

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Débora Barrogi Constantino

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DIFERENTES PADRÕES DE ILUMINAÇÃO NO
DESENVOLVIMENTO PUBERAL DE RATAS WISTAR**

Porto Alegre

2018

Débora Barrogi Constantino

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DIFERENTES PADRÕES DE ILUMINAÇÃO NO
DESENVOLVIMENTO PUBERAL DE RATAS WISTAR**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharela em Biomedicina.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Paz Loayza Hidalgo

Coorientador: André Comiran Tonon

Porto Alegre
2018

CIP - Catalogação na Publicação

Constantino, Débora Barrogi

AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DIFERENTES PADRÕES DE
ILUMINAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO PUBERAL DE RATAS
WISTAR / Débora Barrogi Constantino. -- 2018.
48 f.

Orientadora: Maria Paz Loayza Hidalgo.

Coorientador: André Comiran Tonon.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Ciências Básicas da Saúde, Curso de Biomedicina,
Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Puberdade. 2. Abertura vaginal. 3. Maturação
sexual. 4. Ciclo estral. 5. Alterações metabólicas. I.
Loayza Hidalgo, Maria Paz, orient. II. Comiran
Tonon, André, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Débora Barrogi Constantino

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DIFERENTES PADRÕES DE ILUMINAÇÃO NO
DESENVOLVIMENTO PUBERAL DE RATAS WISTAR**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel(a) em Biomedicina.

Aprovado em: 17 de dezembro de 2018.

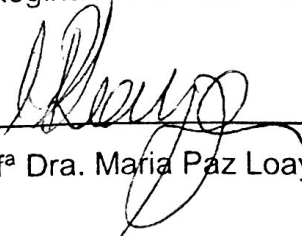
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Alberto Antonio Rasia Filho - UFCSPA



Profª Dra. Regina Maria Vieira da Costa Guaragna - UFRGS



Profª Dra. Maria Paz Loayza Hidalgo - UFRG

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Artemise e Marcos, agradeço por toda dedicação, apoio e incentivo que recebi durante toda minha vida. Fico muito feliz por ter sido criada por pais que sempre me estimularam e me encorajaram a ir atrás dos meus sonhos. À minha irmã Laura, por ser minha primeira e eterna amiga e por me proporcionar refeições dignas durante este período (<3).

À minha avó Magali, por ser a melhor avó que qualquer neta poderia ter, sempre disposta a dar seus conselhos e tornar qualquer momento mais alegre com seu infinito bom humor.

À minha orientadora, Professora Maria Paz, agradeço pela oportunidade e pela dedicação não só a este trabalho, mas a todos os outros do grupo. Ao meu co-orientador André Tonon, agradeço por toda a paciência e por todas as vezes que tu separou um tempo para me ensinar, trabalhar comigo, me dar uma luz ou apenas me entreter com as tuas conversas divertidas. Trabalhar com pesquisa é difícil, mas difícil mesmo é não gostar de ti!

Aos meus companheiros de laboratório Melissa, Juliana, Guilherme, Luísa e Nicóli, por todo o apoio durante a realização deste projeto e da minha Iniciação Científica no laboratório. A contribuição de vocês foi muito importante para a minha formação!

Aos meus amados amigos Bruna, Amanda, Júlio e Brenda por terem me acompanhado durante todos os anos de graduação e dividido comigo todas as angústias e dúvidas que um curso de graduação pode trazer. Sem vocês, não sei como poderia ter passado por todos esses anos e fico muito feliz em saber que sempre poderemos contar uns com os outros!

Às minhas amigas Laura Fagundes, Carol, Jéssica e Vanessa por todo apoio durante este período e por terem estado sempre ao meu lado, principalmente nos momentos em que eu mais precisei descansar do TCC. Vocês me fazem crescer. Muito amor!

A todos amigos, colegas e familiares que não foram contemplados aqui, mas que contribuíram de alguma forma para a minha formação e fizeram parte da minha vida, agradeço a tudo que fizeram por mim. Muito obrigada!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
1.1 DESENVOLVIMENTO PUBERAL	7
1.2 CICLO ESTRAL E SISTEMA REPRODUTIVO DE RATAS WISTAR.....	8
1.3 REGULAÇÃO HORMONAL DO CICLO ESTRAL	11
1.4 SISTEMA CIRCADIANO E EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-GÔNADAS	12
1.5 CRONODISRUÇÃO E ALTERAÇÕES METABÓLICAS: CONSEQUÊNCIAS PARA A MATURAÇÃO SEXUAL	14
2. JUSTIFICATIVA.....	16
3. OBJETIVOS	17
3.1 OBJETIVOS GERAIS	17
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
4. TRABALHO EXPERIMENTAL NA FORMA DE ARTIGO CIENTÍFICO	18
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	34
REFERÊNCIAS.....	35
ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA CHRONOBIOLOGY INTERNATIONAL.....	37

RESUMO

A puberdade é uma fase associada a diversas mudanças físicas e comportamentais, as quais são estabelecidas pela ativação do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (HPG). O sistema circadiano é um programa temporal que atribui e organiza ritmos biológicos, além de permitir que eles estejam sincronizados com o ambiente. O ciclo reprodutivo feminino é regulado pelo sistema circadiano, que é sensível a diversos estímulos externos, principalmente o ciclo claro-escuro. Disrupções no sistema circadiano, causadas pela crescente exposição à iluminação artificial, podem causar alterações nos ritmos biológicos, anormalidades nos ciclos reprodutivos e mudanças em parâmetros metabólicos. No presente trabalho, foi avaliado o efeito de quatro diferentes padrões de iluminação no desenvolvimento puberal de ratas Wistar. Além disso, foram analisadas possíveis alterações metabólicas influenciadas por estes regimes de iluminação. A obtenção das fêmeas passou por um processo inicial de acasalamentos dentro de uma estante de fotoperíodos, para que as fêmeas fossem expostas desde a gestação aos padrões de iluminação. Assim, foram divididas em quatro grupos: combinação de cores RGB (vermelho, *red*; verde, *green*; azul, *blue*) que variam sua composição espectral ao longo do dia (RGB-v; N = 14), RGB durante o fotoperíodo com uma temperatura de cor fixa (RGB-f; N = 13), escuro constante (DD; N = 13) e claro constante (LL; N = 15). Os experimentos foram realizados em fêmeas desde o dia pós-natal (PND) 22 ao 50. Peso corporal, abertura vaginal, ciclicidade estral e parâmetros metabólicos séricos foram mensurados. Não foram observadas diferenças significativas na idade de abertura vaginal, no entanto, o grupo RGB-f apresentou o primeiro ciclo estral completo significativamente mais cedo quando comparado ao grupo RGB-v. Fêmeas expostas ao claro constante apresentaram peso corporal significativamente mais baixo do PND 33 ao 47 quando comparadas ao restante dos grupos. Em relação aos parâmetros metabólicos, foram observados níveis plasmáticos de triglicérides significativamente maiores no grupo exposto ao escuro constante, quando comparado aos grupos RGB-v e RGB-f. O colesterol total foi significativamente mais baixo no grupo RGB-v em relação aos outros grupos. Por fim, a gordura visceral foi significativamente maior no grupo RGB-f quando comparado ao grupo LL. Considerando os dados apresentados, é possível sugerir que tanto mudanças no fotoperíodo quanto na qualidade de iluminação afetam o desenvolvimento puberal e alteram o perfil lipídico e acúmulo de gordura visceral de ratas Wistar.

Palavras-chave: abertura vaginal, ciclo estral, puberdade, eixo HPG, maturação sexual

ABSTRACT

Puberty is associated with several physical and behavioral changes, which are shaped by the activation of the hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis. The circadian system is a temporal program that assigns and organizes biological rhythms, in addition to allowing them to be synchronized with the environment. The female reproductive cycle is regulated by the circadian system, which is sensitive to several external stimuli, especially the light-dark cycle. Disruptions in the circadian system, caused by increased exposure to artificial lighting, can cause changes in biological rhythms, abnormalities in reproductive cycles and changes in metabolic parameters. In the present study, we evaluated the effect of four different lighting patterns on pubertal development of Wistar rats. In addition, possible metabolic changes influenced by these lighting regimes were analyzed. Females were obtained from a process of mating within a photoperiod station, so that females were exposed to different lighting patterns since gestation. Thus, they were divided into four groups: RGB color combination (red, red, green, blue, blue) varying their spectral composition throughout the day (RGB-v; N = 14), RGB during the photoperiod with a fixed light color temperature (RGB-f; N = 13) during the whole photoperiod, constant dark (DD; N = 13) and constant clear (LL; N = 15). The experiments were performed in females from the postnatal day (PND) 22 to 50. Body weight, vaginal opening, estrous cyclicity and serum metabolic parameters were measured. No significant differences were observed in the age of vaginal opening, however, the RGB-f group exhibited the first complete estrous cycle significantly earlier when compared to the RGB-v group. Females exposed to constant light showed significantly lower body weight from PND 33 to 47 when compared to the rest of the groups. Regarding metabolic parameters, significantly higher triglyceride plasma levels were observed in the group exposed to constant dark when compared to the RGB-v and RGB-f groups. Total cholesterol was significantly lower in the RGB-v group than in the other groups. Finally, visceral fat was significantly higher in the RGB-f group when compared to the LL group. Considering the data presented, it is possible to suggest that both changes in photoperiod and lighting quality affect pubertal development and alter the lipid profile and accumulation of visceral fat of Wistar rats.

Keywords: vaginal opening, estrous cycle, puberty, HPG axis, sexual maturation

LISTA DE ABREVIATURAS

GnRH – Gonadotropin-Releasing Hormone

LH – Luteinizing hormone

FSH – Follicle-stimulating hormone

HPG axis – Hypothalamic-pituitary-gonadal axis

PND – Postnatal day

CL – Corpus luteum

DD – Constant dark

LL – Constant light

RGB-f – Red-green-blue fixed

RGB-v – Red-green-blue variable

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas e a sequência de acontecimentos que ocorrem com a sua ativação.....	8
Figura 2: Representação de lavados vaginais obtidos em diferentes dias do ciclo estral de ratas e classificação dos ciclos.....	10
Figura 3: Representação das características morfológicas ovarianas.....	11
Figura 4: Variações hormonais que ocorrem ao longo das fases do ciclo estral.....	12
Figura 5: Relação entre a síntese de melatonina e a supressão/inibição do GnRH.....	14

1. INTRODUÇÃO

1.1 Desenvolvimento Puberal

Puberdade e adolescência marcam a transição entre a infância e a idade adulta. Estes termos são usados de forma intercambiável, entretanto puberdade é o período durante o qual um indivíduo se torna capaz de se reproduzir sexualmente. Especialistas se referem a esta fase a partir de uma perspectiva endócrina, pois os sinais evidentes de maturação reprodutiva são conduzidos por mudanças hormonais que ocorrem durante este período. Já a adolescência é a etapa entre a infância e idade adulta que abrange não só a maturação sexual, mas também a maturação cognitiva, emocional e social. Neste sentido, a maturação sexual (puberdade) e comportamental (adolescência) são dois processos distintos, impulsionados pelo cérebro, que estão intimamente ligados por interações entre o sistema nervoso e hormônios esteroides gonadais (SISK et al., 2004).

A regulação hormonal do sistema reprodutivo é feita pelo eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (HPG). A puberdade tem início com a ativação de neurônios especializados do hipotálamo que liberam pulsos do Hormônio Liberador de Gonadotrofinas (GnRH). O controle da sua secreção é fundamental para a maturação reprodutiva. Em seguida, o GnRH entra na hipófise, onde sinaliza para a síntese e secreção das gonadotrofinas pituitárias: o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo estimulante (FSH). Por fim, o FSH e LH sanguíneos atuarão em células dos ovários e testículos para direcionar a produção de óvulos, espermatozóides e hormônios esteróides, os quais são vitais para a função das gônadas. No cérebro, estes hormônios também são requeridos para que ocorra a secreção de GnRH em alças de retroalimentação que irão promover a organização e ativação de circuitos neuronais que medeiam o comportamento reprodutivo. Neste sentido, o aumento da secreção de hormônios esteróides e a remodelação de circuitos cerebrais são importantes marcadores biológicos da puberdade e adolescência, respectivamente (JENNES; CONN, 1994; MOENTER et al., 2003; VIDAL et al., 2016).

Apesar de ainda não ter sido totalmente elucidado qual o gatilho que induz a ativação do eixo HPG e quais sinais permitem a ocorrência da puberdade, seu início é um momento crítico para os mamíferos. Os indivíduos devem perceber, através de

pistas metabólicas, sociais e ambientais, que cresceram o suficiente, quais são suas relações com outros indivíduos e quais as condições ótimas determinam sucesso reprodutivo (EBLING; CRONIN, 2000). Futuros estudos são necessários para caracterizar completamente os mecanismos fisiológicos responsáveis por iniciar a maturação sexual, bem como fatores ambientais que podem interagir com os biológicos para adiantar ou atrasar a puberdade.

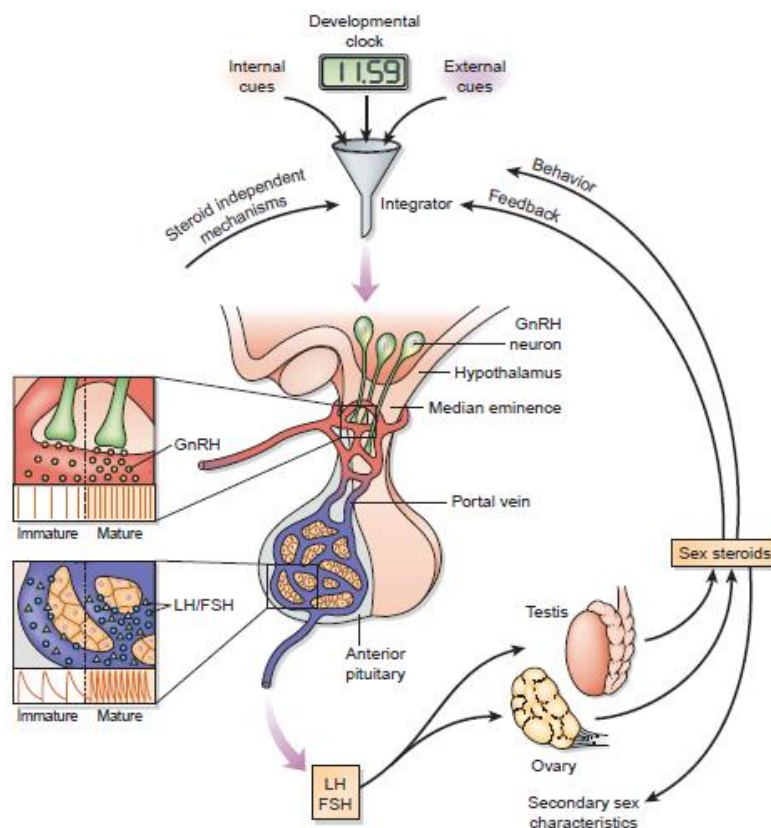


Figura 1: Representação do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas e a sequência de acontecimentos que ocorrem com a sua ativação (de SISK et al., 2004).

1.2 Ciclo Estral e Sistema Reprodutivo de ratas Wistar

Antes da puberdade, o canal vaginal das ratas é obstruído por um septo epitelial que começa a se degenerar entre, aproximadamente, 32 a 34 dias de idade (LEWIS et al., 2002). A abertura vaginal é o marco do início da puberdade - coincidindo com o aumento da secreção de LH em mulheres - e, com ela, se inicia o ciclo reprodutivo das ratas, denominado ciclo estral (CASTELLANO et al., 2011). A duração média do

ciclo estral é de quatro a cinco dias, podendo apresentar algumas irregularidades inicialmente. É um processo repetitivo, porém dinâmico, onde diferentes tipos de células surgem ao longo das quatro fases do ciclo, refletindo mudanças nos níveis de estradiol e progesterona secretados pelos folículos ovarianos (CORA et al., 2015).

Historicamente, o termo “estro” foi utilizado pela primeira vez pelo cientista Walter Heape em 1900, como uma adaptação latina da palavra grega *oistros*, que significa frenesi ou loucura, para definir um período de maior receptividade sexual. A partir desta definição, foram nomeadas as outras etapas do ciclo estral: proestro, metaestro e diestro (CORA et al., 2015). Estas etapas são definidas baseadas em mudanças no comportamento (maior receptividade para cópula, por exemplo), mudanças histológicas no trato reprodutivo e pela predominância, ausência ou proporção de diferentes tipos de células em lavados vaginais (PACCOLA et al., 2013). Esta classificação, no entanto, e o tempo de duração de cada fase ainda são controversos. Alguns autores também consideram a existência de uma fase adicional chamada anestro, marcada por uma inatividade ovariana, como é observado quando a vida reprodutiva é quiescente (WESTWOOD et al., 2008).

O proestro é uma fase de curta duração (média de 12 horas), onde predominam células epiteliais nucleadas e arredondadas. Frequentemente elas são vistas em clusters, como cachos de uva, principalmente se a amostra apresentar alta celularidade. O proestro é seguido pelo estro, identificado pela presença de um grande número de células queratinizadas anucleadas e tem uma duração de 24 a 48 horas. Além disso, esta fase corresponde ao período em que a fêmea é receptiva ao macho. O metaestro é caracterizado pela proporção equivalente de células queratinizadas, epiteliais e leucócitos. Por fim, no diestro encontram-se principalmente leucócitos, com algumas células epiteliais e uma quantidade considerável de muco, tornando a secreção vaginal viscosa. O ciclo estral também pode ser classificado como regular, apresentando uma duração de 4-5 dias (com dois dias de estro ou três dias consecutivos de diestro, podendo estar ausente o proestro ou metaestro) e irregular, definido como um ciclo de 6-7 dias com estro ou diestro persistente (CORA et al., 2015; GOLDMAN et al., 2007).

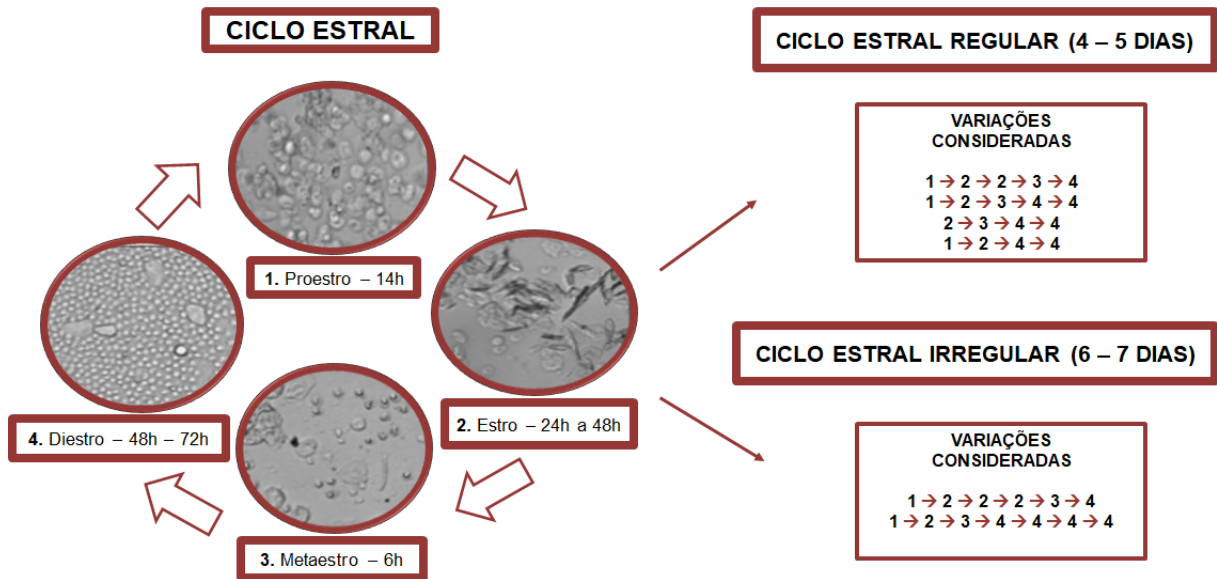


Figura 2: Representação de lavados vaginais obtidos em diferentes dias do ciclo estral de ratas e classificações do ciclo estral. Adaptado de Goldman et al., 2007.

Muitas características do ciclo estral também podem ser observadas histologicamente e se correlacionam com mudanças no perfil neuroendócrino dos animais enquanto ocorre a maturação do eixo HPG. A puberdade ocorre com a ovulação de folículos ovarianos - unidades funcionais dos ovários -, fato constatado histologicamente pela presença de corpos lúteos “atuais”, resultantes da ovulação recente. Aproximadamente dois a cinco corpos lúteos estão presentes no ovário durante o primeiro ciclo. Depois disso, um número crescente de corpos lúteos aparece e é possível observar estas estruturas em diferentes estágios de regressão (PICUT et al., 2015). Durante as 4 fases do ciclo estral também são vistas características morfológicas marcantes nos ovários, útero e vagina das ratas. No proestro é esperada a presença de folículos antrais prontos para ovular e é comum observar o útero distendido com fluidos. Após a ovulação, múltiplos corpos lúteos são vistos nos ovários, assim como uma queratinização na parede vaginal, consistindo com o estro. No metaestro predominam os folículos ovarianos primários, os quais são cercados por uma única camada de células granulosa cuboide, enquanto que no diestro predominam os folículos secundários, envolvidos por mais de uma camada de células. (WESTWOOD et al., 2008; VIDAL et al., 2017; PICUT et al., 2014).

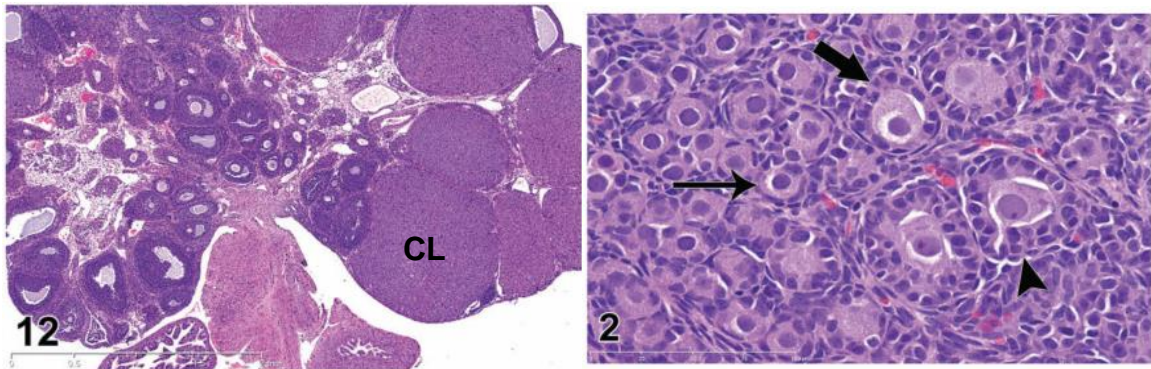


Figura 3: À esquerda, observa-se a representação de um ovário de rata na puberdade (DPN 42 – dia pós-natal) com corpos lúteos (CL) indicando que houve ovulação. À direita observa-se a representação de folículos primordiais (seta fina), primários (seta grossa) e secundários (ponta de flecha) (de PICUT et al., 2015).

É importante reconhecer que definir histologicamente o início da puberdade e a obtenção da maturidade sexual é desafiador. Clinicamente, o início da ciclicidade menstrual pode ser determinada pela observação de eventos de sangramento menstrual. Os padrões histológicos que definem um roedor na puberdade, entretanto, são escassos e controversos, pois devem incluir: evidência de ovulação e/ou evidência de início de ciclicidade, ambas apresentando alta variabilidade para esta faixa etária, não sendo, portanto, diagnósticos morfológicos adequados para achados histológicos (DIXON et al., 2014).

1.3 Regulação Hormonal do Ciclo Estral

O início da puberdade e o papel dos ovários em produzir óvulos para fertilização envolve complexas cascatas de regulação hormonal. O FSH, estimulado pela secreção pulsátil do GnRH, está envolvido no crescimento e maturação de folículos e induz a produção de estrogênios por esses folículos. O LH desempenha um papel principal na ruptura folicular e ovulação. É o principal hormônio responsável por manter o corpo lúteo. Já foi demonstrado em diversos estudos experimentais que o FSH e LH atuam de forma sinérgica e são requeridos para a maioria dos eventos (DOWNEY et al., 1980).

O ciclo estral das ratas inicia na fase folicular, que coincide com as fases metaestro e diestro, onde ocorre uma regulação endócrina dos ovários envolvendo os hormônios FSH e estradiol, que são relativamente baixos nesta fase, mas orientam o

início da atividade folicular. O nível sérico de estradiol aumenta, até atingir um pico no proestro, o que induz a secreção de LH pela hipófise. No estro ocorre a ovulação, decorrente dos picos de estradiol e LH. O folículo já desenvolvido é rompido e remodelado em corpo lúteo (CL), que produz uma grande quantidade de progesterona para preparar o endométrio uterino para uma possível prenhez. Concluindo a fase lútea, o corpo lúteo acaba se degenerando via apoptose granulosa, seja durante a gestação, quando o volume de produção hormonal materna se desloca para a placenta, ou, mais rapidamente, quando o ciclo estral recomeça porque não houve fecundação do óvulo (MARRAUDINO et al., 2018; TOMS et al., 2018; STOCCO et al., 2007).

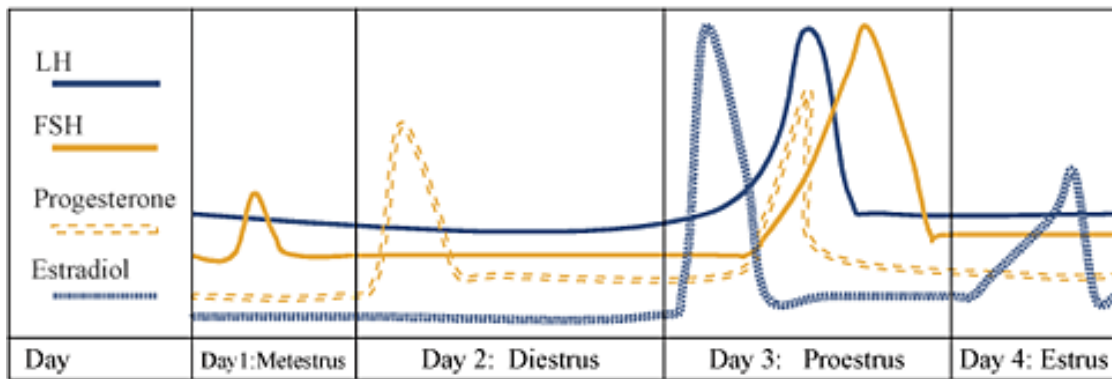


Figura 4: Representação das variações hormonais que ocorrem ao longo das fases do ciclo estral (de EMANUELE et al., 2002).

1.4 Sistema Circadiano e Eixo Hipotálamo-Hipófise-Gônadas

O sistema circadiano é um programa temporal, encontrado em animais de todos os filos, que organiza e atribui ritmos ao organismo, além de permitir que eles sejam sincronizados ao meio ambiente. Para que isto ocorra, este sistema é organizado pelo núcleo supraquiasmático (NSQ), um marca-passo biológico que recebe informação fótica de células ganglionares especializadas da retina via trato retino-hipotalâmico, e que sincroniza o ritmo de diversas funções fisiológicas ao ciclo claro-escuro. Através desse processo, o NSQ transpõe o “dia interno” para uma rede de relógios periféricos localizados em diversos órgãos (FISCHER et al., 2016). Esta maquinaria funciona em diversos níveis do corpo, incluindo a expressão molecular de diversos genes-relógio que são transcritos em alças de retroalimentação positivas e negativas. Estes genes produzem proteínas que inibem e ativam sua própria transcrição, levando a oscilações celulares diárias (HAGENAUER; LEE, 2012).

Sabe-se que o isolamento ou retirada do NSQ perturba a liberação de hormônios pré-ovulatórios em ratas fêmeas, indicando que os ciclos reprodutivos são vulneráveis às interrupções circadianas (ARENDAH; GORSKI, 1983). Por isso, a regulação circadiana intacta do eixo HPG é fundamental para que ocorram ciclos reprodutivos regulares. Os relógios circadianos já foram descritos em todos os tecidos do eixo HPG, embora seu papel na etiologia de distúrbios na puberdade ainda não esteja bem descrito (SEN; SELLIX, 2016).

O sistema circadiano é sensível a certos estímulos externos, também capazes de sincronizá-lo: os *zeitgebers* (BECHTOLD et al., 2010). Acredita-se que a luz seja o principal sinalizador externo. Na ausência de luz, o NSQ envia longas projeções descendentes que irão transmitir estímulos à glândula pineal, utilizando a noradrenalina como transmissor. A partir da ausência deste sinal, a pineal produz melatonina, hormônio que possui uma secreção muito regular e fornece pistas temporais, ajudando o organismo a sincronizar seus ritmos ao ciclo claro-escuro. Já na presença de luz, a síntese e a liberação de melatonina são inibidas (LUCAS et al., 2014).

A melatonina também tem como um de seus efeitos a regulação da pulsatilidade do GnRH, pois sua secreção inibe o GnRH, tendo, portanto, ação anti-gonadotrófica em ratos. Dessa forma, quanto menor for a exposição à luz, maior será a secreção de melatonina e, por consequência, a supressão do GnRH, podendo levar a um atraso na maturação sexual. A relação direta da melatonina com o ciclo estral de ratas também já foi demonstrada por Thomas et al (2002), que mostrou que a ressecção da glândula pineal e a queda dos níveis de melatonina, levam a abertura vaginal prematura, hipertrofia ovariana e cornificação do epitélio vaginal. Já o tratamento com melatonina em ratas normais causou atraso em seu desenvolvimento sexual (BELLASTELLA et al., 2014). Também já foi demonstrado que há expressão de receptores de melatonina nos tecidos reprodutivos humanos e que este hormônio causa alterações nas secreções de LH e FSH (WOO et al., 2001).

A forma como o ser humano se expõe à luz pode levar a perturbações em seus padrões circadianos naturais, o que tem sido associado a patologias como depressão, problemas de sono, inflamação, doenças metabólicas e distúrbios reprodutivos (LABYAK et al., 2002). Nos últimos cem anos, a crescente exposição à luz artificial possibilitou que os períodos de atividade se estendessem consideravelmente dentro dos períodos de escuro natural (MORITA; TOKURA, 1998). As consequências deste

estilo de vida moderno para a regulação dos ciclos reprodutivos e para o tempo de maturação sexual estão começando a ser compreendidas.

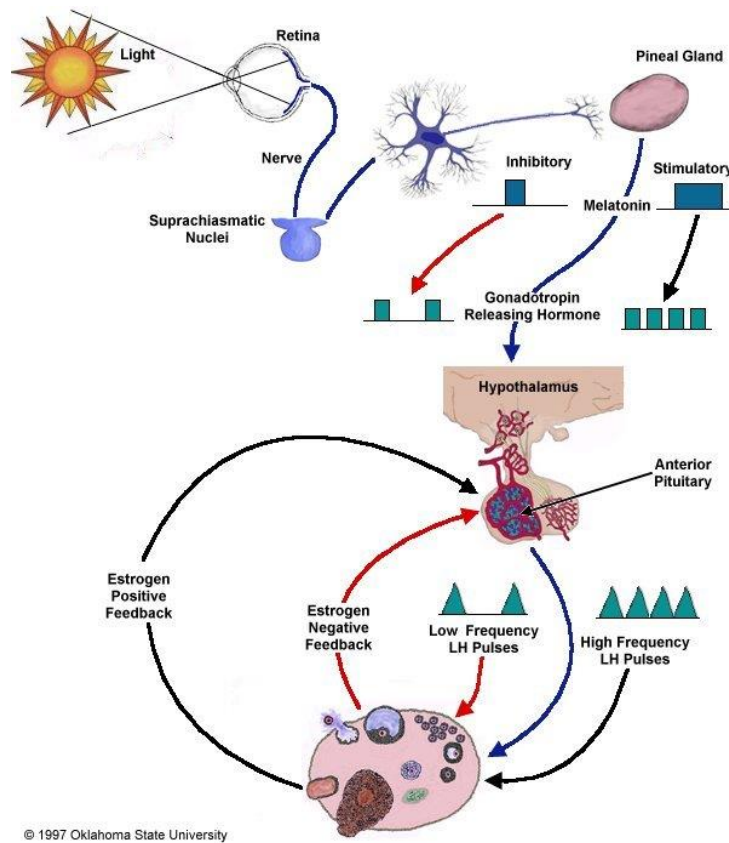


Figura 5: Relação entre a síntese de melatonina e a supressão/inibição do GnRH e suas consequências para a organização dos mecanismos endócrinos que controlam o sistema reprodutivo (Adaptado de KARSCH et al., 1984).

1.5 Cronodisrupção e Alterações Metabólicas: Consequências para a Maturação Sexual

A relação entre ritmos circadianos e metabolismo está sendo cada vez mais estudada. O relógio circadiano regula o metabolismo e a homeostase de energia nos tecidos periféricos mediando a atividade ou a expressão de enzimas, hormônios e transportadores envolvidos no metabolismo de proteínas, lipídeos e carboidratos (FROY et al., 2010; LEE et al., 2001). Estudos experimentais mostram que dietas ricas em gordura podem contribuir para o desenvolvimento da obesidade via alterações no

período de atividade locomotora do ritmo circadiano e mudanças nas oscilações dos genes-relógio do tecido adiposo e fígado (PENDERGAST et al., 2013).

Muitas evidências também apontam para uma correlação entre desalinhamento de ritmos circadianos e doenças metabólicas. O conceito de cronodisrupção diz respeito à alteração significativa ou perda da sincronização entre estímulos ambientais externos e processos fisiológicos internos. Sabe-se que a exposição à luz artificial durante a noite, situação cotidiana para a sociedade industrializada, pode resultar em uma disrupção circadiana (TOUITOU et al., 2017). Um estudo recente mostrou que mesmo um breve desalinhamento circadiano, de apenas uma noite por exemplo, pode levar rapidamente a alterações funcionais na regulação da glicose (SCHEER et al., 2009). Este resultado é muito importante, pois demonstra que tanto um desalinhamento agudo, quanto crônico pode perturbar a regulação metabólica.

Além disso, alterações metabólicas podem influenciar em diversos aspectos do desenvolvimento puberal, como o início da puberdade e parâmetros hormonais do sistema reprodutivo (GOLUB et al., 2008). Estudos reportam que um aumento no ganho de peso durante o período que precede a puberdade está associado a um atraso na puberdade em ratas fêmeas (CASTELLANO et al., 2011; SÁNCHEZ-GARRIDO et al., 2013). No entanto, as relações entre estes fatores ainda são inconsistentes e poucos estudos avaliam a associação entre desenvolvimento puberal e acúmulo de gordura no contexto de uma cronodisrupção. Assim, mudanças recentes na forma como o ser humano se expõe à luz pode ser um dos fatores envolvidos no desenvolvimento de desordens metabólicas e alterações reprodutivas.

2. JUSTIFICATIVA

Estudos que avaliem os efeitos da exposição à luz na saúde reprodutiva das mulheres são escassos, porém sabe-se que a puberdade precoce é cada vez mais frequente, fato que pode estar ligado à adoção de um modo de vida diferente do observado no passado, incluindo os padrões de exposição à luz.

Diante da importância da luz na regulação fisiológica dos organismos vivos e considerando o crescente aumento no tempo de exposição à iluminação e a qualidade desta, se faz necessário ampliar os estudos que busquem entender sua influência no sistema reprodutivo e no metabolismo.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Avaliar o efeito de quatro padrões de iluminação, considerando diferentes fotoperíodos e espectros de emissão luminosa, desde a fase gestacional até o final de 7 semanas de vida (que corresponde ao início da vida adulta) de ratas Wistar. Os desfechos de interesse são: peso corporal, gordura visceral, maturação sexual e variações hormonais.

3.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar o efeito de diferentes padrões de iluminação sobre desfechos relacionados à maturação sexual: o tempo e abertura vaginal, primeiro ciclo estral completo, quantidade de ciclos completos consecutivos, tempo para a primeira fase de estro.
2. Avaliar o efeito de diferentes padrões de iluminação sobre ganho de peso, peso de gordura visceral, e níveis séricos de glicemia, triglicerídeos, HDL e colesterol total.
3. Avaliar a potencial associação entre os desfechos de maturação sexual e alterações metabólicas.

4. TRABALHO EXPERIMENTAL NA FORMA DE ARTIGO CIENTÍFICO

O trabalho apresentado a seguir encontra-se na forma de *original article* a ser submetido para a revista *Chronobiology International* (ISSN: 0742-0528)

EFFECTS OF DIFFERENT LIGHTING PATTERNS IN PUBERAL DEVELOPMENT OF FEMALE WISTAR RATS

Débora Barrogi Constantino^a, André Comiran Tonon^{a,b}, Melissa Alves Braga de Oliveira^{a,b}, Juliana Jury Freitas^a, Guilherme Amando^a, Maria Paz Loayza Hidalgo^{a,b}

^aLaboratório de Cronobiologia e Sono do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)/ Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

^b Programa de Pós-Graduação em Psiquiatria e Ciências do Comportamento, Universidade Federal do Rio Grande do Sul/Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Corresponding author: Dra. Maria Paz Loayza Hidalgo. Laboratório de Cronobiologia e Sono (HCPA/UFRGS) – Rua Ramiro Barcelos, 2350, Porto Alegre – RS, Brazil, Phone: +5551 33596339. E-mail: mpaz1967@gmail.com

ABSTRACT

Modern life style is characterized by constant exposure to artificial light, which can lead to alterations in biological rhythms and abnormalities to reproductive cycles as well as metabolic changes. In this study, we aimed to evaluate the effects of four different lighting patterns on puberty timing of female Wistar rats. Additionally, we aimed to study possible metabolic changes influenced by the lighting patterns used. Adult Wistar rats mated during a week at a photoperiod station where they were exposed to combined red-green-blue lights (RGB) during the photoperiod that varied its spectral composition (i.e. variable color temperature) during the day (RGB-v; N = 14), RGB during the photoperiod with a fixed light color temperature (RGB-f; N = 13) during the whole photoperiod; constant darkness (DD; N = 13) and constant fixed light (LL; N = 15). Experiments were performed only on female litters from postnatal day (PND) 22 to 50. Body weight, puberty onset, estrous cyclicity and serum metabolic parameters were measured. No significant differences were found in the age of vaginal opening, however the RGB-v group showed significant lower number of complete and consecutives cycles. Also, RGB-f group showed first complete estrous cycle significantly earlier than RGB-v group. Female rats housed in LL condition presented significantly lower mean body weight from PND 33 to PDN 47 compared to the other groups. Furthermore, higher levels of plasma triglycerides were found in DD group compared to RGB-f and RGB-v. HDL levels were significantly lower in RGB-v compared to RGB-f and LL groups. Total cholesterol was significantly lower in RGB-v compared to all groups. Visceral fat was significantly higher in RGB-f compared to LL group. These results suggest that both changes in photoperiod and lighting quality affect pubertal development and alter lipid profiles and visceral fat accumulation.

Key words: Vaginal opening, estrous cycle, puberty, maturation.

INTRODUCTION

Puberty marks the period between childhood and adulthood, which is characterized by a variety of physiological and behavioral changes. One of the biological markers of puberty is an increased level of gonadal steroid hormones, which are shaped by the activation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis [1]. The onset of puberty depends on the activation of specialized neurons that secrete pulses of gonadotropin releasing hormone (GnRH) from the basal hypothalamus. The control of its secretion is fundamental for reproductive maturation. GnRh enters the pituitary and signals to the synthesis and secretion of luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH). Finally, FSH and LH act on ovaries and testes cells to direct the production of eggs, sperm and steroid hormones. Within the brain, these hormones are also required for GnRH secretion to occur via feedback loops that promote the organization and activation of neural circuits that mediate reproductive behavior [2].

In female rats, vaginal opening is an anatomic landmark in development of the reproductive system and occurs between postnatal day (PND) 32 – 34, starting the reproductive cycles, called estrous cycle. The estrous cycles in rats averages 4-5 days and is generally divided in four stages: proestrus, estrus, metestrus and diestrus. On vaginal cytology, these stages are characterized by the presence, absence or proportion of 4 basic cell types. This cycle reflects changes in estradiol and progesterone levels secreted by ovarian follicles [3]. Histologic features of the ovaries also correlate with changes in the neuroendocrine profile of pubertal stages in the rat and allow to differentiate normal tissues from delayed development, for example [4].

Circadian system is a temporal program, found in animals of all phyla that organizes biological rhythms and allows them to be synchronized to the environment.

This system is organized by the suprachiasmatic nucleus (NSQ), a biological pacemaker that receives photic information from specialized retinal cells and, through this process, synchronizes the rhythms of various physiological functions and peripheral clocks, located in several organs of the body [5]. It's known that female reproductive function is under strict control of circadian system, as well as every tissue of hypothalamic-pituitary-gonadal axis [6]. Arendash and coworkers showed that the withdrawal of NSQ disrupts the release of preovulatory hormones in rats, indicating that reproductive cycles are vulnerable to circadian disruptions [7].

Light-dark cycles are the most important external signal, also called *zeitgeber*, used by the circadian clock for synchronization of inner rhythms to the 24-h day. In the absence of light, the NSQ transmits signals to the pineal gland through circuitous neural pathways, resulting in the production of melatonin, a hormone that has a regular secretion and provides temporal clues to the body. On the other hand, retinal exposure to light leads to the suppression of melatonin secretion [8]. Melatonin also affects the regulation of GnRH pulsatility by inhibiting its secretion and, therefore, has an anti-gonadotrophic action in rats.

Modern lifestyle is characterized by living constantly under electrical light at day and night time, which can lead to disruptions in natural circadian patterns and abnormalities to reproductive cycles [5,9]. In the present study, we aimed to evaluate the influence of four different lighting patterns on puberty timing of female Wistar rats. Additionally, we aim to understand the intersections of variables related to puberty timing with serum metabolic markers.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Adult Wistar obtained from the Animal Experimentation Unit (UEA) of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) mated during a week at a photoperiod station. This station is equipped with different light patterns in four unique environments. Animals were divided into four groups, according to the lighting: combined red-green-blue lights (RGB) during the photoperiod that varied its spectral composition during the day (RGB-v; N = 14), to simulate daily changes in color temperature of the natural sunlight; RGB during the photoperiod with a fixed light color temperature (RGB-f; N = 13) during the whole photoperiod; constant darkness (DD; N = 13) and constant light (LL; N = 15).

RGB-v group was exposed to a light pattern whereby a gradual change in color temperature occurs. Reddish wavelengths (2700 K) initiate the cycle from the moment the lights are on, transitioning through a gradual warming of the color temperature until reaching the maximum heating peak, 6 hours after the start (simulating noon of the light in natural environment of blueish color, 400K). Subsequently, the light gradually becomes colder until the end of the light period, 16 hours after the lights are on (simulating the sunset in natural environment). At the end of 16 hours of light, the lights were completely off during the 8 hours of darkness. RGB-f group maintained the color temperature throughout the light phase. LL group was kept the entire protocol in constant fixed light, while DD group was kept in constant darkness.

Animals were housed in groups with food and water *ad libitum* in transparent acrylic home-cages (Panlab Harvard Apparatus; 25 x 15 x 25 cm) and controlled temperature (20°C). Animals were maintained on the photoperiod station while males were euthanized.

Females were allowed to raise their litters until the pups completed 21 days (PND 21) of life and, hereafter, were weaned. Experiments were performed only on female litters (N = 55) from PND 22 to 50. Female genitors were euthanized after weaning. Pups were weighed every three days, between 17 and 18 p.m.

Study of the Estrous Cycle

To investigate the timing of puberty, all litters were examined daily for vaginal opening, starting from PND 28. Once vaginal opening occurred, vaginal smears were taken daily for vaginal cytology until the end of the experiment. Vaginal smears were prepared by introducing a drop of normal saline (NaCL 0.9%) into the vagina, collecting back and placing it on a clean microscope slide. The stages of the estrous cycle were determined, according to the predominant cell type present in the vaginal smears, as seen under a light microscope at 40x [3] by two evaluators independently to ensure consistency of stage interpretation. The experiment continued until PND 50.

The determination of estrous cyclicity was made according to previous reports [3,10]. Complete cycles were counted considering the length of the four stages, which can vary between 6 and 72h. Proestrus (average length of 14h in rats) could be absent and should not be present for more than two vaginal cytologies. Estrus duration ranges between 24 and 48h. Therefore, it should not be absent. Metestrus is a short stage of 6-8h and could also be missed. Diestrus is the longest stage with an average duration of 48-72h, therefore it should not be absent and should be present for at least two consecutive days. Cycles were also dichotomized as regular, defined as 4 or 5-day cycle (with two days of estrus or 2 or 3 consecutive days of diestrus), and irregular, defined as a 6 or 7-day cycles with those exhibiting a persistent estrus or diestrus.

Blood Sampling

Blood samples were collected every 15 days, totalizing 3 collections. In the first two collections, females were anesthetized with isoflurane 5% and 0.25 mL blood samples were withdrawn from the tail vein. The last blood sample was collected at euthanasia by cardiac puncture after anesthesia. Samples were centrifuged at 4000 rpm for 15 min and analyzed for the serum levels of glucose, triglycerides, HDL and total cholesterol.

Statistical Analysis

Data are presented as mean \pm SD (Standard deviation) or median and interquartile range (IQR), when appropriate. Statistical comparisons between groups were evaluated by two-way ANOVA and repeated measures ANOVA, followed by post hoc tests (Tukey). The Kruskal-Wallis test was used to compare non-parametric data. Statistical significance was accepted as $p < 0.05$. Analysis were performed using SPSS software version 18.

RESULTS

Timing of puberty

As shown in Figure 1 there was no difference between groups in the age of vaginal opening (DD: 35.23 ± 2.65 ; LL: 34.13 ± 2.38 ; RGB-f: 35.23 ± 2.24 ; RGB-v: 34.71 ± 1.06 ; $p=0.487$). However, significant differences related to the the PND of first complete estrous cycle were found between RGB-f and RGB-v (Figure 2a). The age of first estrus was similar among groups ($p=0.904$). We did not observed differences in ovarian and uterus weight ($p=0.07$).

Estrous cyclicity

We observed that 93.33% of the rats exposed to LL presented regular cycles, which was significantly higher compared to RGB-v where 57.14% of the rats showed

regular cycles ($p < 0.05$). Also, we subtracted the estrus proportion by the diestrus proportion of each group and observed that there was a trend ($p > 0.05$; $p < 0.1$) of the RGB-f group to have more estrus, since the difference was positive. The RGB-v group showed significant lower number of complete ($p = 0.028$; Median (IQR) = 2 (1-2) (Figure 2b) and consecutives ($p = 0.035$; Median (IQR) = 1 (1-2) (Figure 2c) cycles compared to DD group. We did not find any difference among groups in the length of estrous cycles ($p = 0.951$; Median (IQR) = 5 (4.3-5.5) (Figure 2d). No differences were detected between the groups in the percentage of animals at each phase of the estrous cycle ($p = 0.999$) (Figure 3).

Body weight and metabolic changes

Body mass was differentially affected by light condition over the experimental weeks. Significantly lower mean body weight was noted in LL group from PND 33 to PND 47 compared to the other groups ($p < 0.05$). We also observed significant differences in body weight between RGB-v and RGB-f from PND 30 to PND 39 and in PND 24 and 47 ($p < 0.05$) (Figure 4).

Serum levels of glucose, triglycerides, HDL, total cholesterol and visceral fat are shown in Figure 5 as means \pm SD. No significant differences were found in levels of glucose between groups ($p = 0.118$). Higher levels of plasma triglycerides were found in DD group compared to RGB-f ($p = 0.001$) and RGB-v ($p = 0.003$). HDL levels were significantly lower in RGB-v compared to RGB-f ($p = 0.002$) and LL ($p = 0.002$) groups. Total cholesterol was significantly lower in RGB-v compared to all groups ($p < 0.05$). Visceral fat was significantly higher in RGB-f compared to LL group ($p = 0.02$) (Figure 5).

DISCUSSION

The present study evaluated the effects of four different lighting patterns on puberty timing assessed by vaginal opening and estrous cyclicity in female Wistar rats. Additionally, we investigated how these patterns affect body weight, metabolic parameters and visceral fat accumulation.

Many animal studies have been reported that exposure to constant light accelerates sexual maturation, as indicated by the day of vaginal opening. However, our results did not indicate differences in the age of vaginal opening. In this study, estrous cyclicity was the main endpoint affected by light condition. Females under LL condition showed a higher proportion of regular cycles, which may indicate a precocious maturation. The RGB-v group showed significantly lower number of complete and consecutive estrous cycles, suggesting that this group may not have reached sexual maturation at euthanasia. Furthermore, the age of first complete estrous cycle was later in RGB-v group compared to all other groups. On the other hand, no differences in length of cycles were observed. These results indicate that increased exposure to light may change the sensitivity of the HPG axis and changes in color temperature throughout the day should have some contribution to the present delay in sexual maturation. Further studies would highly contribute to the matter by analyzing the mechanisms by which variable color temperature affect sexual maturation outcomes.

We also suggest that photoperiod changes may affect the regulation of reproductive system and change timing of puberty, considering that RGB-v and RGB-f groups were in a cycle of 16 hours of light, and 8 hours of darkness (16:8), and there are evidence highlighting the effects of changes in photoperiod in sexual maturation (BOHLEN et al., 2018). Further investigation, including hormonal and histological

measurement, is needed to clarify the pubertal development of rats under different photoperiods.

Few studies have investigated the influence of different light patterns on metabolic responses. Daily interactions between suprachiasmatic nucleus (NSQ) and peripheral clocks regulate physiology and metabolism to adjust temporal variations in homeostatic regulation [12]. Many studies demonstrate that when the circadian system is misaligned, the desynchrony between the central and peripheral clocks leads to an increased metabolic risk [13,14]. Constant light (LL) is a condition that generates absence of rhythmicity with loss of feeding/fasting rhythm. This internal desynchronization due to LL is associated with several metabolic alterations: high levels of body mass, alterations in levels of cholesterol and glucose [15,16]. However, in our study the LL group presented significantly lower body weight in almost all PNDs. This can be due to a reduced food intake, which has already been described as a consequence of exposure to constant light. The DD group showed higher levels of triglycerides. These results show that these aberrant photoperiod changes induce alterations in metabolic measures. The RGB-f group presented significantly higher levels of total cholesterol compared to RGB-v, although these differences seem to be of no biological relevance. The next necessary step for this area of study is to further explore the mechanisms that lead the distinct light regimens to alter serum parameters linked to metabolism. Also, it is highly necessary to elucidate the healthy characteristics of a rodent under development to identify which conditions are harmful or not to its growth.

The most interesting and challenging characteristic of sexual maturation is the heterogeneity of patterns, so it's necessary to find points of convergence to better understand how to characterize this period. A limitation of this study is that the protocol

duration was not long enough to determine when all female rats had regularized cycles and reached sexual maturation. Another limitation of our study is that we analyzed vaginal cytology once a day, missing some short phases of estrous cycle. This misstep was corrected by considering the duration of each phase and standardizing a rule for complete cycles based on literature [3,10].

In summary, our results demonstrate that exposure to a light pattern whereby a gradual change in color temperature occurs, appears to promote a change in puberty timing, whereas lighting with fixed color temperature appears to accelerate reproductive development. Also, we suggest that both changes in photoperiod and lighting quality alter the lipid profile and the pattern of visceral fat accumulation. However, it is difficult to state, from the metabolic and reproductive point of view, which is the ideal lighting condition, since there are biological variations among animals. Our results highlight the significance of light to puberty. Therefore, we believe it is crucial to expand studies in order to clarify the mechanisms underlying the relationship of light exposure with sexual maturation and metabolism.

AKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the Animal Experimentation Unit (UEA) team of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) for technical and logistical support.

DECLARATION OF INTERESTS

The study was supported by the Incentive Fund to Research and Events (FIPE – HCPA) and the National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq – UFRGS). The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of this article.

REFERENCES

- 1) Sato SM, Schulz KM, Sisk CL, Wood RI. Adolescents and androgens, receptors and rewards. *Horm Behav.* 2008 May;53(5):647–658. PMID: PMC2435368
- 2) Sisk CL, Zehr JL. Pubertal hormones organize the adolescent brain and behavior. *Front Neuroendocrinol.* 2005 Dec;26(3–4):163–174. PMID: 16309736
- 3) Cora MC, Kooistra L, Travlos G. Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse: Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears. *Toxicol Pathol.* 2015 Aug;43(6):776–793. PMID: 25739587
- 4) Picut CA, Remick AK, Asakawa MG, Simons ML, Parker GA. Histologic features of prepubertal and pubertal reproductive development in female Sprague-Dawley rats. *Toxicol Pathol.* 2014;42(2):403–413. PMID: 23599412
- 5) Fischer D, Vetter C, Roenneberg T. A novel method to visualise and quantify circadian misalignment. *Sci Rep [Internet].* 2016 Dec 8 [cited 2018 Dec 7];6. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5144069/> PMID: PMC5144069
- 6) Miller BH, Takahashi JS. Central Circadian Control of Female Reproductive Function. *Front Endocrinol (Lausanne) [Internet].* 2014 Jan 22 [cited 2018 Nov 20];4. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3898595/> PMID: PMC3898595
- 7) Arendash GW, Gorski RA. Effects of discrete lesions of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area or other medial preoptic regions on the sexual behavior of male rats. *Brain Res Bull.* 1983 Jan;10(1):147–154. PMID: 6824962
- 8) Lucas RJ, Peirson SN, Berson DM, Brown TM, Cooper HM, Czeisler CA, Figueiro MG, Gamlin PD, Lockley SW, O'Hagan JB, Price LLA, Provencio I, Skene DJ, Brainard GC. Measuring and using light in the melanopsin age. *Trends Neurosci.* 2014 Jan;37(1):1–9. PMID: PMC4699304
- 9) Russo KA, La JL, Stephens SBZ, Poling MC, Padgaonkar NA, Jennings KJ, Piekarski DJ, Kauffman AS, Kriegsfeld LJ. Circadian Control of the Female Reproductive Axis Through Gated Responsiveness of the RFRP-3 System to VIP Signaling. *Endocrinology.* 2015 Jul;156(7):2608–2618. PMID: PMC4475714
- 10) Goldman JM, Murr AS, Cooper RL. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology.* 2007 Apr;80(2):84–97.
- 11) Bohlen TM, Silveira MA, Buonfiglio D do C, Ferreira-Neto HC, Cipolla-Neto J, Donato J, Frazao R. A Short-Day Photoperiod Delays the Timing of Puberty in Female Mice via Changes in the Kisspeptin System. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018;9:44. PMID: PMC5826198
- 12) Plano SA, Casiraghi LP, García Moro P, Paladino N, Golombek DA, Chiesa JJ. Circadian and Metabolic Effects of Light: Implications in Weight Homeostasis and Health. *Front Neurol [Internet].* 2017 [cited 2018 Dec 3];8. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fneur.2017.00558/full?fbclid=IwAR1MK5pU9v2UJjGtR-NtZZVegLwAV5oahf9zy2IEC-QOzLhyxDtMZN4q1b0>
- 13) Litinski M, Scheer FA, Shea SA. Influence of the Circadian System on Disease Severity. *Sleep Med Clin.* 2009 Jun 1;4(2):143–163. PMID: PMC2733366

- 14) Bray MS, Young ME. Circadian rhythms in the development of obesity: potential role for the circadian clock within the adipocyte. *Obes Rev.* 2007 Mar;8(2):169–181. PMID: 17300281
- 15) Wideman CH, Murphy HM. Constant light induces alterations in melatonin levels, food intake, feed efficiency, visceral adiposity, and circadian rhythms in rats. *Nutr Neurosci.* 2009 Oct;12(5):233–240. PMID: 19761654
- 16) Dauchy RT, Dauchy EM, Tirrell RP, Hill CR, Davidson LK, Greene MW, Tirrell PC, Wu J, Sauer LA, Blask DE. Dark-Phase Light Contamination Disrupts Circadian Rhythms in Plasma Measures of Endocrine Physiology and Metabolism in Rats. *Comp Med.* 2010 Oct;60(5):348–356. PMCID: PMC2958202

LIST OF FIGURES

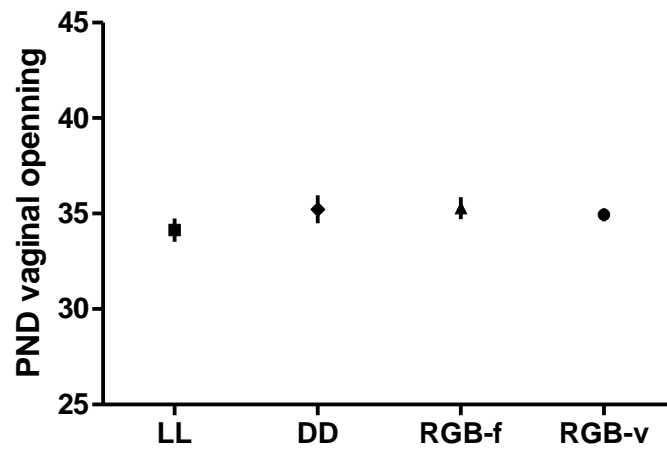


Figure 1: Average day of vaginal opening of female pups. DD, n=15; LL, n= 13; RGB-f, n= 13; RGB-v, n=14.

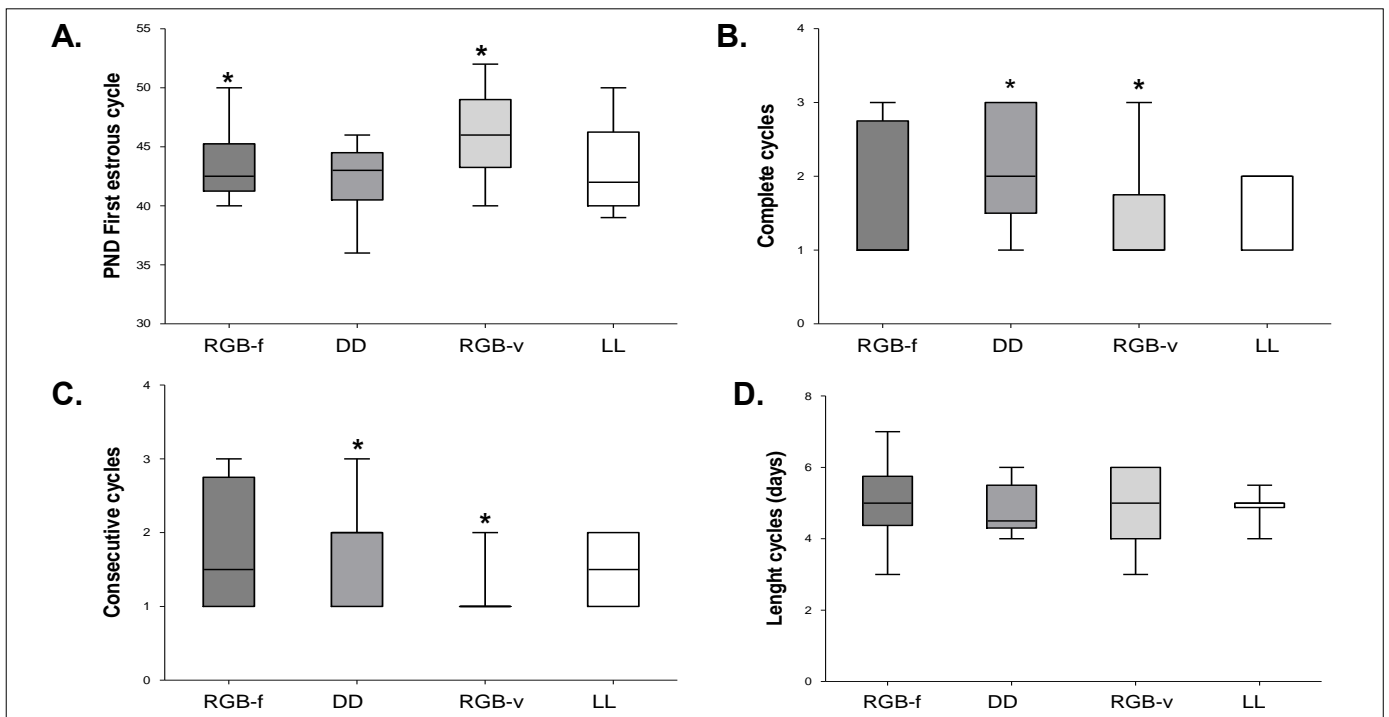


Figure 2: Mean of PND of first complete estrous cycle (A). Average number of complete (B) and consecutive (C) cycles. Length of cycles in days of female pups. DD, n=15; LL, n= 13; RGB-f, n= 13; RGB-v, n=14 (*p<0,05).

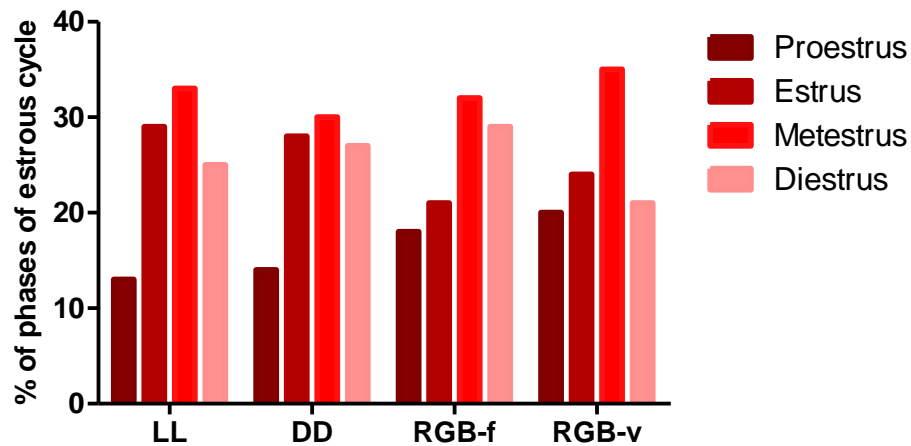


Figure 3: Percentage for phases of the estrous cycle for females Wistar exposed to four different patterns of illumination. No difference was detected between the groups ($p=0,999$).

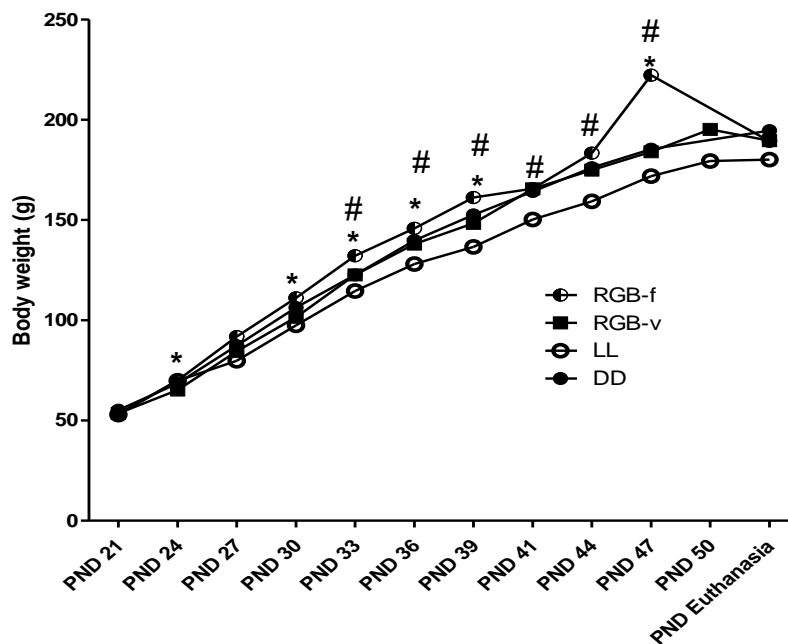


Figure 4: Body weight changes during the experimental protocol. DD, $n=15$; LL, $n=13$; RGB-f, $n=13$; RGB-v, $n=14$. (* Statistical difference between RGB-f and RGB-v; # Statistical difference between LL and all groups) ($p<0,05$).

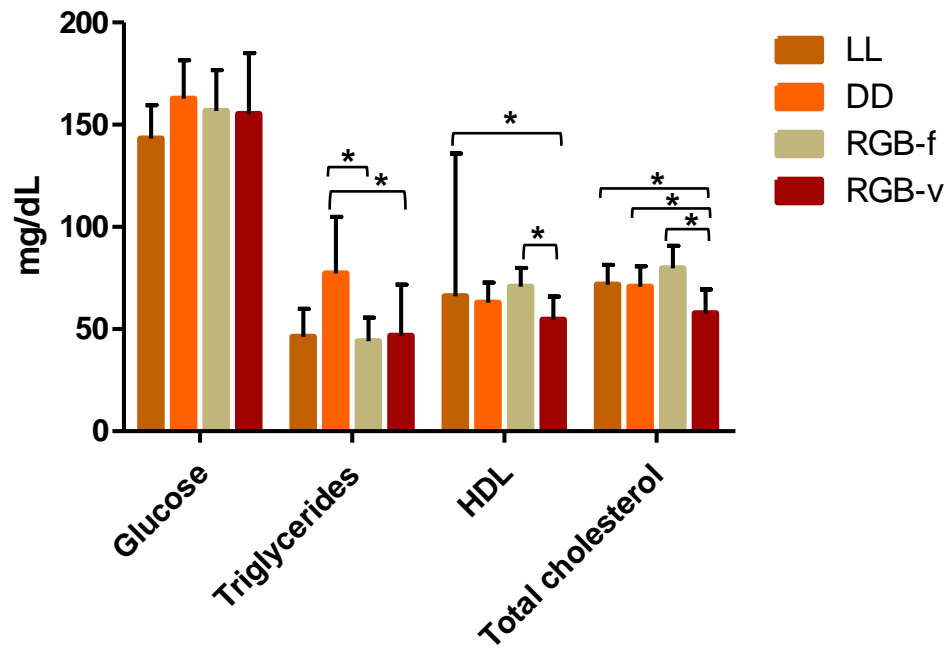


Figure 5: Multiple comparisons between metabolic parameters of groups. Significant differences when $p < 0.05$.

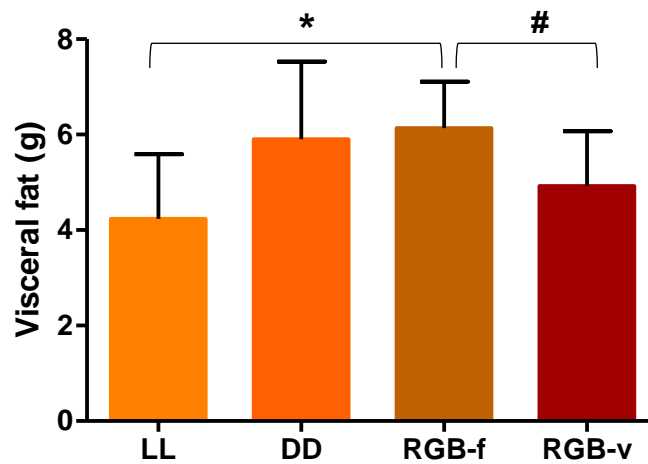


Figure 6: Average visceral fat among groups. * $p < 0.05$; # trend ($p < 0.1$; $p > 0.05$)

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

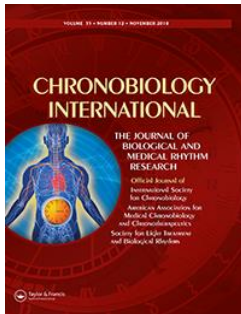
O presente trabalho demonstrou um importante efeito dos diferentes padrões de iluminação utilizados no tempo de maturação sexual de ratas Wistar. Mais especificamente, a qualidade de iluminação parece influenciar mais os desfechos de maturação sexual comparada a mudanças de fotoperíodo, uma vez que uma iluminação com variações na sua temperatura de cor parece atrasar o desenvolvimento reprodutivo. Além disso, tanto mudanças de fotoperíodo, quanto de qualidade de iluminação alteraram o perfil lipídico e o padrão de acúmulo de gordura visceral nas ratas Wistar. Assim, avaliações morfológicas dos ovários, a partir de lâminas histológicas de HE, e dosagens dos níveis séricos de hormônios sexuais permitirão uma consolidação das conclusões deste trabalho. Além disso, é necessário realizar a dosagem de melatonina a fim de correlacionar os possíveis dados obtidos sobre maturação sexual com os achados na literatura acerca da influência da secreção deste hormônio sobre o eixo HPG. No contexto de alterações metabólicas, analisar as características moleculares da gordura visceral contribui para o entendimento dos diferentes padrões de acúmulo de gordura vistos nos animais expostos aos diferentes regimes de iluminação.

REFERÊNCIAS

- ARENDASH, G. W.; GORSKI, R. A. Effects of discrete lesions of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area or other medial preoptic regions on the sexual behavior of male rats. **Brain Research Bulletin**, v. 10, n. 1, p. 147–154, jan. 1983.
- BECHTOLD, D. A.; GIBBS, J. E.; LOUDON, A. S. I. Circadian dysfunction in disease. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 31, n. 5, p. 191–198, maio 2010.
- BELLASTELLA, A. et al. Opposite Influence of Light and Blindness on Pituitary–Gonadal Function. **Frontiers in Endocrinology**, v. 4, 13 jan. 2014.
- CASTELLANO, J. M. et al. Early metabolic programming of puberty onset: impact of changes in postnatal feeding and rearing conditions on the timing of puberty and development of the hypothalamic kisspeptin system. **Endocrinology**, v. 152, n. 9, p. 3396–3408, set. 2011.
- CORA, M. C.; KOOISTRA, L.; TRAVLOS, G. Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse: Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears. **Toxicologic Pathology**, v. 43, n. 6, p. 776–793, ago. 2015.
- DIXON, D. et al. Nonproliferative and proliferative lesions of the rat and mouse female reproductive system. **Journal of Toxicologic Pathology**, v. 27, n. 3- 4 Suppl, p. 1S-107S, 2014.
- DOWNEY, B. R. Regulation of the Estrous Cycle in Domestic Animals — A Review. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 21, n. 11, p. 301–306, nov. 1980.
- EBLING, F. J.; CRONIN, A. S. The neurobiology of reproductive development. **Neuroreport**, v. 11, n. 16, p. R23-33, 9 nov. 2000.
- EMANUELE, M. A.; EMANUELE, N. V. Alcohol's Effects on Female Reproductive Function. v. 26, n. 4, p. 8, 2002.
- FISCHER, D.; VETTER, C.; ROENNEBERG, T. A novel method to visualise and quantify circadian misalignment. **Scientific Reports**, v. 6, 8 dez. 2016.
- FROY, O. Metabolism and circadian rhythms--implications for obesity. **Endocrine Reviews**, v. 31, n. 1, p. 1–24, fev. 2010.
- GOLDMAN, J. M.; MURR, A. S.; COOPER, R. L. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. **Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology**, v. 80, n. 2, p. 84–97, abr. 2007.
- HAGENAUER, M. H.; LEE, T. M. The Neuroendocrine Control of the Circadian System: Adolescent Chronotype. **Frontiers in neuroendocrinology**, v. 33, n. 3, p. 211–229, ago. 2012.
- JENNES, L.; CONN, P. M. Gonadotropin-Releasing Hormone and Its Receptors in Rat Brain. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 15, n. 1, p. 51–77, mar. 1994.
- LABYAK, S. et al. Effects of shiftwork on sleep and menstrual function in nurses. **Health Care for Women International**, v. 23, n. 6–7, p. 703–714, nov. 2002.
- LEE, C. et al. Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock. **Cell**, v. 107, n. 7, p. 855–867, 28 dez. 2001.
- LEWIS, E. M. et al. Sexual maturation data for Crl Sprague-Dawley rats: criteria and confounding factors. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 25, n. 4, p. 437–458, nov. 2002.
- LUCAS, R. J. et al. Measuring and using light in the melanopsin age. **Trends in Neurosciences**, v. 37, n. 1, p. 1–9, jan. 2014.

- MARRAUDINO, M. et al. Kisspeptin system in ovariectomized mice: Estradiol and progesterone regulation. **Brain Research**, v. 1688, p. 8–14, 1 jun. 2018.
- MOENTER, S. M. et al. Steroid regulation of GnRH neurons. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1007, p. 143–152, dez. 2003.
- MORITA, T.; TOKURA, H. The influence of different wavelengths of light on human biological rhythms. **Applied Human Science: Journal of Physiological Anthropology**, v. 17, n. 3, p. 91–96, maio 1998.
- PACCOLA, C. et al. The rat estrous cycle revisited: a quantitative and qualitative analysis. **Anim Reprod**, v. 10, p. 677–683, 1 out. 2013.
- PENDERGAST, J. S. et al. High-fat diet acutely affects circadian organization and eating behavior. **The European journal of neuroscience**, v. 37, n. 8, p. 1350–1356, abr. 2013.
- PICUT, C. A. et al. Histologic features of prepubertal and pubertal reproductive development in female Sprague-Dawley rats. **Toxicologic Pathology**, v. 42, n. 2, p. 403–413, 2014.
- SÁNCHEZ-GARRIDO, M. A. et al. Metabolic programming of puberty: sexually dimorphic responses to early nutritional challenges. **Endocrinology**, v. 154, n. 9, p. 3387–3400, set. 2013.
- SCHEER, F. A. J. L. et al. Adverse metabolic and cardiovascular consequences of circadian misalignment. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 11, p. 4453–4458, 17 mar. 2009.
- SEN, A.; SELLIX, M. T. The Circadian Timing System and Environmental Circadian Disruption: From Follicles to Fertility. **Endocrinology**, v. 157, n. 9, p. 3366–3373, 2016.
- SISK, C. L.; FOSTER, D. L. The neural basis of puberty and adolescence. **Nature Neuroscience**, v. 7, n. 10, p. 1040–1047, out. 2004.
- TOMS, D.; PAN, B.; LI, J. Endocrine Regulation in the Ovary by MicroRNA during the Estrous Cycle. **Frontiers in Endocrinology**, v. 8, 22 jan. 2018.
- TOUITOU, Y.; REINBERG, A.; TOUITOU, D. Association between light at night, melatonin secretion, sleep deprivation, and the internal clock: Health impacts and mechanisms of circadian disruption. **Life Sciences**, v. 173, p. 94–106, 15 mar. 2017.
- VIDAL, J. D. The Impact of Age on the Female Reproductive System. **Toxicologic Pathology**, v. 45, n. 1, p. 206–215, 2017.
- WESTWOOD, F. R. The female rat reproductive cycle: a practical histological guide to staging. **Toxicologic Pathology**, v. 36, n. 3, p. 375–384, abr. 2008.
- WOO, M. M. et al. Direct action of melatonin in human granulosa-luteal cells. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 86, n. 10, p. 4789–4797, out. 2001.

ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA CHRONOBIOLOGY INTERNATIONAL



CHRONOBIOLOGY INTERNATIONAL THE JOURNAL OF BIOLOGICAL AND MEDICAL RHYTHM RESEARCH

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief

Francesco Portaluppi, M.D.
Department of Medical Sciences
University of Ferrara
Ferrara, Italy

Senior Advisor

Alain Reinberg, M.D., Ph.D.
Foundation A. de Rothschild
Equipe de Recherches
Chronobiologie Humaine
Paris, France

Editorial Board

T. Akerstedt - *IPM/Karolinska Institute, Stockholm, Sweden*
U. Albrecht - *Division of Biochemistry, University of Fribourg, Switzerland*
H. Balan - *University of Medicine and Pharmacy, "Carol Davila" Bucharest, Romania*
C. Bartsch - *Center for Research in Medical and Natural Sciences, University of Tbingen, Germany*
D. Boivin - *Center for Study and Treatment of Circadian Rhythms, McGill University, Montreal, Canada*
C. Cajochen - *Centre for Chronobiology, Psychiatric University Clinics, Basel, Switzerland*
T. Cambras - *Department de Fisiologia, Facultat de Farmacia, Barcelona, Spain*
N. Cermakian - *Laboratory of Molecular Chronobiology, McGill University, Montreal, Canada*
Y. Dagan - *Sheba Medical Center, Tel Aviv, Israel*
R. Foster - *Sleep & Circadian Neuroscience Institute, University of Oxford, Oxford, UK*
A. Fujimura - *Department of Pharmacology, Shimotsuke, Tochigi, Japan*
S. Gaddameedhi – *Department of Pharmaceutical Sciences, Washington State University, Washington, USA*

N. Goel - *Department of Psychology, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA*
 R. Hermida - *Universidad de Vigo, Vigo, Spain*
 D. Kennaway - *University of Adelaide, Australia*
 D. Kripke - *Department of Psychiatry, University of California, San Diego, CA, USA*
 R. W. Lame - *University of British Columbia, Vancouver, Canada*
 M. K. LeBourgeois - *Department of Psychiatry and Human Behavior, Brown University, Providence, RI, USA*
 B. Lemmer - *Ruprecht-Karls-University, Heidelberg, Mannheim, Germany*
 F. Levi - *INSERM U 776, Paul Brousse Hospital, Villejuif, France*
 A. Lewy - *Oregon Health & Science University, Portland, Oregon, USA*
 J.A. Madrid - *Department of Physiology, Faculty of Biology, University Murcia, Murcia, Spain*
 R. Manfredini - *Section of Internal Medicine, Vascular Diseases Center, University of Ferrara, Italy*
 T. H. Monk - *University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA, USA*
 S.R. Pandi-Perumal, *Somnogen Canada Inc, Toronto, Canada*
 D.J. Skene - *Centre for Chronobiology, School of Biomedical and Molecular Sciences, Guilford, UK*
 E.J. W. Van Someren - *Netherlands Institute for Neuroscience, Amsterdam, The Netherlands*
 H. Wang - *Suzhou, Soochow University, Suzhou, China*
 J. Waterhouse - *Liverpool John Moores University, Liverpool, UK*
 D. Weinert - *Institute of Zoology, Martin-Luther University, Halle, Germany*

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Thank you for choosing to submit your paper to us. These instructions will ensure we have everything required so your paper can move through peer review, production and publication smoothly. Please take the time to read and follow them as closely as possible, as doing so will ensure your paper matches the journal's requirements. For general guidance on the publication process at Taylor & Francis please visit our [Author Services website](#).

AUTHORSERVICES
 Supporting Taylor & Francis authors

This journal uses ScholarOne Manuscripts (previously Manuscript Central) to peer review manuscript submissions. Please read the [guide for ScholarOne authors](#) before making a submission. Complete guidelines for preparing and submitting your manuscript to this journal are provided below.

Submission

All papers should be submitted online - <http://mc.manuscriptcentral.com/lcbi> . Hardcopies are not permitted. Manuscripts are preferred in double-spaced Microsoft Word format, with margins of at least one inch

on all sides. All tables and figures should be submitted as separate individual digital files.

Data sharing policy

This journal applies the Taylor & Francis [Basic Data Sharing Policy](#). Authors are encouraged to share or make open the data supporting the results or analyses presented in their paper where this does not violate the protection of human subjects or other valid privacy or security concerns.

Authors are encouraged to deposit the dataset(s) in a recognized data repository that can mint a persistent digital identifier, preferably a digital object identifier (DOI) and recognizes a long-term preservation plan. If you are uncertain about where to deposit your data, please see [this information](#) regarding repositories.

Authors are further encouraged to cite any data sets referenced in the article and provide a [Data Availability Statement](#).

At the point of submission, you will be asked if there is a data set associated with the paper. If you reply yes, you will be asked to provide the DOI, pre-registered DOI, hyperlink, or other persistent identifier associated with the data set(s). If you have selected to provide a pre-registered DOI, please be prepared to share the reviewer URL associated with your data deposit, upon request by reviewers.

Where one or multiple data sets are associated with a manuscript, these are not formally peer reviewed as a part of the journal submission process. It is the author's responsibility to ensure the soundness of data. Any errors in the data rest solely with the producers of the data set(s).

Manuscript Preparation

The following article types are considered for publication in Chronobiology International:

Original articles

Review articles

Short Communications

Letters to the Editor

Commentaries

Publishing Ethics

The Editors and Taylor & Francis Group are committed to the highest academic, professional, legal, and ethical standards in publishing work in this journal. To this end, we have adopted a [set of guidelines](#), to which all submitting authors are expected to adhere, to assure integrity and ethical publishing for authors, reviewers, and editors.

Taylor & Francis is a member of the Committee of Publications Ethics (COPE). COPE aims to provide a forum for publishers and editors of scientific journals to discuss issues relating to the integrity of their work, including conflicts of interest, falsification and fabrication of data, plagiarism, unethical experimentation, inadequate subject consent, and authorship disputes. For more information on COPE please visit <http://publicationethics.org>.

Abstract with keywords

All articles should start with an abstract of no more than 500 words as a single continuous paragraph. The abstract should not contain any subtitle, e.g., aim, methods etc.). The abstract must be factual and sufficiently comprehensive. Abbreviations, unless first defined, and general statements (e.g., the significance of the results is discussed) should be avoided.

Main Text

Original articles

The body should include the following sections:

Introduction

Materials and Methods

Results

Discussion

Declaration of Interest statement

Review Articles

The body of a review article should be a comprehensive, scholarly evidence-based review of the literature, accompanied by critical analysis and leading to reasonable conclusions. Wherever appropriate, details of the literature search methodology should be provided, i.e., the databases searched, the search terms and inclusive dates, and any selectivity criteria imposed. Wherever possible, use primary resources, avoiding "Data on File", "Poster", or other unpublished references. Authors of review articles are expected to address the basic tenets for quality chronobiology research, including subject synchronizer schedules, time or season of year of studies, time (circadian or other biological period) of treatment, etc., as well as the nature of the analysis of the time series data of the investigations reviewed.

Short Communications

Short Communications are brief and preliminary reports of significant new findings. They, including title, short abstract of 100 words or less, keywords, and references, must not exceed 5000 words. Because Short Communications are brief by definition,

figures and tables, though not prohibited, should be used sparingly. Please note that the average figure or table will take up at least 1/8 page space in print.

Letters to the Editor

Letters to the Editor will be considered for publication subject to editor approval, providing that the content relates to articles published in the journal. Letters should be received less than six months after publication of the original work in question. Pending editor approval, letters will be submitted to the author of the original paper in order that a reply is published simultaneously. Letters to the Editor should be fewer than 1000 words.

Commentaries

All commentary topics must be checked with the editor prior to submission. Commentaries should be knowledge-based or consensus-type articles (e.g., working group statement) of short length, generally less than 5000 words, expressing objective opinions, experiences or perspectives on an important area related to Chronobiology International.

Declaration of Interest statement

This should disclose any financial, consulting, and personal relationships with people or organizations that could be perceived by readers as influencing (biasing) the author's work. Within this section also belongs disclosure of scientific writing assistance (use of an agency or freelance writer), grant support and numbers (including NIH/Wellcome-funded papers), and statements of employment.

References

References should be presented in a separate section at the end of the document, in accordance with Vancouver system guidelines (see *Citing Medicine*, 2nd ed.). The references should be listed and numbered based on the order of their first citation. Every reference should be assigned its own unique number. References should not be repeated in the list, with each mention given a different reference number, nor should multiple references be combined under a single reference number. Digits in parentheses (e.g., (1, 2)) should be used for in-text citations. Citations should precede terminal (e.g., periods, commas, closed quotation marks, question marks, exclamation point) and nonterminal punctuation (e.g., semicolons, colons). Reference numbers should not be placed in parentheses.

Author listings in references should be formatted as indicated below.

<i>1 author</i>	Smith A
<i>2 to 10 authors</i>	Smith A, Jones B, Smythe C, Jonesy D, Smitty E, Jonesi F, Smithe G, Janes H, Smithee I, Junes J
<i>11 or more authors</i>	Smith A, Jones B, Smythe C, Jonesy D, Smitty E, Jonesi F, Smithe G, Janes H, Smithee I, Junes J, et al.

Models from US National Library of Medicine (NLM) resources (e.g., *MEDLINE*, *Index Medicus*), should be employed for abbreviating journal titles in the reference section. Examples of common reference types appear below.

<i>Journal article</i>	12. Taylor J, Ogilvie BC. A conceptual model of adaptation to retirement among athletes: a meta-analysis. <i>J Appl Sport Psychol.</i> 1994;6(1):1–20. doi:10.1080/10413209408406462. Cited in PubMed; PMID:25888877.
<i>Book</i>	2. Duke JA. Handbook of phytochemical constituents of GRAS herbs and other economic plants. Boca Raton (FL): CRC Press; 2001. 676 p.
<i>Book with titled volume and edition</i>	18. Bowlby J. Attachment and loss. Vol. 3, Loss: sadness and depression. 3rd ed. New York (NY): Basic Books; 1982.
<i>Edited book chapter</i>	34. Gordon S, Lavalley D. Career transitions in competitive sport. In: Morris T, Summers J, editors. Sport psychology: theory, applications and issues. 2nd ed. Brisbane (Australia): Wiley; 2004. p. 584–610.
<i>Edited book chapter with volume and edition</i>	26. Remael A. Audiovisual translation. In: Gambier Y, van Dooslaer L, editors. Handbook of translation studies. Vol. 1. 2nd ed. Amsterdam (Netherlands): John Benjamins; 2012. p. 12–7.
<i>Online/Website</i>	8. United States Census Bureau: Census.gov [Internet]. Washington (DC): United States D; c. 2014. American housing survey: 2013 detailed tables; 2014 Oct 16 [cited 2014 Oct 21]; [1 screen and data files]. Available from: http://www.census.gov/newsroom/press-releases/2014/cb14-tps78.html .
<i>Dissertation/Thesis</i>	26. Allison N. Bacterial degradation of halogenated aliphatic acids [dissertation]. [Nottingham (UK)]: Trent Polytechnic; 1981. 120 p.
<i>Conference presentation</i>	4. Alfermann D, Gross A. Coping with career termination: it all depends on freedom of choice. Paper presented at: 9th Annual World Congress on Sport Psychology; 1997 Jan 23; Netanya, Israel.
<i>Paper/Report</i>	55. Grigg W, Moran R, Kuang M. National Indian education study. Washington (DC): National Center for Education Statistics; 2010 Jun 23. Report No.: NCES 2010-462.
<i>Newspaper</i>	22. Protzman, F. Clamor in the East: East Berliners explore land long forbidden. <i>New York Times</i> (Late ed.). 1989 Nov 10;Sect. A:1 (col. 2).
<i>Patent</i>	67. Pfeifer A, Muhs A, Pihlgren M, Adolfsson O, Van Leuven F, inventors; AC Immune S.A, Katholieke Universiteit Leuven, assignees. Humanized tau antibody. United States patent US 9,657,091. 2017 May 23.
<i>Computer software with developer</i>	10. Noguera J, Cumby C. SigmaXL. Version 8.0. [software]. Kitchener (Canada): SigmaXL, Inc; 2017 Feb 27.
<i>Computer software without developer</i>	76. SPSS Amos. Version 22.0 [software]. Armonk (NY): IBM; 2013 Aug 13.
<i>Dataset</i>	3. Wang G-Y, Zhu Z-M, Cui S, Wang J-H. Data from: glucocorticoid induces incoordination between glutamatergic and GABAergic neurons in the amygdala [dataset] . 2017 Aug 11

	[cited 2017 Dec 22]. In: Dryad Digital Repository [Internet]. Available from: https://doi.org/10.5061/dryad.k9q7h .
--	---

Supplementary Material

Please contact the editor regarding the possibility of including essential supplementary material with the article. All supplementary material should be submitted with the article through Scholar One's Manuscript Central portal, and clearly labelled "Supplementary Material." Ensure that there is reference to the material in the submitted article's text.

Tables and Figures: Tables and figures should not be embedded in the text, but should be included as separate sheets or files. A short descriptive title should appear above each table with a clear legend and any footnotes suitably identified below. All units must be included. Figures should be completely labeled, taking into account necessary size reduction.

Captions should be typed, double-spaced, on a separate sheet. All original figures should be clearly marked with the number, author's name, and top edge indicated.

Illustrations: Illustrations submitted (line drawings, halftones, photos, photomicrographs, etc.) should be clean originals or digital files. Digital files are recommended for highest quality reproduction and should follow these guidelines:

- 300 dpi or higher
- sized to fit on journal page
- EPS, TIFF, or PSD format only submitted as separate files, not embedded in text files

Authors are responsible for obtaining permission to reproduce copyrighted material from other sources and are required to sign an agreement for the transfer of copyright to the publisher. As an author you are required to secure permission if you want to reproduce any figure, table or extract text from any other source. This applies to direct reproduction as well as "derivative reproduction" (where you have created a new figure or table which derives substantially from a copyrighted source).

Color Reproduction: Color art will be reproduced in color in the online publication at no additional cost to the author. Color illustrations will also be considered for print publication; however, the author will be required to bear the full cost involved in color art reproduction. Please note that color reprints can only be ordered if print reproduction costs are paid. Print Rates: \$400 per figure for the first four figures; \$75 per figure for five or more figures.

Page Proofs : All proofs must be corrected and returned to the publisher within 48 hours of receipt. If the manuscript is not returned within the allotted time, the editor will proofread the article and it will be printed per the editor's instruction. Only correction of typographical errors is permitted.

Complimentary Policy and Reprints: Authors for whom we receive a valid email address will be provided an opportunity to purchase reprints of individual articles, or copies of the complete print issue. These authors will also be given complimentary access to their final article on *Taylor & Francis Online*.