 2005.
- 86- CANAL-CORRETGER, M. M; CAMBRAS, T.; VILAPLANA, J.; DÍEZ-NOGUERA, A. The manifestation of motor activity circadian rhythm of blinded rats depends on the lighting conditions during lactation. **Chronobiology International**, v. 20, n. 3, p. 441-450, 2003.
- 87- BELLE, M. M.; SASSONE-CORSI, P. Mammalian circadian clock and metabolism – the epigenetic link. **Journal of Cell Science**, v. 15, n. 123, pt. 22, p. 3837-3848, 2010.
- 88- MARSI, S.; SASSONE-CORSI, P. Plasticity and specificity of the circadian epigenome. **Nature Neuroscience**, v. 13, n. 11, p. 1324-1328, 2010.

ANEXOS

ANEXO A – Termo de consentimento esclarecido

Universidade de São Paulo

Consentimento Pós-Informação para Participação no Projeto de Pesquisa de Mestrado

Orientador: Luiz Menna Barreto

Orientanda: Clarissa Bueno

Projeto: **Análise Comparativa da Ritmicidade Biológica em Bebês de Termo e Pré-Termo**

Os ritmos biológicos estão presentes na vida diária das pessoas. Por exemplo, você dorme de noite e fica acordado durante o dia, o seu coração bate em uma determinada frequência, a sua temperatura oscila ao longo do dia, assim como seus hormônios, por exemplo a melatonina, que só é produzida à noite. Entretanto, isto ocorre desta forma nos adultos. Nos bebês estes ritmos se manifestam de maneira diferente: como sabemos, os bebês dormem e acordam várias vezes durante o dia e durante a noite também. Assim, como o sono, os outros ritmos (a temperatura, a alimentação, a melatonina) também são diferentes nos recém-nascidos.

O que pretendemos neste estudo é determinar como são estes ritmos nos bebês de termo (nascidos no tempo normal de gestação) e nos bebês prematuros (nascidos com menos de 37 semanas de gestação) e como o ambiente (luz, alimentação) pode influenciá-los.

Para isto, vamos analisar os ritmos de sono/vigília, alimentação, temperatura e melatonina em bebês prematuros e em bebês de termo. Este estudo será feito durante a permanência no berçário e em casa.

No Hospital a coleta dos dados será feita pela equipe de enfermagem e pela aluna responsável, continuamente, e consistirá em:

- colocar um actímetro no tornozelo do bebê (equipamento semelhante a um relógio que vai medir o quanto ele se movimenta ou fica parado) e anotar os horários em que o bebê está dormindo ou acordado.
- medir a temperatura do bebê por um termistor (aparelho semelhante a uma moeda) que será fixado no tórax do bebê. Caso algum bebê tenha reação alérgica ao equipamento, este será retirado e a coleta de temperatura será feita por um termômetro digital que será colocado na boca dos bebês a cada três horas, por 3 dias consecutivos;
- anotar os horários em que o bebê é alimentado e como isso é feito;
- medir a intensidade de luz que tem no ambiente e anotar todas as rotinas e procedimentos que forem realizados com o bebê;

Caso algum bebê tenha reação alérgica aos equipamentos, eles serão retirados imediatamente.

Em casa a coleta dos dados será feita pelos pais e/ou cuidadores responsáveis, por duas semanas seguidas a cada mês de idade do bebê, até que ele complete doze meses. Será feita da seguinte forma:

- anotar em um diário os horários em que o bebê dorme, acorda e se alimenta. Se o bebê ficar doente, internações ou viagens também deverão ser anotadas; anotar onde o bebê dorme e os horários de dormir e acordar dos pais;
- anotar o horário de claro (quando as luzes são acesas ou deixa-se a luz entrar no quarto onde está o bebê) e o horário de escuro (quando todas as luzes são apagadas na casa para dormir);
- a temperatura será obtida da mesma forma que tiver sido utilizada no berçário;
- em casa os bebês também usarão o actímetro no tornozelo;
- consulta médica uma vez por mês para avaliação do desenvolvimento do bebê

Os procedimentos são bem simples e não há riscos para os bebês. Entretanto, na eventualidade de ocorrência de qualquer dano à saúde ou intercorrência com o bebê em decorrência da

pesquisa, este tem à sua disposição toda a assistência passível de ser oferecida pelo HU/USP e, em casos de maior complexidade, será encaminhado ao SUS.

Todos os dados obtidos serão usados exclusivamente para fins de ensino e pesquisa e a identidade dos indivíduos não será revelada. Os indivíduos que participarem da pesquisa serão voluntários e não terão qualquer tipo de gratificação ou despesa. Informações adicionais sobre os procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa poderão ser solicitados a qualquer momento pelos pais e/ou responsáveis. Da mesma maneira, a qualquer momento os pais poderão interromper a participação do menor na pesquisa.

Após a análise dos dados informaremos os resultados de cada bebê aos pais e/ou responsáveis.

O trabalho é de responsabilidade do Professor Doutor Luiz Menna-Barreto e será realizado pela doutoranda Clarissa Bueno. Será realizado com as crianças que nascerem no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (USP).

Sujeito da pesquisa: _____

Responsável legal: _____

Sexo: _____, DN: _____, RG: _____, Tel: _____

Endereço: _____

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Projeto de Pesquisa.

São Paulo, _____ de _____ de 2006.

Responsável pelo menor

Luiz Menna Barreto
Orientador

Clarissa Bueno
Orientanda
Aluna responsável

Grupo Multidisciplinar de Desenvolvimento e Ritmos Biológicos
Responsável: Professor Doutor Luiz Menna Barreto
Avenida Prof. Lineu Prestes, 1524 – sala 120 Cidade Universitária – São Paulo/SP
Fone: (11) 30917254

Comissão de Ética e Pesquisa do Hospital Universitário – USP
Avenida Prof. Lineu Prestes, 2565 – Cidade Universitária – São Paulo/SP CEP:05508-900

ANEXO B – Diário hospitalar de atividade

DATA: ____/____/____

DIA DA SEMANA: _____

Peso atual: _____

NOME: _____

REGISTRO: _____

IDADE: _____

IGC: _____

1. H	07:00	07:10	07:20	07:30	07:40	07:50	08:00	08:10	08:20	08:30	08:40	08:50	09:00	09:10	09:20	09:30	09:40	09:50
Dormindo																		
Acordado																		
Alimentação																		
Manuseio																		
2. H	10:00	10:10	10:20	10:30	10:40	10:50	11:00	11:10	11:20	11:30	11:40	11:50	12:00	12:10	12:20	12:30	12:40	12:50
Dormindo																		
Acordado																		
Alimentação																		
Manuseio																		
H	13:00	13:10	13:20	13:30	13:40	13:50	14:00	14:10	14:20	14:30	14:40	14:50	15:00	15:10	15:20	15:30	15:40	15:50
Dormindo																		
Acordado																		
Alimentação																		
Manuseio																		
H	16:00	16:10	16:20	16:30	16:40	16:50	17:00	17:10	17:20	17:30	17:40	17:50	18:00	18:10	18:20	18:30	18:40	18:50
Dormindo																		
Acordado																		
Alimentação																		
Manuseio																		
H	19:00	19:10	19:20	19:30	19:40	19:50	20:00	20:10	20:20	20:30	20:40	20:50	21:00	21:10	21:20	21:30	21:40	21:50
Dormindo																		
Acordado																		
Alimentação																		
Manuseio																		
H	22:00	22:10	22:20	22:30	22:40	22:50	23:00	23:10	23:20	23:30	23:40	23:50	0:00	0:10	0:20	0:30	0:40	0:50
Dormindo																		
Acordado																		
Alimentação																		
Manuseio																		
H	1:00	1:10	1:20	1:30	1:40	1:50	2:00	2:10	2:20	2:30	2:40	2:50	3:00	3:10	3:20	3:30	3:40	3:50
Dormindo																		
Acordado																		
Alimentação																		
Manuseio																		
H	4:00	4:10	4:20	4:30	4:40	4:50	5:00	5:10	5:20	5:30	5:40	5:50	6:00	6:10	6:20	6:30	6:40	6:50
Dormindo																		
Acordado																		
Alimentação																		
Manuseio																		

Preencher um traço em todo o intervalo de horários em que o bebê estiver dormindo, acordado, sendo alimentado ou sendo manuseado, na linha correspondente.

Volume da alimentação: _____ ml ou () livre demanda () SOG () VO

OBS: Quando o bebê tiver sido acordado por alguém (para manuseio ou dieta), colocar X no início do horário em que ele acordou, na linha correspondente a acordado.

3 Horários em que retirou e recolocou os aparelhos

A parêlho do tornozelo

Retirou: _____ Retirou: _____ Retirou: _____
Colocou: _____ Colocou: _____ Colocou: _____

Na impossibilidade do uso do termistor:

TEMPERATURA CORPÓREA

Anotar de 3 em 3 horas

H									
T°C									

Temperatura da Incubadora: Anotar de 3 em 3 horas

H									
T°C									

Intensidade Luminosa

Horário	Ambiente	RN
Manhã:		
Tarde:		
Noite:		

Fototerapia: () Não () Sim

Início: _____

Desligada: _____ Desligada: _____ Desligada: _____
Ligada: _____ Ligada: _____ Ligada: _____

Desligada: _____ Desligada: _____ Desligada: _____
Ligada: _____ Ligada: _____ Ligada: _____

Medicamentos Analgésicos e/ou sedativos

Horário

Observações e Intercorrências (com respectivos horários)

Aparêlho do punho

Retirou: _____ Retirou: _____ Retirou: _____
Colocou: _____ Colocou: _____ Colocou: _____

Procedimentos Dolorosos: Anotar horários em que foram realizados

Punção arterial	
Punção venosa (para coleta)	
Cateterização venosa periférica (acesso)	
Lanceta no calcanhar	
Remoção de fita adesiva	
Troca de curativo	
Inserção de tubo para gavagem (SNE)	
Cateterização vesical	
Injeção intramuscular	
Aspiração traqueal	
Fisioterapia respiratória	
Drenagem postural	
Punção lombar	
Punção suprapúbica	
Inserção/remoção cateter central	
Inserção/remoção tubo respiratório	
Ventilação mecânica	
Extubação/Intubação	
Remoção de sutura	
Broncoscopia	
Endoscopia	
Exame para retinopatia da prematuridade	
Procedimentos cirúrgicos	
Drenagem ventricular	
Circuncisão	

ANEXO C – Diário domiciliar de atividades

	00:00	00:10	00:20	00:30	00:40	00:50	01:00	01:10	01:20	01:30	01:40	01:50	02:00	02:10	02:20	02:30	02:40	02:50
Sono																		
Dieta																		
Escuro																		
	03:00	03:10	03:20	03:30	03:40	03:50	04:00	04:10	04:20	04:30	04:40	04:50	05:00	05:10	05:20	05:30	05:40	05:50
Sono																		
Dieta																		
Escuro																		
	06:00	06:10	06:20	06:30	06:40	06:50	07:00	07:10	07:20	07:30	07:40	07:50	08:00	08:10	08:20	08:30	08:40	08:50
Sono																		
Dieta																		
Escuro																		
	09:00	09:10	09:20	09:30	09:40	09:50	10:00	10:10	10:20	10:30	10:40	10:50	11:00	11:10	11:20	11:30	11:40	11:50
Sono																		
Dieta																		
Escuro																		
	12:00	12:10	12:20	12:30	12:40	12:50	13:00	13:10	13:20	13:30	13:40	13:50	14:00	14:10	14:20	14:30	14:40	14:50
Sono																		
Dieta																		
Escuro																		
	15:00	15:10	15:20	15:30	15:40	15:50	16:00	16:10	16:20	16:30	16:40	16:50	17:00	17:10	17:20	17:30	17:40	17:50
Sono																		
Dieta																		
Escuro																		
	18:00	18:10	18:20	18:30	18:40	18:50	19:00	19:10	19:20	19:30	19:40	19:50	20:00	20:10	20:20	20:30	20:40	20:50
Sono																		
Dieta																		
Escuro																		
	21:00	21:10	21:20	21:30	21:40	21:50	22:00	22:10	22:20	22:30	22:40	22:50	23:00	23:10	23:20	23:30	23:40	23:50
Sono																		
Dieta																		
Escuro																		

- 1) Colocar um traço na linha **Sono** quando o bebê estiver dormindo, com a letra **S** no início. Quando a criança acordar, colocar **D** = despertar espontâneo (criança acordou sozinha) ou **I** = despertar induzido (criança foi acordada), no horário em que tiver acordado.
- 2) Colocar um traço na linha **dieta** (alimentação) nos horários correspondentes. Ao início de cada episódio, colocar as letras: **M** = alimentação por mamadeira ou copinho / **SM** = seio materno / **O** = outros (suco, papinha, fruta, refeição)
- 3) Colocar um traço na linha **Escuro** nos horários correspondentes quando a criança estiver em ambiente escuro.

Onde a criança dormiu esta noite?

Horário de dormir e acordar da mãe

Dormiu _____ Dormiu _____
Acordou _____ Acordou _____

Horário de dormir e acordar do pai

Dormiu _____ Dormiu _____
Acordou _____ Acordou _____

Na impossibilidade do uso do termistor:

TEMPERATURA ORAL

Anotar de 3 em 3 horas

Horário						
Temperatura						

Atividades e Observações (anotar os horários em que ocorreram)

Medicamentos (anotar os horários em que foram dados)

Horários em que retirou e colocou o aparelho

Aparelho do punho

Retirou: _____ Retirou: _____ Retirou: _____
Colocou: _____ Colocou: _____ Colocou: _____

Aparelho da perna

Retirou: _____ Retirou: _____ Retirou: _____
Colocou: _____ Colocou: _____ Colocou: _____