

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**KELY RASPANTE CERQUEIRA TEIXEIRA**

**ASSOCIAÇÃO ENTRE ESTRESSE OXIDATIVO, ESTABILIDADE DE  
MEMBRANA DE ERITRÓCITOS E JETLAG SOCIAL EM  
TRABALHADORES EM TURNOS**

**Uberlândia**

**2018**

**KELY RASPANTE CERQUEIRA TEIXEIRA**

**ASSOCIAÇÃO ENTRE ESTRESSE OXIDATIVO, ESTABILIDADE DE  
MEMBRANA DE ERITRÓCITOS E JETLAG SOCIAL EM  
TRABALHADORES EM TURNOS**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde.**

**Área de concentração:** Ciências da Saúde.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cibele Aparecida Crispim

**Coorientador:** Prof. Dr. Erick Prado de Oliveira

**Coorientador:** Prof. Dr. Nilson Penha Silva

**Uberlândia**

**2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

- T266a  
2018
- Teixeira, Kely Raspante Cerqueira, 1987  
Associação entre estresse oxidativo, estabilidade de membrana de eritrócitos e jetlag social em trabalhadores em turnos / Kely Raspante Cerqueira Teixeira. - 2018.  
113 p. : il.
- Orientadora: Cibele Aparecida Crispim.  
Coorientador: Erick Prado de Oliveira.  
Coorientador: Nilson Penha Silva.  
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.  
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2018.477>  
Inclui bibliografia.
1. Ciências médicas - Teses. 2. Stress oxidativo - Teses. 3. Mobilidade de pessoal - Teses. 4. Eritrócitos - Teses. I. Crispim, Cibele Aparecida. II. Oliveira, Erick Prado de. III. Silva, Nilson Penha. IV. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. V. Título.

---

CDU: 61

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947

KELY RASPANTE CERQUEIRA TEIXEIRA

## **ASSOCIAÇÃO ENTRE ESTRESSE OXIDATIVO, ESTABILIDADE DE MEMBRANA DE ERITRÓCITOS E JETLAG SOCIAL EM TRABALHADORES EM TURNOS**

**Presidente da banca:** Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Cibele Aparecida Crispim

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação e Pesquisa em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde.

**Área de concentração: Ciências da Saúde**

### **Banca examinadora**

**Titular:** Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Claudia Roberta de Castro Moreno  
Instituição: Universidade de São Paulo (USP)

**Titular:** Prof. Dr. Ricardo Rodrigues  
Instituição: Hospital de Uberlândia (HC-UFU)

**Titular:** Prof. Dr. Ubirajara Coutinho Filho  
Instituição: Universidade Federal de Uberlândia (UFU)

**Titular:** Prof. Dr. Eduardo Henrique Rosa Santos  
Instituição: Universidade Federal de Uberlândia (UFU)

**Suplente:** Dr.<sup>a</sup> Maria Carliana Mota  
Instituição: Universidade Federal de Uberlândia (UFU)

**Suplente:** Prof. Dr. Guilherme Morais Puga  
Instituição: Universidade Federal de Uberlândia (UFU)

Dedico este trabalho a Deus, que me conforta e sustenta a cada instante da minha vida. Aos meus pais, Mauro e Cleuza, que me proporcionaram caminhos para a concretização dos meus sonhos, enfim, acreditam em mim.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço a Deus, que tem-me sustentado até aqui. Por cuidar de mim a cada detalhe, sempre guiando os meus passos e me dando forças para superar os desafios. Por Sua infinita bondade e misericórdia. Sem Ele nada disso seria possível!

A professora Cibele Aparecida Crispim, pela orientação, oportunidade e confiança na realização deste projeto. Agradeço também por todos os ensinamentos que certamente contribuíram para minha formação e pelos exemplos que levarei durante toda a minha vida profissional. À você minha gratidão e admiração.

A toda a minha família, que tanto amo, em especial aos meus pais Mauro Fernandes Teixeira e Cleuza Raspante Teixeira, pelo exemplo de vida que sempre foram para mim, pela dedicação e amor. Pelas muitas vezes que renunciaram os seus sonhos, para que, pudesse realizar o meu. E mesmo em meio a tantas dificuldades, priorizaram os meus estudos, me dando a oportunidade de um futuro melhor. Aos meus irmãos Michele Raspante Teixeira Oliveira e Matheus Raspante Teixeira por toda cumplicidade, apoio e carinho. Aos meus sobrinhos e cunhados, por me incentivarem e vibrarem com minhas conquistas.

Ao meu esposo Max Berto Cerqueira, meu companheiro e amigo, que acreditou em mim e estive sempre ao meu lado. Por toda a paciência e amor nos momentos em que precisei, por me compreender e me dar forças pra continuar, pelo ombro amigo nas horas boas e ruins. Por sempre alegrar os meus dias. Amo você!

Às amigas que Uberlândia e o doutorado me trouxeram, pela força e ajuda constante para superar as dificuldades, vocês tornaram os meus dias melhores. Em especial, a Marceila de Andrade Fuzissaki, Isabel Cristina Mallostto Emerich de Abreu e a Ísis Danielle Dias Custódio, anjos que Deus colocou em minha vida, que foram fundamentais durante esse tempo. Pelas brincadeiras, pelas risadas, pelas críticas nos momentos certos, pelas lágrimas divididas, pela preocupação e cuidado, pela companhia e amizade de todas as horas.

Aos amigos do Ceinutri, do Laboratório de Biofísicoquímica (LaBFiQ) e dos grupos de estudo em nutrição esportiva e bioestatística (GEB), pelo muito que aprendi com vocês e aos momentos de descontração compartilhados nas reuniões e na bancada. Em especial, a Luciana Alves de Medeiros, a Flávia Moure Simões de Branco e a Jordane Amaral Mendes pela paciência e pela disposição em ajudar sempre que precisei, pelas contribuições que iniciaram na coleta e tabulação dos dados, e depois se tornaram grandes amigas. A minha gratidão e a certeza de, que sem todos vocês, esse trabalho não seria possível.

Aos meus coorientadores professores Erick Prado de Oliveira pela colaboração, competência, em todas as discussões e sugestões durante o desenvolvimento deste trabalho, e Nilson Penha Silva por ter-me acolhido na família LaBFiQ, por toda atenção, disponibilidade, não mediu esforços para me ajudar, principalmente na revisão e tradução dos artigos, e pelos muitos ensinamentos.

A professora Kátia de Angelis por toda a delicadeza com que me recebeu, cedendo seu tempo e conhecimentos para a realização das análises, e também pela revisão do artigo, e a sua aluna de doutorado Camila Paixão por toda a ajuda e desprendimento para a realização deste estudo.

Ao professor Thúlio Marques Cunha pela disponibilidade em colaborar no desenvolvimento deste estudo. À Emília Rezende Vaz e ao Felipe Cesar Gonçalves por terem ajudado efetivamente na coleta de dados, por todo apoio e dedicação.

Aos amigos do GPP São João Paulo II, do MUR Uberlândia e acólitos da Paróquia São Mateus, por serem mais que amigos, pela incessante intercessão, carinho e amizade verdadeira. Como foram importantes para o meu amadurecimento na fé e crescimento como pessoa.

Aos amigos de Ipatinga, por entenderem a minha ausência e por me apoiarem em cada decisão.

À Universidade Federal de Uberlândia e ao programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, por contribuir com minha formação acadêmica e profissional. Em especial à Gisele de Melo Rodrigues e Viviane Gonçalves, secretárias da pós-graduação, pelo apoio, prontidão e carinho com que sempre atendem a todos os alunos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

Em especial, aos funcionários do Hospital de Clínicas de Uberlândia (HC-UFU) e do Uberlândia Medical Center (UMC), os quais aceitaram participar deste estudo, agradeço pela confiança e disponibilidade em colaborarem com o desenvolvimento científico.

E a todos que, de alguma forma, contribuíram para que eu alcançasse essa vitória, o meu:

**MUITO OBRIGADA!**



*“Há três caminhos para o fracasso: não ensinar o que se sabe, não praticar o que se ensina, e não perguntar o que se ignora.”*

(São Beda)

## RESUMO

**Introdução:** Trabalhadores em turnos são indivíduos vulneráveis ao desalinhamento circadiano que ocorre pela divergência entre o relógio biológico e as obrigações sociais e laborais, como o turno de trabalho. O "Jetlag Social" (JLS) – definido como uma medida de ruptura do sistema circadiano –, é usualmente elevado em trabalhadores em turnos e está associado a doenças metabólicas e cardiovasculares em diferentes grupos populacionais. No entanto, os efeitos do JLS e do turno de trabalho sobre o estresse oxidativo e a estabilidade osmótica de membrana de eritrócitos de trabalhadores em turnos são ainda inexplorados na literatura. Essa é uma importante temática a ser abordada, tendo em vista que tanto o estresse oxidativo quanto a estabilidade osmótica de membrana de eritrócitos estão envolvidos em diversos processos fisiopatológicos. **Objetivo:** Avaliar a associação entre turnos de trabalho, jetlag social, horas de sono, parâmetros de dano por estresse oxidativo, defesa antioxidante e de estabilidade de membrana em trabalhadores de turnos. **Materiais e Métodos:** Trata-se de um estudo transversal realizado com 79 homens com idade entre 21 e 65 anos e IMC médio de 27.56 ( $\pm$  4.0), que trabalhavam no turno noturno (n=37) e diurno (n=42). Foram aferidos os parâmetros antropométricos (peso, altura e circunferência da cintura) e analisados no sangue os marcadores de estresse oxidativo (TBARS, Carbonilas, Peróxido de Hidrogênio -  $H_2O_2$  - e Nitritos), das defesas antioxidantes (FRAP, Superóxido dismutase, Catalase e Glutathione peroxidase), parâmetros bioquímicos e de estabilidade de membrana de eritrócitos - absorvância máxima ( $A_{m\acute{a}x}$ ), a absorvância mínima ( $A_{m\acute{i}n}$ ), o intervalo de concentração salina envolvido no processo de hemólise (dX) e a concentração salina em que a hemólise foi de 50% ( $H_{50}$ ). O JLS foi calculado pela diferença absoluta entre o ponto médio do sono nos dias de trabalho e descanso. **Resultados:** No estudo que avaliamos o estresse oxidativo, verificamos que o grupo noturno apresentou maiores valores de TBARS e  $H_2O_2$  em relação aos diurnos. O grupo noturno também apresentou menores valores de nitrito, FRAP, catalase e superóxido dismutase. Além disso, foi encontrada associação negativa entre o JLS e as enzimas catalase e superóxido dismutase. No estudo que envolveu a avaliação da estabilidade de membrana, foi observado que indivíduos que dormiram em média menos que 6 horas apresentaram maiores valores de  $1/H_{50}$  e de dX. Encontrou-se, também, interação entre turno e JLS para a variável  $A_{m\acute{i}n}$ , na qual o indivíduo do turno noturno e sem JLS apresentou menores valores em relação aos demais. **Conclusão:** Nossos achados sugerem que o trabalhador noturno possui maiores níveis de estresse oxidativo e menores níveis das defesas antioxidantes, sendo o JLS possivelmente um dos responsáveis por esse quadro. Em adição, a estabilidade de membrana dos eritrócitos parece ser influenciada pelas horas de sono e pelo jetlag social.

**Palavras-chave:** Estresse oxidativo. Antioxidantes. Trabalho em turnos. Jetlag social. Eritrócitos. Estabilidade de membrana. Ritmos circadianos.

## ABSTRACT

**Introduction:** Shift workers are individuals vulnerable to the circadian misalignment that occurs because of the divergence between the biological clock and social and labor obligations, such as shift work. Social Jetlag (SJL) - defined as a measure of circadian system rupture - is usually elevated in shift workers and is associated with metabolic and cardiovascular diseases in different population groups. However, the effects of SJL and work shift on oxidative stress and osmotic membrane stability of erythrocytes of shift workers are still unexplored in the literature. This is an important issue to be addressed, since both oxidative stress and osmotic stability of erythrocyte membrane are involved in several pathophysiological processes. **Objective:** To evaluate the association among work shifts, social jetlag, sleep hours parameters of oxidative stress damage, antioxidant defense and membrane stability in shift workers. **Materials and Methods:** This was a cross-sectional study of 79 men aged 21-65 years and mean BMI of 27.56 ( $\pm$  4.0), who worked at night shift (n = 37) and daytime (n = 42). The oxidative stress markers (TBARS, Carbonyls, Hydrogen Peroxide - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - and Nitrites), antioxidant defenses (FRAP, Superoxide dismutase, Catalase and Glutathione) were analyzed in the blood samples (weight, height and waist circumference) peroxidase), erythrocyte membrane stability and biochemical stability parameters - maximal absorbance (A<sub>max</sub>), minimum absorbance (A<sub>min</sub>), saline concentration involved in the hemolysis process (dX) and saline concentration where the hemolysis was 50 % (H<sub>50</sub>). SJL was calculated by the absolute difference between the midpoint of sleep on work and rest days. **Results:** In the study that evaluated the oxidative stress, we verified that the nocturnal group had higher values of TBARS and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in relation to the diurnal ones. The nocturnal group also presented lower values of nitrite, FRAP, catalase and superoxide dismutase. In addition, a negative association was found between SJL and the catalase and superoxide dismutase enzymes. In the study that involved the evaluation of membrane stability, it was observed that individuals who slept on average less than 6 hours presented higher values of 1/H<sub>50</sub> and dX. Interaction between shift and SJL was also found for the variable A<sub>min</sub>, in which the night shift and without SJL individuals presented lower values in relation to the others. **Conclusion:** Our findings suggest that the nocturnal worker has higher levels of oxidative stress and lower levels of antioxidant defenses, and SJL is possibly one of those responsible for this condition. In addition, the erythrocyte membrane stability seems to be influenced by sleep hours and social jetlag.

**Keywords:** Oxidative stress. Antioxidants. Shift work. Social Jetlag. Erythrocytes. Membrane stability. Circadian rhythms.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Figura 1 - Mecanismo de sincronização dos ritmos circadianos envolvendo o relógio central e os periféricos específicos dos tecidos no corpo.....26

Figura 2 - Parâmetros de estabilidade osmótica: absorvância máxima ( $A_{m\acute{a}x}$ ), absorvância mínima ( $A_{m\acute{i}n}$ ), intervalo de hemólise (dX) e metade da hemólise ( $H_{50}$ ).....37

### ARTIGO 1

Figura 1 - Flow chart of the volunteer recruitment process.....66

Figura 2 - Comparison of parameters of oxidative stress damage (TBARS, thiobarbituric acid reactive substances; carbonyls, plasma protein oxidation); prooxidants ( $H_2O_2$ , hydrogen peroxide; and nitrite) and antioxidant defense (FRAP, ferric reducing/antioxidant power; CAT, catalase; SOD, superoxide dismutase; and GPx, glutathione peroxidase) between night (dark grey) and day (light grey) workers, using Student's t-test or Mann-Whitney test for independent samples. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.001$  indicates statistically significant difference.....70

Figura 3 - Influence of shift work on circadian cycles and oxidative profile.....75

### ARTIGO 2

Figura 1 - Boltzmann's sigmoidal fitting of a typical curve erythrocyte lysis in relation to NaCl concentration in a shift worker volunteer.  $H_{50}$  is the NaCl concentration that promotes 50% hemolysis; dX is the salt concentration variation necessary to promote 100% hemolysis;  $A_{m\acute{i}n}$  is the minimum value of absorbance presented under conditions of blood-like osmolarity; and  $A_{m\acute{a}x}$  is the maximum value of absorbance associated with 100% hemolysis.....88

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO 1

Tabela 1 - Sociodemographic characteristics, anthropometric indices, life habits, sleep patterns, score sleepiness, chronotype and social jetlag of employees according to shift worked.....69

Tabela 2 - Main effects of interaction between work shift and Social Jetlag (SJL) for parameters of oxidative damage and antioxidant defenses, adjusted for age and workload.....72

Tabela 3 - Linear regression of SJL in relation to parameters of oxidative damage and antioxidant defense, adjusted for age and workload.....73

### ARTIGO 2

Tabela 1 - Sociodemographic characteristics, anthropometric indices, life habits, sleep patterns, score sleepiness, chronotype and social jetlag of employees according to shift worked.....89

Tabela 2 - Comparison of OSEM, hematologic and biochemical parameters between work shifts.....90

Tabela 3 - Comparison of OSEM, hematologic and biochemical variables of shift workers in relation shift and average sleep time (< 6 hours or ≥ 6 hours), and interaction shift\*hours of sleep, after adjustment for age, BMI, and physical exercise.....92

Tabela 4 - Comparison of the studied variables in relation shift and social jetlag (SJL), and the interaction shift\*SJL, after adjustment for age, body mass index, workload and exercise.....94

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

### FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

$(^1\text{O}_2)^2$  - Oxigênio singlete

$\cdot\text{OH}$  - Radical hidroxil

$A_{\text{máx}}$  - Absorbância máxima

$A_{\text{mín}}$  - Absorbância mínima

ATP – Adenosina trifosfato

CAT - Catalase

Cu,Zn-SOD - Superóxido dismutase cobre, zinco

$\text{CuCO}_3$  - Carbonato de cobre

DNA - Ácido desoxirribonucléico

dX - Intervalo de concentração salina envolvido no processo de hemólise

EPO - Eritropoetina

ERO - Espécies Reativas de Oxigênio

GPx - Glutathione peroxidase

GR - Glutathione reductase

GSH - Glutathione reduzida

GSSH - Glutathione oxidada

$\text{H}_2\text{O}_2$  - Peróxido de hidrogênio

$\text{H}_{50}$  - Concentração salina em que a hemólise foi de 50%

HDL - Lipoproteína de alta densidade

HOCl - Ácido hipocloroso

IC - Intervalo de confiança

JLS - Jetlag social

MDA - Malondialdeído

Mn-SOD - superóxido dismutase manganês

mRNA - Ácido ribonucleico mensageiro

MSF - mid-sleep on free days

MSW - mid-sleep on workdays

$\text{NO}\cdot$  - Óxido nítrico

NSQ - Núcleo supraquiasmático

$\text{O}_2$  - Gás oxigênio

$\text{O}_2^{\cdot-}$  - Radical superóxido

O<sub>3</sub> - Ozônio

OR - Odds Ratio

RR - Risco Relativo

SOD - Superóxido Dismutase

TBARS - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TNF- $\alpha$  - Fator de necrose tumoral- $\alpha$

Zn-SOD - Superóxido dismutase zinco

## **ARTIGO 1**

BMI - Body Mass Index

CAT - Catalase

DNA - Deoxyribonucleic acid

DNPH - 2,4-dinitrophenylhydrazine

ESS - Epworth Sleepiness Scale

FRAP - Ferric Reducing Antioxidant Power

GPx - Glutathione Peroxidase

GzLM - Generalized Linear Model

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Hydrogen Peroxide

HCl - Hydrochloric acid

HRPO - Horseradish peroxidase

MSF - Mid-sleep time on free days at the weekend

MSF<sup>E</sup>sc - MSFsc specific for shift workers

MSFsc - MSF with a further correction for calculated sleep debt

NADPH - Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

ROS - Reactive oxygen species

SJL - Social Jetlag

SOD - Superoxide dismutase

TBA - Thiobarbituric acid

TBARS - Thiobarbituric-Acid Reactive Substances

TCA - Trichloroacetic acid

TPTZ - 2,4,6-tripyridyl-S-triazine complex

WC - Waist circumference

## **ARTIGO 2**

$A_{\max}$  - Maximum Absorbance

$A_{\min}$  - Minimum Absorbance

BMI - Body Mass Index

dX - Variation in the NaCl concentration necessary to promote 100% hemolysis

EPO - Erythropoietin

ESS - Epworth Sleepiness Scale

GzLM - Generalized Linear Model

$H_{50}$  - NaCl concentration capable of promoting 50% hemolysis

LDL-C - Low density lipoprotein

MCV - Mean corpuscular volume

MSF - Mid-sleep time on free days at the weekend

$MSF^{E_{sc}}$  - MSFsc specific for shift workers

MSFsc - MSF with a further correction for calculated sleep debt

OSEM - Osmotic stability of the erythrocyte membrane

RDW - Red cell distribution width

SJL - Social Jetlag

TFLs - Transcriptional-translational feedback loops

WC - Waist circumference



## SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - Introdução e Fundamentação Teórica	18
1. INTRODUÇÃO	19
1.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS	20
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	21
2.1 TRABALHO EM TURNOS	21
2.1.1 Trabalho em turnos e ocorrência de doenças	22
2.2 DESSINCRONIZAÇÃO DOS RITMOS CIRCADIANOS	24
2.2.1 Jetlag Social	29
2.3 ESTRESSE OXIDATIVO E O SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE	30
2.3.1 Estresse Oxidativo e Trabalho em Turnos	34
2.4 ESTABILIDADE DE MEMBRANA DE ERITRÓCITOS	35
3. OBJETIVOS	39
3.1 Objetivo Geral	39
3.2 Objetivos Específicos	39
REFERÊNCIAS	40
CAPÍTULO 2 - ARTIGO 1: OXIDATIVE STRESS IS INFLUENCED BY NIGHT WORK AND SOCIAL JETLAG	67
Abstract	68
Introduction	69
Material and Methods	69
<i>Anthropometric Assessment</i>	70
<i>Sleep Pattern, Chronotype and Social Jetlag</i>	71
<i>Epworth Sleepiness Scale (ESS)</i>	71
<i>Blood Collection and Sample Preparation</i>	71
Determination of Lipoperoxidation by Dosage of Thiobarbituric-Acid Reactive Substances (TBARS) in Plasma	72
Determination of Protein Oxidation by Dosage of Carbonyls in Plasma	72
Determination of Superoxide Dismutase (SOD) from Erythrocytes	72
Determination of Catalase (CAT) from Erythrocytes	72
Determination of Glutathione Peroxidase (GPx) from Erythrocytes	72
Determination of Total Antioxidant Capacity in Plasma	72

Determination of Hydrogen Peroxide (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) in Plasma	73
Determination of Total Plasma Nitrite	73
<i>Statistical Analysis</i>	73
Results	73
Working hours per week, sleep patterns, score sleepiness, chronotype and social jetlag of employees according to shift worked.	74
Discussion	78
References	81
CAPÍTULO 3 - ARTIGO 2: THE ERYTHROCYTE MEMBRANE STABILITY IS INFLUENCED BY SLEEP TIME AND SOCIAL JETLAG IN SHIFT WORKERS	88
Introduction	89
Material and Methods	90
<i>Assessment of body composition</i>	91
<i>Sleep pattern, chronotype and social jetlag</i>	91
<i>Epworth Sleepiness Scale (ESS)</i>	91
<i>Biochemical dosages</i>	91
<i>Determination of the osmotic stability of the erythrocyte membrane (OSEM)</i>	92
<i>Statistical Analysis</i>	93
Results	94
Discussion	100
References	102
ANEXO A – Comprovante de Submissão do Artigo 1	107
ANEXO B – Comprovante de Submissão do Artigo 2	108
APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	109
APÊNDICE B – Conjunto de Questões Utilizado para Coleta de Dados	110

# **CAPÍTULO 1 - Introdução e Fundamentação Teórica**

## 1. INTRODUÇÃO

O número de empregos com horários de trabalho irregulares ou incomuns aumentou massivamente nas últimas décadas, correspondendo a cerca de 10% a 20% da força de trabalho na Europa e nos Estados Unidos (Stevens *et al.*, 2011). No Brasil, estima-se que 14,9% das pessoas economicamente ativas trabalham em regime noturno, ou seja, em algum período entre 22h e 5h (Brasil, 2016).

A literatura atual aponta que o trabalho em turnos representa um importante fator de risco para o ganho de peso e, conseqüentemente para o desenvolvimento de doenças metabólicas e nutricionais como a obesidade (Pietrojusti *et al.*, 2010; Konturek *et al.*, 2011; Markwald *et al.*, 2013). Acredita-se que as possíveis vias pelas quais o trabalho noturno poderia levar a obesidade seriam pela privação crônica de sono, que pode aumentar os níveis de fadiga e levar à redução da atividade física (Dinges *et al.*, 1997; Patel e Hu, 2008) e pelos efeitos neuro-hormonais que aumentam a ingestão calórica (Spiegel *et al.*, 2004; Spaeth *et al.*, 2013). Existe ainda a hipótese de que o desalinhamento circadiano – desencontro entre o relógio endógeno e o social, muito frequente entre trabalhadores em turnos -, poderia reduzir o gasto energético de repouso, levando ao ganho de peso (Patel e Hu, 2008; Markwald *et al.*, 2013; Spaeth *et al.*, 2013; Capers *et al.*, 2015), porém essa associação é pobremente explorada pela literatura.

Estudos têm apontado que condições típicas do trabalho em turnos – como a dessincronização dos ritmos biológicos e a privação de sono - estão associadas ao aumento da atividade inflamatória (Lu *et al.*, 2016), perturbação na atividade do sistema de estresse neuroendócrino (Casado *et al.*, 2008; Buyukhatipoglu *et al.*, 2010; Faraut *et al.*, 2013), redução das defesas imunológicas e formação excessiva de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Casado *et al.*, 2008; Buyukhatipoglu *et al.*, 2010). Além disso, o trabalho em turnos vem sendo associado com maior risco de desenvolver câncer (Lin *et al.*, 2015; Papantoniou *et al.*, 2016), o que pode ser pelo fato de atuar como um estressor oxidativo e reduzir o potencial dos protetores antioxidantes (Faraut *et al.*, 2013).

Um alvo celular essencial das ERO são as membranas celulares e das organelas, particularmente, das mitocôndrias e dos eritrócitos. Uma vez que o fornecimento de oxigênio para os vários órgãos em todo o corpo é realizado exclusivamente por eritrócitos, estes são constantemente expostos a radicais livres

durante toda a sua vida, que induzem peroxidação lipídica e, assim, causam alterações no funcionamento, na fluidez e funções da membrana dos mesmos (Stagsted e Young, 2002). Para se proteger da ação das ERO, os eritrócitos possuem um conjunto de enzimas que as neutralizam, como a glutathiona peroxidase (GPx), a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT) (Massafra *et al.*, 2002; Al-Naama *et al.*, 2015).

Estudos vêm demonstrando que a atividade das enzimas de defesa antioxidantes sofre influência do ritmo circadiano, ou seja, em condições normais de claro/escuro, a atividade destas enzimas exibe um ritmo cíclico de 24 horas (Kolanjiappan e Manoharan, 2005; Jimenez-Ortega *et al.*, 2009; Wilking *et al.*, 2013). Junto a isto, alguns autores defendem a existência de possível associação entre a exposição à luz durante a noite e níveis alterados de enzimas antioxidantes, principalmente os de GPx (Gromadzinska *et al.*, 2013). Diante do exposto, serão discutidos a seguir assuntos relacionados aos trabalhadores em turnos e o desalinhamento circadiano e suas possíveis consequências no estresse oxidativo, sistema de defesa antioxidante e na estabilidade de membrana de eritrócitos.

## 1.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A formatação desta tese segue o “Modelo alternativo” estabelecido pelo Programa de Pós Graduação e Pesquisa em Ciências Saúde da Universidade Federal de Uberlândia. Inicialmente, uma fundamentação teórica será apresentada como forma de revisão da literatura sobre os temas abordados na tese. Em seguida, são apresentados dois manuscritos elaborados a partir dos dados obtidos e análises estatísticas realizadas. O primeiro artigo (capítulo 1: “*Oxidative Stress Is Influenced by Night Work and Social Jetlag*”) foi submetido no periódico *Free Radical Biology & Medicine* (ANEXO A) e o segundo artigo (capítulo 2: “*The erythrocyte membrane stability is influenced by the sleep time and social jetlag in shift workers*”) foi submetido para o periódico “*Plos One*” (ANEXO B).

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 TRABALHO EM TURNOS

Para atender as demandas da sociedade moderna decorrentes do avanço da industrialização e tecnologia, vem crescendo o número de pessoas que trabalham à noite ou com horários irregulares (Moreno *et al.*, 2003). Acredita-se que o trabalho em turnos abrange aproximadamente 20% da população ativa dos países desenvolvidos (De Bacquer *et al.*, 2009; Stevens *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2014), sendo que no Brasil cerca de 14,9% trabalham em escala noturna (Brasil, 2016). Devido a crescente prevalência do trabalho em turnos em todo o mundo (Rajaratnam e Arendt, 2001; De Bacquer *et al.*, 2009), existe atualmente um grande interesse em se conhecer os efeitos adversos causados por este tipo de trabalho sobre a fisiologia humana e os ritmos biológicos (Haus e Smolensky, 2006).

Na literatura existem inúmeras definições e conceitos de trabalho em turnos. Para Costa (2003), o trabalho em turnos é uma atividade laboral que se caracteriza pela não interrupção da produção durante as 24h do dia (Costa, 2003). De forma semelhante, Waterhouse (1997) o definiu como aquele realizado fora dos horários habituais, de forma contínua durante 24 horas por meio do revezamento de equipes num mesmo posto de trabalho (Waterhouse *et al.*, 1997). Já Sallinen e Kecklund (2010) definem o trabalho em turnos como aquele realizado em horários variados e que envolve dois ou mais turnos que se diferem pelo horário de entrada e de saída no trabalho (Sallinen e Kecklund, 2010).

Os turnos de trabalho podem ser classificados em fixos ou permanentes - sempre o mesmo horário de trabalho - e também em alternantes ou rodizantes - caracterizado pela contínua modificação dos horários de trabalho, segundo uma escala previamente definida (Knauth, 1996; Driscoll *et al.*, 2007). Além disso, de acordo com o horário de entrada e saída do trabalhador da empresa, os turnos fixos podem ser categorizados em matutino - início entre 03h e 11h (Kaewlai *et al.*, 2010), diurno - início a partir de 06h e término em torno das 18h (Mcmenamin, 2007), vespertino - início às 14h e término aproximadamente às 22h (Lombardi *et al.*, 2014) e noturno - 5 horas consecutivas entre 23h e 07h (Smith *et al.*, 2005). Vale destacar que assim como para a definição de trabalho em turnos, existe também grande variedade de propostas na literatura para as escalas ou horários dos turnos.

### 2.1.1 Trabalho em turnos e ocorrência de doenças

As consequências do trabalho em turnos na saúde humana têm sido muito estudadas nas últimas décadas (Merkus *et al.*, 2012). Evidências científicas vêm apontando que o trabalho em turnos - em especial o noturno – propicia muitas implicações negativas para a saúde e bem-estar psicossocial, tais como conflitos entre trabalho e família (Haines Iii *et al.*, 2008), fadiga aumentada (Jansen *et al.*, 2003) e problemas de adaptação ao turno (Bjorvatn *et al.*, 1998). Em longo prazo, é observada maior propensão desses trabalhadores em desenvolver doenças metabólicas e nutricionais como a obesidade (Mcglynn *et al.*, 2015), diabetes (Gan *et al.*, 2015), síndrome metabólica (Pietrojusti *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2014), dislipidemias (Dochi *et al.*, 2009), além dos distúrbios gastrointestinais (Konturek *et al.*, 2011) e câncer (Akerstedt *et al.*, 2015; Rao *et al.*, 2015; Mancio *et al.*, 2018).

Um estudo de revisão sistemática e meta-análise apontou que, em comparação com o turno diurno ou a população em geral, o trabalho em turnos foi associado com maior risco de eventos vasculares, especificamente infarto do miocárdio (RR = 1,22; IC: 1,15-1,31; I<sup>2</sup>=0) e acidente vascular cerebral isquêmico (RR = 1,05; IC: 1,01-1,09; I<sup>2</sup>=0) (Vyas *et al.*, 2012). Além disso, outro estudo de meta-análise encontrou associação entre diabetes mellitus tipo 2 e trabalho em turnos em comparação com aqueles expostos apenas ao turno diurno. A probabilidade de desenvolver diabetes foi 9% maior em pessoas que foram expostas ao trabalho em turnos, sendo 42% maior nos trabalhadores de turnos rotativos em comparação aos de turno fixo (Gan *et al.*, 2015). De forma semelhante, Hansen *et al.* (2016), em estudo de coorte realizados com enfermeiros, encontraram que aqueles que trabalhavam nos turnos noturno (RR = 1,58; IC: 1,25-1,99) e vespertinos (RR = 1,29; IC: 1,04-1,59) apresentaram maior risco de apresentar diabetes (Hansen *et al.*, 2016).

Pelo fato de trabalhadores em turnos apresentarem maior predisposição para o desenvolvimento de dislipidemias, diabetes mellitus tipo 2 e excesso de peso, estudos têm relacionado o trabalho em turnos a maior prevalência e incidência de síndrome metabólica (Pietrojusti *et al.*, 2010; Itani *et al.*, 2017; Lu *et al.*, 2017). Uma possível explicação para essa associação é a disruptura circadiana. O desalinhamento circadiano leva a alterações na função de hormônios como o

cortisol, o hormônio do crescimento, a melatonina, a leptina e a grelina, afetando negativamente a manutenção da homeostase de glicose e lipídios (Boivin e Boudreau, 2014; Kim *et al.*, 2015). Tais alterações podem ser diferentes entre os turnos de trabalho, como no estudo de Crispim *et al.* (2012), que comparou as concentrações de adipocinas e de fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) entre os turnos noturno, matutino e diurno. Os indivíduos do turno matutino apresentaram menores níveis de adipocinas, o que os tornam mais propensos a resistência insulínica. Além disso, tanto o turno matutino quanto o noturno tiveram os maiores níveis de TNF- $\alpha$ , quando comparado ao turno diurno (Crispim *et al.*, 2012).

O câncer é outra enfermidade que vem apresentando associação com o trabalho em turnos, sendo esta modalidade laboral considerada fator de risco para as neoplasias de mama (Akerstedt *et al.*, 2015; Papantoniou *et al.*, 2016), pulmão (Schernhammer *et al.*, 2013) e próstata (Rao *et al.*, 2015; Mancio *et al.*, 2018). Em estudo caso-controle de base populacional (1.095 casos de câncer de próstata e 1.388 controles), Papantoniou *et al.* (2015) encontraram associação entre trabalho noturno e câncer de próstata (OR = 1,14; IC: 0,94-1,37), sendo maior com o tempo de exposição ( $\geq 28$  anos: OR = 1,37; IC: 1,05-1,81; p-tendência = 0,047). O risco foi mais pronunciado para tumores com pior prognóstico (RR = 1,40; IC: 1,05-1,86), especialmente entre indivíduos com maior duração da exposição a esta modalidade de trabalho ( $\geq 28$  anos: RR = 1,63; IC: 1,08-2,45; p-tendência = 0,027) (Papantoniou *et al.*, 2015).

A obesidade é um fator de risco para doenças crônicas, e vários estudos relatam que o excesso de peso e a obesidade são mais prevalentes entre os trabalhadores em turnos do que nos de jornada normal de trabalho (Macagnan *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2013; McGlynn *et al.*, 2015; Xiao *et al.*, 2016). Para Knutsson (2003), o trabalho em turnos pode ser uma das potenciais causas de incremento do peso corporal dos indivíduos. Estudo realizado por Xiao e Wang (2016) investigou 7.262 trabalhadores em turnos de uma indústria têxtil na China e encontrou que 64,5% dos trabalhadores apresentavam excesso de peso. Além disso, estes autores verificaram que os trabalhadores em turnos tinham 19% (IC: 1,05-1,35) e 15% (IC: 1,00-1,32) maior chance de ter sobrepeso e obesidade, respectivamente, quando comparados aos diurnos (Xiao *et al.*, 2016). Corroborando com estes achados, McGlynn *et al.*, (2015) em estudo caso-controle realizado com trabalhadoras



canadenses observaram 88% mais chance de ter obesidade nas mulheres que estavam expostas a modalidade de trabalho em turnos (Mcglynn *et al.*, 2015).

Fatores do estilo de vida são importantes mediadores que ligam o trabalho por turnos ao excesso de peso. Junto a isto, é de conhecimento da literatura que a privação de sono e a má qualidade do sono possuem associação com a obesidade (Knutsson, 2003; Macagnan *et al.*, 2012). Nesse sentido, estudos têm evidenciado que trabalhadores em turnos são indivíduos muito vulneráveis a privação de sono devido às alterações no ritmo circadiano que ocorrem pelo desalinhamento entre o período de sono, ambiente físico e social no período de 24h (Moreno *et al.*, 2003; Di Milia *et al.*, 2013; Stanojevic *et al.*, 2016; Kaliyaperumal *et al.*, 2017).

Estudos têm mostrado que a duração do sono é dependente do turno de trabalho. Drake *et al.* (2004) encontraram que 32% dos trabalhadores noturnos e 26% dos trabalhadores rotativos relataram sintomas de insônia ou sonolência excessiva, ao passo de que esses sintomas foram relatados por apenas 18% dos trabalhadores diurnos (Drake *et al.*, 2004). No estudo de Padilha *et al.* (2010), os trabalhadores do turno matutino tiveram maior duração de sono (413,2 min), quando comparado ao turno noturno (350,9 min;  $p < 0,05$ ) (Padilha *et al.*, 2010). Além disso, estes trabalhadores apresentam diferentes distúrbios no padrão de sono (Hublin *et al.*, 2001; Schlafer *et al.*, 2014), sendo o mais comum a sonolência diurna, que pode trazer consequências negativas diversas, tais como dores de cabeça, alterações na função imunológica, prejuízos na memória e no humor, problemas psíquicos, motores, sociais e familiares, absenteísmo e maior risco de acidentes (Hublin *et al.*, 2001).

## **2.2 DESSINCRONIZAÇÃO DOS RITMOS CIRCADIANOS**

Praticamente toda a vida na Terra é exposta a ciclos ambientais regulares de 24 horas gerados pela rotação do planeta. As funções corporais que são repetidas com uma periodicidade são denominadas ritmos biológicos, que podem ser eventos bioquímicos, fisiológicos ou comportamentais (Noce *et al.*, 2008). Os ritmos biológicos são fenômenos fisiológicos endógenos que promovem uma adaptação dos seres vivos ao meio ambiente, se manifestam em diferentes períodos e classificam-se em três tipos: ultradianos, infradianos e circadianos. Os ritmos ultradianos são eventos que se repetem numa frequência menor de 20 horas. Os

ritmos infradianos são eventos que se repetem numa frequência maior que 28 horas. Já os circadianos são eventos que se repetem entre 20 e 28 horas. O termo “circadiano” vem do latim *Circa diem* (“em torno de um dia”) por definir ritmos com duração de aproximadamente 24 horas (Mcclung, 2006; Huang, 2018).

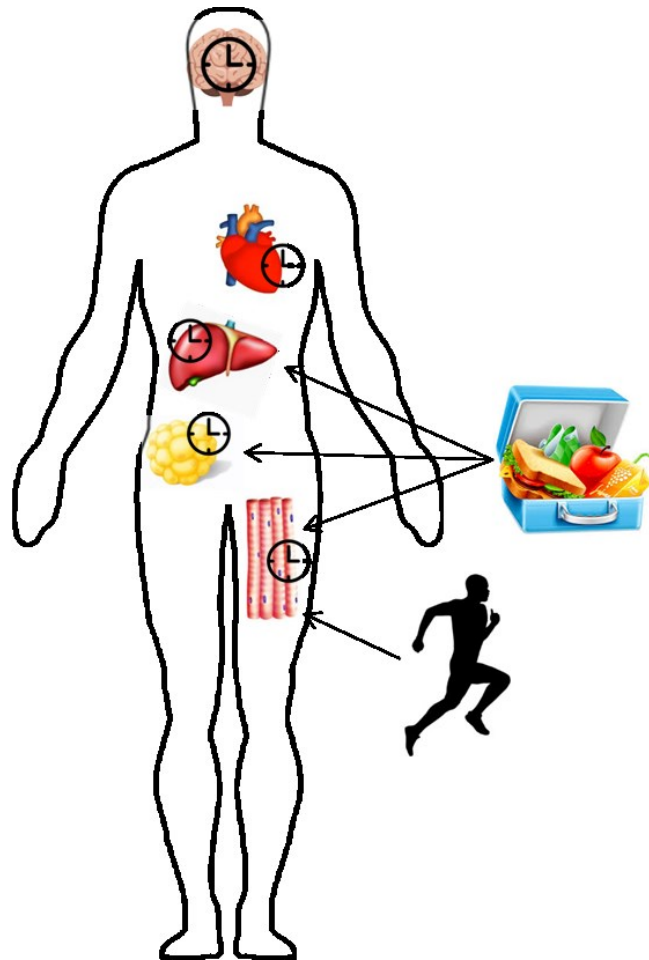
Nos mamíferos, a parte do sistema nervoso responsável pela organização do comportamento circadiano reside numa estrutura presente no hipotálamo conhecida como núcleo supraquiasmático (NSQ), considerada peça central do relógio biológico (Welsh *et al.*, 2010). O NSQ é uma estrutura bilateral que sincroniza o ritmo circadiano com o ciclo claro/escuro externo usando informações que são projetadas através do trato retino-hipotalâmico. A sincronização das células do relógio acontece por fenômenos moleculares e fisiológicos (Kalsbeek *et al.*, 2006; Depoy *et al.*, 2017), sendo composta por um conjunto de osciladores (central e periféricos), que são responsáveis por ajustar os ritmos de acordo com fatores temporais, estímulos fóticos e não fóticos (Menna-Barreto e Wey, 2007). Assim, considerando que a sincronização dos ritmos circadianos não ocorre somente via NSQ, alguns autores têm sugerido o termo “sistema de temporização circadiana” em substituição ao “relógio biológico” (Mrosovsky, 2003; Mohawk e Menaker, 2009). Por este motivo, optou-se por utilizar o termo “sistema de temporização circadiana” na presente tese, para designar a respectiva atuação sobre ritmicidade circadiana do NSQ e os órgãos alvos espalhados pelo corpo.

Cotidianamente o organismo passa por processos de ajuste de seus ritmos, através da ação de ciclos ambientais que arrastam nossos sistemas de temporização. Nesse sentido, o ciclo claro/escuro é reconhecidamente um dos mais importantes sinais ambientais, nos seres humanos, capaz de sincronizar os ritmos biológicos (Oike, 2017). O ciclo claro/escuro regula o sistema de temporização central no NSQ, no qual dominam principalmente os ritmos relacionados à atividade, tais como ciclos de sono/vigília, sistema nervoso autônomo, temperatura corporal central e secreção de melatonina (Tahara e Shibata, 2013).

Em situações de alinhamento circadiano os sistemas de temporização central e periféricos devem permanecer sincronizados entre si e com o ambiente. Sob condições fisiológicas, o sistema central no NSQ sincroniza os periféricos espalhados pelo organismo, através de várias cascatas de sinalização (Green *et al.*, 2008). Estes sistemas de temporização periféricos exibem sensibilidade diferencial para outros *zeitgebers* ambientais (termo alemão para "fornecedor de tempo"), tais

como a alimentação e atividade física (Figura 1). Por sua vez, o NSQ também regula a ingestão de alimentos, bem como as respostas fisiológicas a esse comportamento, mantendo a ritmicidade entre todos esses fatores (Gamble e Young, 2013). Além disso, os sistemas periféricos são responsáveis por ajustes de processos fisiológicos locais, incluindo a homeostase da glicose e lipídios, a secreção hormonal, a resposta imune e o sistema de digestão (Richards e Gumz, 2012).

**Figura 1** - Mecanismo de sincronização dos ritmos circadianos envolvendo os sistemas de temporização central e os periféricos específicos dos tecidos no corpo.



Fonte: Adaptado de Goede et al. (De Goede *et al.*, 2018)

Além de serem importantes sinalizadores sobre o tempo ambiental para o NSQ (Berson *et al.*, 2002), os estímulos luminosos também atuam sobre a glândula pineal, que é responsável em secretar a melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina), um neuro-hormônio importante na cronobiologia do ciclo sono/vigília (Hardeland, 2012).

Esse peptídeo possui várias funções que vão desde a coordenação da atividade circadiana, com efeito favorável ao sono, até regulação da secreção de insulina e propriedades antioxidantes (Nduhirabandi *et al.*, 2012). Existe um biorritmo circadiano endógeno sincronizado que permite a produção máxima de melatonina humana durante a noite, entre a meia-noite e às três da manhã, sendo que nos adultos o início da síntese ocorre aproximadamente entre às 21 e às 23 horas e dura cerca de 8-9 horas (Dominguez-Rodriguez *et al.*, 2010).

Como supracitado a secreção de melatonina segue um padrão programado, influenciado pela luminosidade ambiental, com seu início nas primeiras horas da noite, participando da tendência do indivíduo a conciliar o sono. Este início é considerado uma das “portas” de entrada no sono (Espino *et al.*, 2011). Assim, se um indivíduo força o estado de vigília, lutando contra o sono nesse momento propício, perde a entrada através desta porta determinada pela secreção de melatonina, tendo dificuldades depois de conciliação do sono. Obviamente, a melatonina não é o único elemento determinante desta periodicidade do ciclo sono/vigília no ser humano, mas certamente é reconhecida como um dos neuro-hormônios mais importantes (Cipolla-Neto *et al.*, 2014). Nesse sentido, a sincronicidade entre os ciclos ambientais, os ritmos circadianos internos e a harmonia entre flutuações moleculares dentro das células são essenciais para o funcionamento normal do organismo (Hardeland, 2012). A organização entre os sistemas central e periféricos envolve mecanismos genéticos, hormonais, neurológicos e comportamentais e esta dinâmica é prejudicada em circunstâncias que podem levar a dessincronização circadiana, como por exemplo, a privação de sono (Baron e Reid, 2014).

Diversos fatores ambientais exercem influência sobre nosso sistema de temporização circadiana, promovendo uma relativa plasticidade que nos permite, por exemplo, alterar nossa rotina ou adaptarmos a mudanças de fuso horário. No entanto, há limites para essa plasticidade, que impedem, por exemplo, a adaptação completa de nossos ritmos biológicos ao trabalho noturno (Moreno *et al.*, 2003). O processo de dessincronização do ritmo circadiano pode levar o organismo a esforços de adaptação que conduzirão a situações de desgaste, com repercussões orgânicas (Maury *et al.*, 2010; Covassin *et al.*, 2016). Neste sentido, os eventos que podem levar ao desalinhamento circadiano são: trabalho em turnos, extensas

jornadas de trabalho, jetlag ocasionado por mudanças de fuso horário e o jetlag social (JLS) (Wittmann *et al.*, 2006; Lima e Vargas, 2014).

O trabalhador em turnos muitas vezes ignora o sinal circadiano, se mantendo acordado mesmo precisando dormir. Os trabalhadores noturnos, por exemplo, que trabalham durante a noite e passam a dormir durante o dia, têm seus ritmos biológicos alterados, já que esses não se modificam instantaneamente (Waterhouse *et al.*, 2003). Quando o horário de sono é modificado, a relação temporal normal do ciclo sono/vigília e o marcapasso circadiano endógeno são perturbados, o que pode levar a importante alteração do ritmo circadiano (Moreno *et al.*, 2003; Di Milia *et al.*, 2013). Esta “quebra” ou dessincronização do ritmo circadiano tem sido associada ao desencadeamento de diversas desordens e doenças da atualidade (Baron e Reid, 2014; Leproult *et al.*, 2014). Junto a isto, a dessincronização entre o relógio biológico e os horários de trabalho nestes indivíduos está envolvida em efeitos deletérios graduais e cumulativos à saúde ao longo dos anos. As consequências na saúde destes trabalhadores variam de débito de sono e sonolência às doenças cardiovasculares e, até mesmo, o câncer (Faraut *et al.*, 2013), como exposto acima.

Já está bem consolidado na literatura, que a insuficiência de sono e o desalinhamento circadiano têm impactos negativos sobre a saúde e a função endócrina (Briancon-Marjollet *et al.*, 2015), metabólica (Depner *et al.*, 2014), cardiovascular (Scheer *et al.*, 2009), óssea (Everson *et al.*, 2012), imunológica (Dimitrov *et al.*, 2004), de estresse (Everson *et al.*, 2014), cognitiva e neurológica (Germain e Kupfer, 2008; Minkel *et al.*, 2012; Chellappa *et al.*, 2018). Além disso, a privação do sono juntamente com o desalinhamento circadiano crônico - condição de vida real dos trabalhadores em turnos - vêm sendo considerados estressores fisiológicos e um desafio metabólico que está frequentemente associado a alterações dos níveis de cortisol e das concentrações plasmáticas de proteínas inflamatórias (Minkel *et al.*, 2012; Wright *et al.*, 2015).

Somados às evidências dos efeitos deletérios da privação do sono sobre a saúde, outro fator importante que pode influenciar o grau de desalinhamento é o desencontro do cronotipo do indivíduo - que reflete a matutuidade ou vespertinidade individual (Zavada *et al.*, 2005; Roenneberg *et al.*, 2012), ou seja às diferenças interindividuais na ritmicidade diurna - com as obrigações sociais (Horne e Ostberg, 1976). O cronotipo inclui aspectos subjetivos, como a hora preferida para despertar, medidas de alerta e desempenho mental (Kyriacou e Hastings, 2010), e marcadores

fisiológicos de ritmicidade endógena (Randler e Schaal, 2010). Neste sentido, evidências indicam que não só a privação do sono deve ser considerada como fator de risco para diversas doenças metabólicas, mas também a dinâmica dos horários de dormir e acordar são fatores potencialmente determinantes para o desenvolvimento de desordens desta natureza (Roenneberg et al., 2012; Parsons et al., 2015; Wong et al., 2015).

### 2.2.1 Jetlag Social

O “jetlag social” (JLS) mensura a discrepância da duração de sono nos dias de trabalho e dias livres (Wittmann *et al.*, 2006; Roenneberg e Merrow, 2007). Foi assim chamado devido à semelhança ao jetlag induzido por viagens, que causa a dessincronização circadiana em um indivíduo decorrente da troca de fuso horário. Uma vez que o déficit de sono acumulado durante os dias trabalho tende a ser compensado aos finais de semana ou dias livres, o JLS ocorre cronicamente ao longo do tempo de trabalho de um indivíduo (Parsons *et al.*, 2015).

O jetlag social é obtido pela diferença absoluta entre o ponto médio do sono nos dias livres (do inglês, *mid-sleep on free days* - MSF) e o ponto médio do sono nos dias de trabalho (do inglês, *mid-sleep on workdays* - MSW) (Wittmann *et al.*, 2006; Roenneberg *et al.*, 2012). Este é atualmente considerado como uma medida do desalinhamento circadiano e pode ser analisado como uma variável linear ou de forma dicotomizada, conforme pontos de corte pré-estabelecidos (Wittmann *et al.*, 2006). Atualmente, o ponto de corte  $> 1h$  é o mais utilizado para indicar que o indivíduo possui jetlag social (Wong *et al.*, 2015; Alves *et al.*, 2017).

É provável que o JLS provoque consequências crônicas para o metabolismo devido ao desalinhamento circadiano (Juda *et al.*, 2013b). Nesse âmbito, alguns estudos já sugerem associação entre JLS com a obesidade (Roenneberg *et al.*, 2012; Parsons *et al.*, 2015), maior risco cardiovascular (Kantermann *et al.*, 2013; Mota *et al.*, 2017), sintomas depressivos (Levandovski *et al.*, 2011), tabagismo, uso de álcool, estresse mental (Wittmann *et al.*, 2006; Wittmann *et al.*, 2010) e desajustes no comportamento alimentar (Mota *et al.*, 2017). O trabalho em turnos é uma forma bem conhecida de desalinhamento circadiano e, por isso, o JLS é muito prevalente neste público (Juda *et al.*, 2013a; Vetter *et al.*, 2015), sendo mais comum

entre os trabalhadores noturnos e matutinos em comparação aos diurnos (Juda *et al.*, 2013a; Alves *et al.*, 2017).

A influência do cronotipo dos indivíduos no desenvolvimento de JLS é um ponto importante que tem sido alvo de estudos nos últimos anos (Petru *et al.*, 2005; Vetter *et al.*, 2015). Deve-se levar em consideração, que os vespertinos apresentam preferências individuais de horários para realizarem suas atividades e períodos de repouso, possuindo maior dificuldade de adaptação aos ritmos sociais impostos pelos horários de estudo e trabalho, especialmente durante os dias de semana (Wittmann *et al.*, 2006; Roenneberg *et al.*, 2012; Reutrakul *et al.*, 2013). Alguns pesquisadores observaram que o JLS é mínimo em indivíduos que alinham o cronotipo ao horário de trabalho, e sugerem ser possível planejar o turno de trabalho com base nas características cronobiológicas (Vetter *et al.*, 2015).

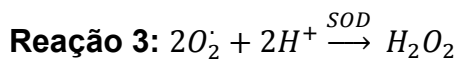
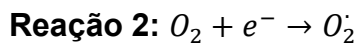
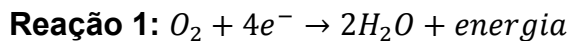
### 2.3 ESTRESSE OXIDATIVO E O SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE

O processo de instalação do estresse oxidativo decorre da existência de um desequilíbrio entre compostos pró-oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de espécies reativas de oxigênio (ERO) ou em detrimento da velocidade de remoção das mesmas (Valko *et al.*, 2007).

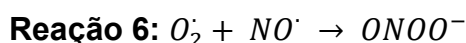
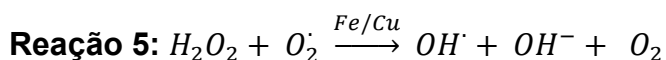
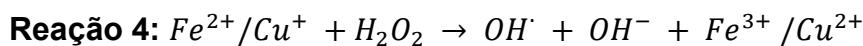
As ERO podem ser originadas tanto exógena quanto endogenamente. As fontes exógenas incluem luz ultravioleta, radiações ionizantes e agentes químicos. Já as ERO formadas intracelularmente podem ser originadas como consequência do próprio metabolismo celular ou durante processos patológicos, como por exemplo, o que ocorre em uma resposta inflamatória (Berra *et al.*, 2006). ERO é um termo bastante amplo que abrange além dos radicais de oxigênio como radical hidroxil ( $\cdot\text{OH}$ ), óxido nítrico ( $\text{NO}\cdot$ ) e radical superóxido ( $\text{O}_2\cdot^-$ ), também derivados do oxigênio que não são radicais, como peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ ), ozônio ( $\text{O}_3$ ) e oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ )<sup>2</sup> (Mates, 2000; Barreiros *et al.*, 2006).

Os mecanismos de geração de ERO ocorrem, normalmente, nas mitocôndrias, membranas celulares e no citoplasma. Na mitocôndria, o  $\text{O}_2$  sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de água (reação 1) (Barbosa *et al.*, 2010). A enzima catalisadora dessa reação é a citocromo oxidase. A ação dessa enzima controla a geração de ERO, impedindo sua geração excessiva nessa organela. No entanto, cerca de 2% a 5% do oxigênio

metabolizado nas mitocôndrias são desviados para outra via metabólica, e reduzidos de forma univalente, dando origem as ERO. Assim, o radical superóxido é formado pela adição de um elétron a uma molécula de oxigênio (reação 2) (Forman *et al.*, 2010). Por sua vez, o radical superóxido, ao receber íons de hidrogênio, gera peróxido de hidrogênio. Tal reação, conhecida por dismutação, é catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD), que acelera a reação na ordem de  $10^4$  vezes (reação 3) (Schneider e Oliveira, 2004; Dalle-Donne *et al.*, 2006).



Quando o peróxido de hidrogênio reage com íons ferro ou cobre é originado o radical hidroxil, esse processo é chamado de reação de *Fenton* (reação 4) (Koury e Donangelo, 2003). O radical hidroxil também pode ser gerado na reação de *Haber-weiss*, na qual os referidos íons catalisam a reação entre o peróxido de hidrogênio e o radical superóxido (reação 5). Além disso, o radical superóxido, quando reage com o óxido nítrico, forma o peroxinitrito (reação 6). Nesse sentido, observa-se que a produção de ERO se dá mediante reações específicas, catalisadas por enzimas e com a participação dos íons ferro e cobre (Dalle-Donne *et al.*, 2006; Barbosa *et al.*, 2010).



No organismo, as ERO encontram-se envolvidas na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular, mediação da transferência de elétrons nas várias reações bioquímicas e síntese de substâncias



biológicas importantes (Forman *et al.*, 2010). No entanto, seu excesso apresenta efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação dos lipídios de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, aos carboidratos e ao DNA (Evans *et al.*, 2004; Barreiros *et al.*, 2006). Assim, a produção exacerbada de ERO leva ao estresse oxidativo e pode resultar na oxidação de biomoléculas, com consequente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecidos (Valko *et al.*, 2007).

A oxidação de proteínas é mais frequentemente representada pela formação de derivados de carbonila, caracterizada pela adição de um grupo carbonila, como aldeído ou cetona, a partir de uma cascata de reações oxidativas irreversíveis e irreparáveis. Tais reações podem levar à perda da função catalítica ou estrutural, fazendo com que essas proteínas fiquem suscetíveis à degradação proteolítica (Bloomer *et al.*, 2007). Já a peroxidação lipídica ocorre por meio de uma reação em cadeia que envolve a oxidação e destruição das estruturas poli-insaturada e fosfolipídica da membrana celular, levando à perda de sua deformabilidade normal e propriedades biológicas, como grau de fluidez, tornando as membranas mais suscetíveis à hemólise (Pham-Huy *et al.*, 2008; Voskou *et al.*, 2015). No que se refere aos seus produtos finais, tem havido ampla medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), um marcador indireto da peroxidação lipídica, além da avaliação de um aldeído importante, o malondialdeído (Ramel *et al.*, 2004). Este último é capaz de interagir com ácidos nucleicos e outras proteínas, levando a formação de compostos de características genotóxicas. Assim, o aumento na peroxidação lipídica pode levar a prejuízos na função fisiológica normal, ou seja, perda de fluidez e aumento da permeabilidade da membrana, com perda de proteínas citosólicas e alterações na função enzimática (Bloomer e Goldfarb, 2004).

Evolutivamente foram elaboradas várias estratégias antioxidantes para as células lidarem com a toxicidade do oxigênio. Um antioxidante é, por definição, qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, atrasa significativamente ou inibe a oxidação de substratos pelas ERO (Uchiyama *et al.*, 2006). Estas substâncias possuem a capacidade de fornecer elétrons/átomos de hidrogênio as ERO sem se transformarem em moléculas instáveis. Os mecanismos de defesa antioxidante nos diferentes tecidos compreendem sistemas enzimáticos, tais como a superóxido dismutase, a catalase e a glutathione peroxidase; e não

enzimáticos, como a vitamina E, b-carotenos, ubiquinona e ubiquinol, flavonoides, vitamina C e glutathione (Berra *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2007).

A catalase (CAT) é uma enzima contendo ferro heme que converte o peróxido de hidrogênio a água e oxigênio, estando em grande parte localizada em organelas celulares, como os peroxissomos. Mitocôndrias e retículo endoplasmático contêm pouca CAT. Quando a taxa de  $H_2O_2$  se eleva, acredita-se que a CAT adquira um papel importante como um mecanismo adicional de defesa antioxidante celular, evitando que essa ERO forme radical hidroxil, via reação de *Fenton* e limitando a acumulação intracelular de  $H_2O_2$  (Limon-Pacheco e Gonsebatt, 2009).

Já a glutathione peroxidase (GPx) possui uma maior afinidade pelo  $H_2O_2$  do que a CAT, o que significa que, em concentrações baixas de peróxido de hidrogênio, a GPx apresenta um papel muito mais ativo na sua remoção celular. O seu correto funcionamento está dependente da presença de selênio na sua constituição e da disponibilidade de  $H_2O_2$  e de outros hidroperóxidos, utilizando a glutathione reduzida (GSH) como doador de elétrons/hidrogênios, formando glutathione oxidada (GSSH) e água. Este funcionamento atribui à GPx um papel importante na proteção celular das membranas lipídicas, proteínas e ácidos nucleicos contra as ERO (Ferreira *et al.*, 2007; Pisoschi e Pop, 2015).

Por sua vez, a superóxido dismutase (SOD) é uma metaloproteína que metaboliza o radical superóxido gerando peróxido de hidrogênio como produto final da dismutação. Existem três isoenzimas da SOD, codificadas e reguladas de forma independente: a citosólica, superóxido dismutase cobre, zinco (Cu,Zn-SOD ou SOD<sup>1</sup>), a mitocondrial, superóxido dismutase manganês (Mn-SOD ou SOD<sup>2</sup>) e uma forma extracelular da Cu,Zn-SOD ou (SOD<sup>3</sup>) (Perry *et al.*, 2010).

Estudos têm encontrado que a expressão das enzimas antioxidantes e a atividade das mesmas possuem ritmicidade circadiana (Hardeland *et al.*, 2003; Wilking *et al.*, 2013) e, também, variações ao longo do dia no dano ao DNA, peroxidação lipídica e oxidação proteica, indicando oscilações circadianas das respostas ao estresse oxidativo (Robinson e Reddy, 2014; Putker e O'Neill, 2016). Dessa forma, sugere-se que o ritmo circadiano desempenha papel significativo na resposta celular ao estresse oxidativo (Wang *et al.*, 2012).

### 2.3.1 Estresse Oxidativo e Trabalho em Turnos

A indução de estresse oxidativo modula a expressão e a atividade de enzimas antioxidantes, bem como os níveis de moléculas antioxidantes, utilizando caminhos semelhantes aos de doenças subjacentes degenerativas. A idade, o sexo, a suscetibilidade genética, os hábitos alimentares e o estilo de vida são fatores importantes que influenciam a capacidade de um organismo para montar uma resposta protetora. Assim, o acúmulo de dano oxidativo resultante da exposição crônica a fatores estressantes tem sido associado ao câncer, à aterosclerose, a doenças pulmonares e cardiovasculares (Limon-Pacheco e Gonsebatt, 2009).

Conforme previamente descrito, quando uma pessoa trabalha à noite e passa a dormir durante o dia pode haver dessincronização interna, levando a uma importante alteração do ritmo circadiano (Sand *et al.*, 2001; Waterhouse *et al.*, 2003). Nesse sentido, tanto a dessincronização dos ritmos biológicos quanto a privação de sono - ambos muito comuns nos trabalhadores em turnos -, vêm sendo associados à formação excessiva de espécies reativas de oxigênio (Casado *et al.*, 2008; Faraut *et al.*, 2013). Buyukhatipoglu *et al.* (2010) observaram aumento do estresse oxidativo após horas contínuas de trabalho, enquanto a capacidade antioxidante total diminuiu ( $p < 0.001$ ) (Buyukhatipoglu *et al.*, 2010). De forma semelhante, Sharifian *et al.* (Sharifian *et al.*, 2005) avaliaram a capacidade antioxidante total de trabalhadores em turnos, antes e após o turno de trabalho, e também observaram redução da mesma após o turno noturno. Em outro estudo realizado com enfermeiros foram observados níveis aumentados de marcadores de dano oxidativo do DNA nos trabalhadores em turnos em comparação com aqueles que trabalhavam no período diurno (Ishihara *et al.*, 2008).

Uma das possíveis explicações para a elevada resposta ao estresse oxidativo presente nesses indivíduos pode ser pelo fato do sono ser um estado de repouso dinâmico com propriedades antioxidantes, responsável em eliminar as ERO produzidas durante a vigília (Gopalakrishnan *et al.*, 2004; Villafuerte *et al.*, 2015). Ao mesmo tempo, a própria síntese de ATP produz ERO, subprodutos formados como parte do metabolismo aeróbio normal das mitocôndrias e dos peroxissomos, que são neutralizadas por moléculas antioxidantes. Dessa forma, a vigília prolongada exige maior metabolismo para manter o uso de ATP, o que requer aumento do consumo de oxigênio, resultando em produção significativamente maior de oxidantes (Pena *et*

*al.*, 1999). É possível, portanto, que as ERO e outros marcadores de estresse oxidativo se acumulem durante a vigília prolongada, podendo haver uma interdependência estreita entre o ritmo circadiano, a produção de energia e o metabolismo oxidativo (Ramanathan *et al.*, 2002; Villafuerte *et al.*, 2015).

Em adição, a dessincronização dos ritmos biológicos decorrente do trabalho em turnos leva a desregulação do eixo hipotálamo-hipófise adrenal, bem como seu mediador, o cortisol (Faraut *et al.*, 2013). Tais mudanças nos níveis de cortisol geram alterações no equilíbrio oxidativo, incluindo mudanças nos níveis de glutathione e metilação do DNA (Rains e Jain, 2011; Rahal *et al.*, 2014). Por sua vez, esse estado alterado é prevalente em diferentes distúrbios neurológicos, inclusive doenças neurodegenerativas (Deth *et al.*, 2008; Everson *et al.*, 2014).

Outro hormônio que tem seus níveis cronicamente reduzidos pela exposição a luz durante a noite nos trabalhadores em turnos é a melatonina (Folkard, 2008). A produção deste hormônio se ajusta ao ciclo claro/escuro, atuando assim como um sincronizador endógeno que estabiliza e reforça os ritmos circadianos e, também, exibe propriedades antioxidantes. Especula-se ainda que a atividade de algumas enzimas de defesa antioxidantes é estimulada pela melatonina, e que o aumento do estresse oxidativo em trabalhadores em turnos pode estar relacionado à diminuição da secreção deste hormônio (Baydas *et al.*, 2001; Poeggeler *et al.*, 2002; Rodriguez *et al.*, 2004).

## **2.4 ESTABILIDADE DE MEMBRANA DE ERITRÓCITOS**

O eritrócito apresenta papel importante na respiração celular, por conter moléculas de hemoglobina responsáveis pelo transporte de oxigênio dos pulmões para os tecidos e do dióxido de carbono dos tecidos para os pulmões. Apesar de ser uma célula aparentemente simples, os eritrócitos estão envolvidos em uma grande diversidade de processos, não apenas fisiológicos, mas também fisiopatológicos. O eritrócito é considerado o modelo primário para estudo de membrana plasmática celular animal, pelo fato de ser desprovida de núcleo e organelas (Mohandas e Gallagher, 2008).

As membranas plasmáticas de um modo geral são como barreiras seletivas que asseguram a composição interna constante das células, através do controle do transporte ativo e passivo de inúmeras moléculas (Watson, 2015). Estas membranas

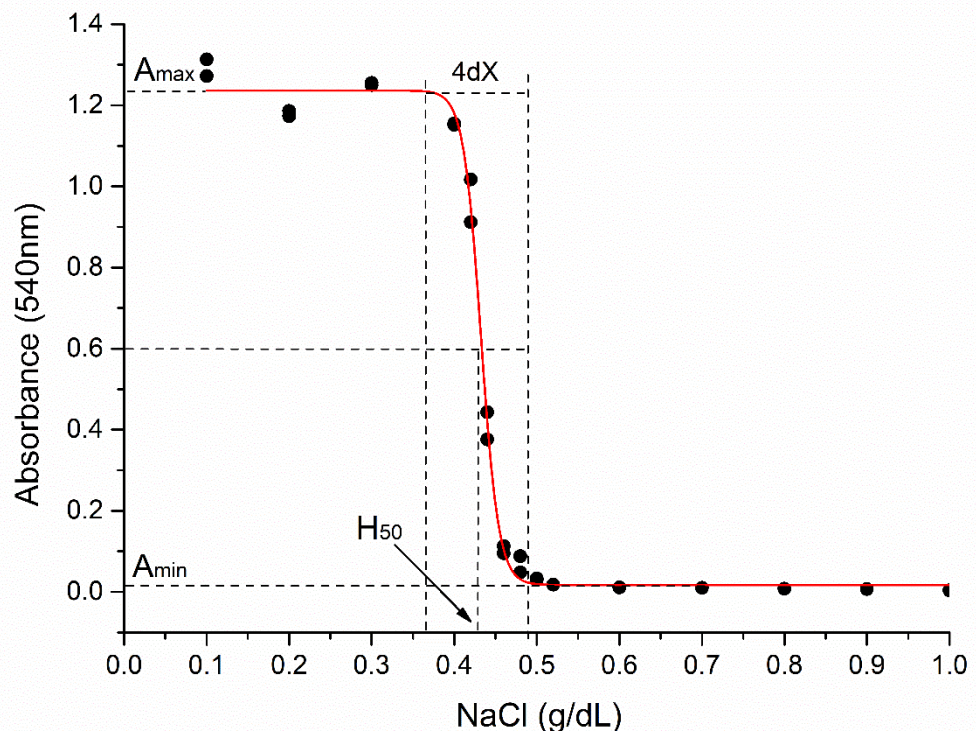
têm um sistema estrutural complexo, citoesqueleto, que envolve tanto a forma da célula, como sua mobilidade, deformabilidade e o transporte de macromoléculas. A funcionalidade da membrana celular está bastante relacionada com sua estrutura físico-química (Lemos *et al.*, 2011). Nesse sentido, as membranas biológicas possuem uma determinada capacidade de preservação de sua estrutura físico-química mesmo quando submetida à ação de agentes e/ou condições desfavoráveis, sendo esta propriedade denominada de estabilidade. As alterações na estabilidade da membrana podem desencadear um impacto considerável sobre as funções celulares, promovendo prejuízos à saúde do indivíduo. Por isso, a estabilidade de membrana celular vem sendo foco de muitos estudos nos últimos anos (Jain *et al.*, 1989; Cunha *et al.*, 2007; Custodio Afonso Rocha *et al.*, 2012; De Freitas *et al.*, 2014).

A estabilidade, então, pode ser definida como a capacidade da membrana de resistir à lise contra muitos agentes prejudiciais. Uma das formas de se fazer esse estudo é por meio de teste de fragilidade osmótica. Esse teste consiste em expor os eritrócitos a soluções salinas cada vez mais hipotônicas, que variam de 0,9 a 0,0% de NaCl, até que ocorra lise total das células (Bernardino Neto *et al.*, 2013). Assim, a curva de lise gerada através da diminuição da tonicidade do meio por decréscimo na concentração salina é dada por uma curva sigmoide decrescente (Penha-Silva *et al.*, 2008), a qual oferece parâmetros de estabilidade osmótica. Estes parâmetros incluem a absorbância máxima ( $A_{máx}$ ), a absorbância mínima ( $A_{mín}$ ), o intervalo de concentração salina envolvido no processo de hemólise ( $dX$ ) e a concentração salina em que a hemólise foi de 50% ( $H_{50}$ ) (Figura 2) (Cunha *et al.*, 2007; Penha-Silva *et al.*, 2008; Custodio Afonso Rocha *et al.*, 2012). As variáveis  $dX$  e  $1/H_{50}$  estão relacionadas diretamente com a estabilidade de membrana dos eritrócitos e foram utilizadas no nosso estudo para a análise de suas possíveis associações com as variáveis cronobiológicas, bem como os parâmetros bioquímicos e hematológicos.

Neste sentido, a estabilidade osmótica é amplamente utilizada para elucidar os mecanismos que afetam as propriedades da membrana dos eritrócitos (Walski *et al.*, 2014). Entre os fatores que afetam a estabilidade da membrana destacam-se a dieta, idade, temperatura, uso de drogas e algumas condições fisiológicas e patológicas (Bernardino Neto *et al.*, 2013). Além disso, fatores celulares intrínsecos como a proporção de colesterol em relação ao fosfolípido da membrana do

eritrócito, também influenciam a estabilidade (Chabanel *et al.*, 1983). O colesterol, devido à sua parte hidrofóbica, contribui para o aumento da afinidade entre os fosfolípidios da membrana eritrocitária, fazendo com que a mesma se torne mais rígida, o que pode refletir em aumento da resistência à expansão de volume decorrente da hipotonicidade. No entanto, uma membrana mais rígida dificulta processos que ocorrem por meio dela, como o transporte de nutrientes e a difusão de oxigênio (Marks e Johnson, 1958; Menchaca *et al.*, 1998).

**Figura 2** - Parâmetros de estabilidade osmótica: absorbância máxima ( $A_{máx}$ ), absorbância mínima ( $A_{mín}$ ), intervalo de hemólise ( $dX$ ) e metade da hemólise ( $H_{50}$ ).



Atualmente, evidências têm mostrado que as variações circadianas regulam o funcionamento de diversas células do sistema hematológico, como eritrócitos, leucócitos e trombócitos (Pritchett e Reddy, 2015). Além disso, os níveis de eritropoetina (EPO) - hormônio estimulador da produção de eritrócitos -, apresentam ritmo circadiano bem marcado, com nível médio mais baixo às 08:00h e mais alto às 20:00h (Wide *et al.*, 1989). Vale destacar que muitos aspectos do metabolismo, fisiologia e comportamento estão estruturados para antecipar as mudanças que

acompanham os ciclos de 24h transmitidos pela rotação do planeta. Dessa forma, levando em conta que o relógio molecular é essencialmente um fenômeno transcricional/translacional, não é surpreendente que os constituintes básicos da membrana, tais como os canais iônicos e os transportadores, sejam regulados em nível de mRNA (Ceriani *et al.*, 2002; Takahashi *et al.*, 2008). O potencial e a resistência elétrica de membrana em repouso (Park e Griffith, 2006; Cao e Nitabach, 2008) e até mesmo os níveis citoplasmáticos de cálcio demonstraram oscilar de forma circadiana (Colwell, 2000).

Uma vez que o ritmo circadiano está altamente relacionado à regulação transcricional de diversos genes por meio de mecanismos de retroalimentação positiva e negativa (Takahashi *et al.*, 2008; Cho *et al.*, 2012; Koike *et al.*, 2012), a descoberta da presença de ritmo circadiano nos eritrócitos foi uma grande surpresa, pois essas células não possuem núcleo celular, sendo incapazes de realizar transcrição e, portanto, não são influenciados por estas alças de retroalimentação (Pritchett e Reddy, 2015). Acredita-se que nos eritrócitos existe um mecanismo de ritmo circadiano que opera completamente independentemente dos eventos transcricionais, sendo este sujeito as oscilações do sistema redox (peroxiredoxinas) (O'Neill e Reddy, 2011).

Ao longo dos anos, tornou-se cada vez mais evidente que o relógio biológico atua em diferentes estruturas da célula, não só controlando os níveis e a atividade de proteínas, mas também modulando as propriedades estruturais da mesma (Frenkel e Ceriani, 2011). Assim, considerando que possa existir certa relação entre o desalinhamento circadiano e a estabilidade de membrana, torna-se extremamente importante compreender o efeito que esses dois fatores exercem um sobre o outro. No entanto, este tema é ainda inexplorado na literatura, principalmente em trabalhador em turnos – que se caracteriza como um importante modelo de desalinhamento circadiano.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar a associação entre o jetlag social e os parâmetros de dano por estresse oxidativo, defesa antioxidante e de estabilidade de membrana em trabalhadores em turnos.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Identificar os hábitos de sono, o cronotipo, o nível de jetlag social e de atividade física dos trabalhadores.
- Avaliar os parâmetros do estresse oxidativo e das defesas antioxidantes dos trabalhadores dos turnos diurno e noturno.
- Conhecer a estabilidade de membrana de eritrócitos dos trabalhadores dos turnos diurno e noturno.
- Estudar as associações entre jetlag social e os parâmetros do estresse oxidativo e das defesas antioxidantes dos trabalhadores dos turnos diurno e noturno.
- Comparar e associar os parâmetros de estabilidade de membrana de eritrócitos com o jetlag social e a duração de sono dos trabalhadores dos turnos diurno e noturno.



## REFERÊNCIAS

AKERSTEDT, T. et al. Night work and breast cancer in women: a Swedish cohort study. **BMJ Open**, v. 5, n. 4, p. e008127, Apr 15 2015. ISSN 2044-6055 (Electronic)

2044-6055 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25877283> >.

AL-NAAMA, L. M.; HASSAN, M. K.; MEHDI, J. K. Association of erythrocytes antioxidant enzymes and their cofactors with markers of oxidative stress in patients with sickle cell anemia. **Qatar Med J**, v. 2015, n. 2, p. 14, 2015. ISSN 0253-8253 (Print)

0253-8253 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26835411> >.

ALVES, M. S. et al. Social Jetlag Among Night Workers is Negatively Associated with the Frequency of Moderate or Vigorous Physical Activity and with Energy Expenditure Related to Physical Activity. **J Biol Rhythms**, v. 32, n. 1, p. 83-93, Feb 2017. ISSN 1552-4531 (Electronic)

0748-7304 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28006966> >.

BARBOSA, K. B. F. et al. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, 2010. ISSN 1678-9865.

BARON, K. G.; REID, K. J. Circadian misalignment and health. **Int Rev Psychiatry**, v. 26, n. 2, p. 139-54, Apr 2014. ISSN 1369-1627 (Electronic)

0954-0261 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24892891> >.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Nova Química**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BAYDAS, G. et al. Effect of melatonin on oxidative status of rat brain, liver and kidney tissues under constant light exposure. **Cell Biochem Funct**, v. 19, n. 1, p. 37-41, Mar 2001. ISSN 0263-6484 (Print)

0263-6484 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11223869> >.

BERNARDINO NETO, M. et al. Bivariate and multivariate analyses of the correlations between stability of the erythrocyte membrane, serum lipids and hematological variables. **Biorheology**, v. 50, n. 5-6, p. 305-20, 2013. ISSN 1878-5034 (Electronic)

0006-355X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24398611> >.

BERRA, C. M.; MENCK, C. F. M.; MASCIO, P. D. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1340-1344, 2006.

BERSON, D. M.; DUNN, F. A.; TAKAO, M. Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. **Science**, v. 295, n. 5557, p. 1070-3, Feb 8 2002. ISSN 1095-9203 (Electronic)

0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11834835> >.

BJORVATN, B.; KECKLUND, G.; AKERSTEDT, T. Rapid adaptation to night work at an oil platform, but slow readaptation after returning home. **J Occup Environ Med**, v. 40, n. 7, p. 601-8, Jul 1998. ISSN 1076-2752 (Print)

1076-2752 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9675718> >.

BLOOMER, R. J. et al. Protein carbonyls are acutely elevated following single set anaerobic exercise in resistance trained men. **J Sci Med Sport**, v. 10, n. 6, p. 411-7, Dec 2007. ISSN 1440-2440 (Print)

1878-1861 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16949870> >.

BLOOMER, R. J.; GOLDFARB, A. H. Anaerobic exercise and oxidative stress: a review. **Can J Appl Physiol**, v. 29, n. 3, p. 245-63, Jun 2004. ISSN 1066-7814 (Print)

1066-7814 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15199226> >.

BOIVIN, D. B.; BOUDREAU, P. Impacts of shift work on sleep and circadian rhythms. **Pathol Biol (Paris)**, v. 62, n. 5, p. 292-301, Oct 2014. ISSN 1768-3114 (Electronic)

0369-8114 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25246026> >.

BRASIL. **Pesquisa nacional de saúde : 2013 : indicadores de saúde e mercado de trabalho : Brasil e grandes regiões**. IBGE, I. B. D. G. E. E. Rio de Janeiro: 66 p. 2016.

BRIANCON-MARJOLLET, A. et al. The impact of sleep disorders on glucose metabolism: endocrine and molecular mechanisms. **Diabetol Metab Syndr**, v. 7, p. 25, 2015. ISSN 1758-5996 (Print)

1758-5996 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25834642> >.

BUYUKHATIPOGLU, H. et al. Oxidative stress increased in healthcare workers working 24-hour on-call shifts. **Am J Med Sci**, v. 340, n. 6, p. 462-7, Dec 2010. ISSN 1538-2990 (Electronic)

0002-9629 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20811270> >.

CAO, G.; NITABACH, M. N. Circadian control of membrane excitability in *Drosophila melanogaster* lateral ventral clock neurons. **J Neurosci**, v. 28, n. 25, p. 6493-501, Jun 18 2008. ISSN 1529-2401 (Electronic)

0270-6474 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18562620> >.

CAPERS, P. L. et al. A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials of the impact of sleep duration on adiposity and components of energy balance. **Obes Rev**, v. 16, n. 9, p. 771-82, Sep 2015. ISSN 1467-789X (Electronic)

1467-7881 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26098388> >.

CASADO, A. et al. Relationship between oxidative and occupational stress and aging in nurses of an intensive care unit. **Age (Dordr)**, v. 30, n. 4, p. 229-36, Dec 2008. ISSN 1574-4647 (Electronic)

0161-9152 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19424846> >.

CERIANI, M. F. et al. Genome-wide expression analysis in *Drosophila* reveals genes controlling circadian behavior. **J Neurosci**, v. 22, n. 21, p. 9305-19, Nov 1 2002. ISSN 1529-2401 (Electronic)

0270-6474 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12417656> >.

CHABANEL, A. et al. Influence of cholesterol content on red cell membrane viscoelasticity and fluidity. **Biophys J**, v. 44, n. 2, p. 171-6, Nov 1983. ISSN 0006-3495 (Print)

0006-3495 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6652212> >.

CHELLAPPA, S. L.; MORRIS, C. J.; SCHEER, F. Daily circadian misalignment impairs human cognitive performance task-dependently. **Sci Rep**, v. 8, n. 1, p. 3041, Feb 14 2018. ISSN 2045-2322 (Electronic)

2045-2322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29445188> >.

CHO, H. et al. Regulation of circadian behaviour and metabolism by REV-ERB-alpha and REV-ERB-beta. **Nature**, v. 485, n. 7396, p. 123-7, Mar 29 2012. ISSN 1476-4687 (Electronic)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22460952> >.

CIPOLLA-NETO, J. et al. Melatonin, energy metabolism, and obesity: a review. **J Pineal Res**, v. 56, n. 4, p. 371-81, May 2014. ISSN 1600-079X (Electronic)

0742-3098 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24654916> >.

COLWELL, C. S. Circadian modulation of calcium levels in cells in the suprachiasmatic nucleus. **Eur J Neurosci**, v. 12, n. 2, p. 571-6, Feb 2000. ISSN 0953-816X (Print)

0953-816X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10712636> >.

COSTA, G. Shift work and occupational medicine: an overview. **Occup Med (Lond)**, v. 53, n. 2, p. 83-8, Mar 2003. ISSN 0962-7480 (Print)

0962-7480 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12637591> >.

COVASSIN, N.; SINGH, P.; SOMERS, V. K. Keeping Up With the Clock: Circadian Disruption and Obesity Risk. **Hypertension**, v. 68, n. 5, p. 1081-1090, Nov 2016. ISSN 1524-4563 (Electronic)

0194-911X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27620394> >.

CRISPIM, C. A. et al. Adipokine levels are altered by shiftwork: a preliminary study. **Chronobiol Int**, v. 29, n. 5, p. 587-94, Jun 2012. ISSN 1525-6073 (Electronic)

0742-0528 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22621355> >.

CUNHA, C. C. et al. Effects of glycerol on the thermal dependence of the stability of human erythrocytes. **J Bioenerg Biomembr**, v. 39, n. 4, p. 341-7, Aug 2007. ISSN 0145-479X (Print)

0145-479X (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17917799> >.

CUSTODIO AFONSO ROCHA, V. et al. Evolution of nutritional, hematologic and biochemical changes in obese women during 8 weeks after Roux-en-Y gastric bypass. **Nutr Hosp**, v. 27, n. 4, p. 1134-40, Jul-Aug 2012. ISSN 1699-5198 (Electronic)

0212-1611 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23165553> >.

DALLE-DONNE, I. et al. Biomarkers of oxidative damage in human disease. **Clin Chem**, v. 52, n. 4, p. 601-23, Apr 2006. ISSN 0009-9147 (Print)

0009-9147 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16484333> >.

DE BACQUER, D. et al. Rotating shift work and the metabolic syndrome: a prospective study. **Int J Epidemiol**, v. 38, n. 3, p. 848-54, Jun 2009. ISSN 1464-3685 (Electronic)

0300-5771 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19129266> >.

DE FREITAS, M. V. et al. Influence of age on the correlations of hematological and biochemical variables with the stability of erythrocyte membrane in relation to sodium dodecyl sulfate. **Hematology**, v. 19, n. 7, p. 424-30, Oct 2014. ISSN 1607-8454 (Electronic)

1024-5332 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24290772> >.

DE GOEDE, P. et al. Circadian rhythms in mitochondrial respiration. **J Mol Endocrinol**, v. 60, n. 3, p. R115-R130, Apr 2018. ISSN 1479-6813 (Electronic)

0952-5041 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29378772> >.

DEPNER, C. M.; STOTHARD, E. R.; WRIGHT, K. P., JR. Metabolic consequences of sleep and circadian disorders. **Curr Diab Rep**, v. 14, n. 7, p. 507, Jul 2014. ISSN 1539-0829 (Electronic)

1534-4827 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24816752> >.

DEPOY, L. M.; MCCLUNG, C. A.; LOGAN, R. W. Neural Mechanisms of Circadian Regulation of Natural and Drug Reward. **Neural Plast**, v. 2017, p. 5720842, 2017. ISSN 1687-5443 (Electronic)

1687-5443 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29359051> >.

DETH, R. et al. How environmental and genetic factors combine to cause autism: A redox/methylation hypothesis. **Neurotoxicology**, v. 29, n. 1, p. 190-201, Jan 2008. ISSN 0161-813X (Print)

0161-813X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18031821> >.

DI MILIA, L. et al. Shift work disorder in a random population sample--prevalence and comorbidities. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e55306, 2013. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23372847> >.

DIMITROV, S. et al. Sleep associated regulation of T helper 1/T helper 2 cytokine balance in humans. **Brain Behav Immun**, v. 18, n. 4, p. 341-8, Jul 2004. ISSN 0889-1591 (Print)

0889-1591 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15157951> >.

DINGES, D. F. et al. Cumulative sleepiness, mood disturbance, and psychomotor vigilance performance decrements during a week of sleep restricted to 4-5 hours per night. **Sleep**, v. 20, n. 4, p. 267-77, Apr 1997. ISSN 0161-8105 (Print)

0161-8105 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9231952> >.

DOCHI, M. et al. Shift work is a risk factor for increased total cholesterol level: a 14-year prospective cohort study in 6886 male workers. **Occup Environ Med**, v. 66, n. 9, p. 592-7, Sep 2009. ISSN 1470-7926 (Electronic)

1351-0711 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19690156> >.

DOMINGUEZ-RODRIGUEZ, A. et al. Melatonin and circadian biology in human cardiovascular disease. **J Pineal Res**, v. 49, n. 1, p. 14-22, Aug 2010. ISSN 1600-079X (Electronic)

0742-3098 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20536686> >.

DRAKE, C. L. et al. Shift work sleep disorder: prevalence and consequences beyond that of symptomatic day workers. **Sleep**, v. 27, n. 8, p. 1453-62, Dec 15 2004. ISSN 0161-8105 (Print)

0161-8105 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15683134> >.

DRISCOLL, T. R.; GRUNSTEIN, R. R.; ROGERS, N. L. A systematic review of the neurobehavioural and physiological effects of shiftwork systems. **Sleep Med Rev**, v. 11, n. 3, p. 179-94, Jun 2007. ISSN 1087-0792 (Print)

1087-0792 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17418596> >.

ESPINO, J.; PARIENTE, J. A.; RODRIGUEZ, A. B. Role of melatonin on diabetes-related metabolic disorders. **World J Diabetes**, v. 2, n. 6, p. 82-91, Jun 15 2011. ISSN 1948-9358 (Electronic)

1948-9358 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21860691> >.

EVANS, M. D.; DIZDAROGLU, M.; COOKE, M. S. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. **Mutat Res**, v. 567, n. 1, p. 1-61, Sep 2004. ISSN 0027-5107 (Print)

0027-5107 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15341901> >.

EVERSON, C. A.; FOLLEY, A. E.; TOTH, J. M. Chronically inadequate sleep results in abnormal bone formation and abnormal bone marrow in rats. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 237, n. 9, p. 1101-9, Sep 2012. ISSN 1535-3699 (Electronic)

1535-3699 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22946089> >.

EVERSON, C. A. et al. Cell injury and repair resulting from sleep loss and sleep recovery in laboratory rats. **Sleep**, v. 37, n. 12, p. 1929-40, Dec 1 2014. ISSN 1550-9109 (Electronic)

0161-8105 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25325492> >.

FARAUT, B.; BAYON, V.; LEGER, D. Neuroendocrine, immune and oxidative stress in shift workers. **Sleep Med Rev**, v. 17, n. 6, p. 433-44, Dec 2013. ISSN 1532-2955 (Electronic)

1087-0792 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23618533> >.

FERREIRA, F.; FERREIRA, R.; DUARTE, J. A. Stress oxidativo e dano oxidativo muscular esquelético: influência do exercício agudo inabitual e do treino físico . **Revista Portuguesa de Ciências do Desporto**, v. 7, n. 2, p. 257-275, 2007. ISSN 1645-0523.

FOLKARD, S. Do permanent night workers show circadian adjustment? A review based on the endogenous melatonin rhythm. **Chronobiol Int**, v. 25, n. 2, p. 215-24, Apr 2008. ISSN 1525-6073 (Electronic)

0742-0528 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18533325> >.

FORMAN, H. J.; MAIORINO, M.; URSINI, F. Signaling functions of reactive oxygen species. **Biochemistry**, v. 49, n. 5, p. 835-42, Feb 9 2010. ISSN 1520-4995 (Electronic)

0006-2960 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20050630> >.

FRENKEL, L.; CERIANI, M. F. Circadian plasticity: from structure to behavior. **Int Rev Neurobiol**, v. 99, p. 107-38, 2011. ISSN 2162-5514 (Electronic)

0074-7742 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21906538> >.

GAMBLE, K. L.; YOUNG, M. E. Metabolism as an integral cog in the mammalian circadian clockwork. **Crit Rev Biochem Mol Biol**, v. 48, n. 4, p. 317-31, Jul-Aug 2013. ISSN 1549-7798 (Electronic)

1040-9238 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23594144> >.



GAN, Y. et al. Shift work and diabetes mellitus: a meta-analysis of observational studies. **Occup Environ Med**, v. 72, n. 1, p. 72-8, Jan 2015. ISSN 1470-7926 (Electronic)

1351-0711 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25030030> >.

GERMAIN, A.; KUPFER, D. J. Circadian rhythm disturbances in depression. **Hum Psychopharmacol**, v. 23, n. 7, p. 571-85, Oct 2008. ISSN 1099-1077 (Electronic)

0885-6222 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18680211> >.

GOPALAKRISHNAN, A.; JI, L. L.; CIRELLI, C. Sleep deprivation and cellular responses to oxidative stress. **Sleep**, v. 27, n. 1, p. 27-35, Feb 1 2004. ISSN 0161-8105 (Print)

0161-8105 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14998234> >.

GREEN, C. B.; TAKAHASHI, J. S.; BASS, J. The meter of metabolism. **Cell**, v. 134, n. 5, p. 728-42, Sep 5 2008. ISSN 1097-4172 (Electronic)

0092-8674 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18775307> >.

GROMADZINSKA, J. et al. Relationship between intensity of night shift work and antioxidant status in blood of nurses. **Int Arch Occup Environ Health**, v. 86, n. 8, p. 923-30, Nov 2013. ISSN 1432-1246 (Electronic)

0340-0131 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23179107> >.

HAINES III, V. Y. et al. The mediating role of work-to-family conflict in the relationship between shiftwork and depression. **Work & Stress**, v. 22, n. 4, p. 341-356, 2008.

HANSEN, A. B. et al. Night shift work and incidence of diabetes in the Danish Nurse Cohort. **Occup Environ Med**, v. 73, n. 4, p. 262-8, Apr 2016. ISSN 1470-7926 (Electronic)

1351-0711 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26889020> >.

HARDELAND, R. Neurobiology, pathophysiology, and treatment of melatonin deficiency and dysfunction. **ScientificWorldJournal**, v. 2012, p. 640389, 2012. ISSN 1537-744X (Electronic)

1537-744X (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22629173> >.

HARDELAND, R.; COTO-MONTES, A.; POEGGELER, B. Circadian rhythms, oxidative stress, and antioxidative defense mechanisms. **Chronobiol Int**, v. 20, n. 6, p. 921-62, Nov 2003. ISSN 0742-0528 (Print)

0742-0528 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14680136> >.

HAUS, E.; SMOLENSKY, M. Biological clocks and shift work: circadian dysregulation and potential long-term effects. **Cancer Causes Control**, v. 17, n. 4, p. 489-500, May 2006. ISSN 0957-5243 (Print)

0957-5243 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16596302> >.

HORNE, J. A.; OSTBERG, O. A self-assessment questionnaire to determine morningness-eveningness in human circadian rhythms. **Int J Chronobiol**, v. 4, n. 2, p. 97-110, 1976. ISSN 0300-9998 (Print)

0300-9998 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1027738> >.

HUANG, R. C. The discoveries of molecular mechanisms for the circadian rhythm: The 2017 Nobel Prize in Physiology or Medicine. **Biomed J**, v. 41, n. 1, p. 5-8, Feb 2018. ISSN 2320-2890 (Electronic)

2319-4170 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29673553> >.

HUBLIN, C. et al. Insufficient sleep--a population-based study in adults. **Sleep**, v. 24, n. 4, p. 392-400, Jun 15 2001. ISSN 0161-8105 (Print)

0161-8105 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11403523> >.

ISHIHARA, I. et al. Effect of work conditions and work environments on the formation of 8-OH-dG in nurses and non-nurse female workers. **J UOEH**, v. 30, n. 3, p. 293-308, Sep 1 2008. ISSN 0387-821X (Print)

0387-821X (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18783011> >.

ITANI, O. et al. Short sleep duration, shift work, and actual days taken off work are predictive life-style risk factors for new-onset metabolic syndrome: a seven-year

cohort study of 40,000 male workers. **Sleep Med**, v. 39, p. 87-94, Nov 2017. ISSN 1878-5506 (Electronic)

1389-9457 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29157594> >.

JAIN, S. K. et al. Erythrocyte membrane lipid peroxidation and glycosylated hemoglobin in diabetes. **Diabetes**, v. 38, n. 12, p. 1539-43, Dec 1989. ISSN 0012-1797 (Print)

0012-1797 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2583378> >.

JANSEN, N. W. et al. Work schedules and fatigue: a prospective cohort study. **Occup Environ Med**, v. 60 Suppl 1, p. i47-53, Jun 2003. ISSN 1351-0711 (Print)

1351-0711 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12782747> >.

JIMENEZ-ORTEGA, V. et al. 24-Hour variation in gene expression of redox pathway enzymes in rat hypothalamus: effect of melatonin treatment. **Redox Rep**, v. 14, n. 3, p. 132-8, 2009. ISSN 1743-2928 (Electronic)

1351-0002 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19490755> >.

JUDA, M.; VETTER, C.; ROENNEBERG, T. Chronotype modulates sleep duration, sleep quality, and social jet lag in shift-workers. **J Biol Rhythms**, v. 28, n. 2, p. 141-51, Apr 2013a. ISSN 1552-4531 (Electronic)

0748-7304 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23606613> >.

\_\_\_\_\_. The Munich ChronoType Questionnaire for Shift-Workers (MCTQShift). **J Biol Rhythms**, v. 28, n. 2, p. 130-40, Apr 2013b. ISSN 1552-4531 (Electronic)

0748-7304 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23606612> >.

KAEWLAI, R. et al. The impact of an early-morning radiologist work shift on the timeliness of communicating urgent imaging findings on portable chest radiography. **J Am Coll Radiol**, v. 7, n. 9, p. 715-21, Sep 2010. ISSN 1558-349X (Electronic)

1546-1440 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20816634> >.

KALIYAPERUMAL, D. et al. Effects of Sleep Deprivation on the Cognitive Performance of Nurses Working in Shift. **J Clin Diagn Res**, v. 11, n. 8, p. CC01-CC03, Aug 2017. ISSN 2249-782X (Print)

0973-709X (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28969117> >.

KALSBEEK, A. et al. SCN outputs and the hypothalamic balance of life. **J Biol Rhythms**, v. 21, n. 6, p. 458-69, Dec 2006. ISSN 0748-7304 (Print)

0748-7304 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17107936> >.

KANTERMANN, T. et al. Atherosclerotic risk and social jetlag in rotating shift-workers: first evidence from a pilot study. **Work**, v. 46, n. 3, p. 273-82, Jan 1 2013. ISSN 1875-9270 (Electronic)

1051-9815 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23324695> >.

KIM, M. J. et al. Association between shift work and obesity among female nurses: Korean Nurses' Survey. **BMC Public Health**, v. 13, p. 1204, Dec 20 2013. ISSN 1471-2458 (Electronic)

1471-2458 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24354395> >.

KIM, T. W.; JEONG, J. H.; HONG, S. C. The impact of sleep and circadian disturbance on hormones and metabolism. **Int J Endocrinol**, v. 2015, p. 591729, 2015. ISSN 1687-8337 (Print)

1687-8337 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25861266> >.

KNAUTH, P. Designing better shift systems. **Appl Ergon**, v. 27, n. 1, p. 39-44, Feb 1996. ISSN 0003-6870 (Print)

0003-6870 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15676310> >.

KNUTSSON, A. Health disorders of shift workers. **Occup Med (Lond)**, v. 53, n. 2, p. 103-8, Mar 2003. ISSN 0962-7480 (Print)

0962-7480 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12637594> >.

KOIKE, N. et al. Transcriptional architecture and chromatin landscape of the core circadian clock in mammals. **Science**, v. 338, n. 6105, p. 349-54, Oct 19 2012. ISSN 1095-9203 (Electronic)

0036-8075 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22936566> >.

KOLANJIAPPAN, K.; MANOHARAN, S. Diurnal rhythmicity of thiobarbituric acid reactive substances and antioxidants in experimental mammary carcinogenesis. **Exp Oncol**, v. 27, n. 4, p. 298-302, Dec 2005. ISSN 1812-9269 (Print)

1812-9269 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16404350> >.

KONTUREK, P. C.; BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, S. J. Gut clock: implication of circadian rhythms in the gastrointestinal tract. **J Physiol Pharmacol**, v. 62, n. 2, p. 139-50, Apr 2011. ISSN 1899-1505 (Electronic)

0867-5910 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21673361> >.

KOURY, J. C.; DONANGELO, C. M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Revista de Nutrição**, v. 16, n. 4, p. 433-441, 2003.

KYRIACOU, C. P.; HASTINGS, M. H. Circadian clocks: genes, sleep, and cognition. **Trends Cogn Sci**, v. 14, n. 6, p. 259-67, Jun 2010. ISSN 1879-307X (Electronic)

1364-6613 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20418150> >.

LEMOS, G. S. et al. Influence of glucose concentration on the membrane stability of human erythrocytes. **Cell Biochem Biophys**, v. 61, n. 3, p. 531-7, Dec 2011. ISSN 1559-0283 (Electronic)

1085-9195 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21735128> >.

LEPROULT, R.; HOLMBACK, U.; VAN CAUTER, E. Circadian misalignment augments markers of insulin resistance and inflammation, independently of sleep loss. **Diabetes**, v. 63, n. 6, p. 1860-9, Jun 2014. ISSN 1939-327X (Electronic)

0012-1797 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24458353> >.

LEVANDOVSKI, R. et al. Depression scores associate with chronotype and social jetlag in a rural population. **Chronobiol Int**, v. 28, n. 9, p. 771-8, Nov 2011. ISSN 1525-6073 (Electronic)

0742-0528 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21895489> >.

LIMA, L. E. B.; VARGAS, N. N. G. O Relógio Biológico e os ritmos circadianos de mamíferos: uma contextualização histórica. **Revista da Biologia**, v. 12, n. 2, p. 1-7, 2014. ISSN 1984-5154.

LIMON-PACHECO, J.; GONSEBATT, M. E. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. **Mutat Res**, v. 674, n. 1-2, p. 137-47, Mar 31 2009. ISSN 0027-5107 (Print)

0027-5107 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18955158> >.

LIN, Y. et al. Association between shift work and the risk of death from biliary tract cancer in Japanese men. **BMC Cancer**, v. 15, p. 757, Oct 21 2015. ISSN 1471-2407 (Electronic)

1471-2407 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26490349> >.

LOMBARDI, D. A. et al. The impact of shift starting time on sleep duration, sleep quality, and alertness prior to injury in the People's Republic of China. **Chronobiol Int**, v. 31, n. 10, p. 1201-8, Dec 2014. ISSN 1525-6073 (Electronic)

0742-0528 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25216207> >.

LU, L. F. et al. Relationship between shift work and peripheral total and differential leukocyte counts in Chinese steel workers. **J Occup Health**, v. 58, n. 1, p. 81-8, 2016. ISSN 1348-9585 (Electronic)

1341-9145 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26549833> >.

LU, Y. C. et al. Shift work is associated with metabolic syndrome in male steel workers-the role of resistin and WBC count-related metabolic derangements. **Diabetol Metab Syndr**, v. 9, p. 83, 2017. ISSN 1758-5996 (Print)

1758-5996 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29075331> >.

MACAGNAN, J. et al. Impact of nightshift work on overweight and abdominal obesity among workers of a poultry processing plant in southern Brazil. **Chronobiol Int**, v. 29, n. 3, p. 336-43, Apr 2012. ISSN 1525-6073 (Electronic)

0742-0528 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22390246> >.

MANCIO, J. et al. Does the association of prostate cancer with night-shift work differ according to rotating vs. fixed schedule? A systematic review and meta-analysis. **Prostate Cancer Prostatic Dis**, Apr 27 2018. ISSN 1476-5608 (Electronic)

1365-7852 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29700389> >.

MARKS, P. A.; JOHNSON, A. B. Relationship between the age of human erythrocytes and their osmotic resistance: a basis for separating young and old erythrocytes. **J Clin Invest**, v. 37, n. 11, p. 1542-8, Nov 1958. ISSN 0021-9738 (Print)

0021-9738 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13587663> >.

MARKWALD, R. R. et al. Impact of insufficient sleep on total daily energy expenditure, food intake, and weight gain. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 14, p. 5695-700, Apr 2 2013. ISSN 1091-6490 (Electronic)

0027-8424 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23479616> >.

MASSAFRA, C. et al. Gender-related differences in erythrocyte glutathione peroxidase activity in healthy subjects. **Clin Endocrinol (Oxf)**, v. 57, n. 5, p. 663-7, Nov 2002. ISSN 0300-0664 (Print)

0300-0664 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12390342> >.

MATES, J. M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Toxicology**, v. 153, n. 1-3, p. 83-104, Nov 16 2000. ISSN 0300-483X (Print)

0300-483X (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11090949> >.

MAURY, E.; RAMSEY, K. M.; BASS, J. Circadian rhythms and metabolic syndrome: from experimental genetics to human disease. **Circ Res**, v. 106, n. 3, p. 447-62, Feb 19 2010. ISSN 1524-4571 (Electronic)

0009-7330 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20167942> >.

MCCLUNG, C. R. Plant circadian rhythms. **Plant Cell**, v. 18, n. 4, p. 792-803, Apr 2006. ISSN 1040-4651 (Print)

1040-4651 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16595397> >.

MCGLYNN, N. et al. Shift Work and Obesity among Canadian Women: A Cross-Sectional Study Using a Novel Exposure Assessment Tool. **PLoS One**, v. 10, n. 9, p. e0137561, 2015. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26376050> >.

MCMENAMIN, T. M. Time to work: Recent trends in shift work and flexible schedules. **Monthly Labor Review**, v. 130, p. 3-15, 2007.

MENCHACA, H. J. et al. Decreased blood oxygen diffusion in hypercholesterolemia. **Surgery**, v. 124, n. 4, p. 692-8, Oct 1998. ISSN 0039-6060 (Print)

0039-6060 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9780990> >.

MENNA-BARRETO, L.; WEY, D. Ontogênese do sistema de temporização: a construção e as reformas dos ritmos biológicos ao longo da vida humana. **Psicologia USP**, v. 18, n. 2, p. 133-153, Jun 2007 2007. ISSN 1678-5177.

MERKUS, S. L. et al. The association between shift work and sick leave: a systematic review. **Occup Environ Med**, v. 69, n. 10, p. 701-12, Oct 2012. ISSN 1470-7926 (Electronic)

1351-0711 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22767871> >.

MINDEL, J. D. et al. Sleep deprivation and stressors: evidence for elevated negative affect in response to mild stressors when sleep deprived. **Emotion**, v. 12, n. 5, p. 1015-20, Oct 2012. ISSN 1931-1516 (Electronic)

1528-3542 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22309720> >.

MOHANDAS, N.; GALLAGHER, P. G. Red cell membrane: past, present, and future. **Blood**, v. 112, n. 10, p. 3939-48, Nov 15 2008. ISSN 1528-0020 (Electronic)

0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18988878> >.



MOHAWK, J. A.; MENAKER, M. Beyond the suprachiasmatic nucleus: Other circadian clocks in the brain. **Communicative & Integrative Biology**, v. 2, n. 6, p. 520-522, 2009.

MORENO, C. R. D. C.; FISCHER, F. M.; ROTENBERG, L. A saúde do trabalhador na sociedade 24 horas. **São Paulo em Perspectiva**, v. 17, n. 1, p. 34-46, 2003. ISSN 1806-9452. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/spp/v17n1/v17n1a04.pdf> >.

MOTA, M. C. et al. Social jetlag and metabolic control in non-communicable chronic diseases: a study addressing different obesity statuses. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 6358, Jul 25 2017. ISSN 2045-2322 (Electronic)

2045-2322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28743872> >.

MROSOVSKY, N. Beyond the suprachiasmatic nucleus. **Chronobiol Int**, v. 20, n. 1, p. 1-8, Jan 2003. ISSN 0742-0528 (Print)

0742-0528 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12638686> >.

NDUHIRABANDI, F.; DU TOIT, E. F.; LOCHNER, A. Melatonin and the metabolic syndrome: a tool for effective therapy in obesity-associated abnormalities? **Acta Physiol (Oxf)**, v. 205, n. 2, p. 209-23, Jun 2012. ISSN 1748-1716 (Electronic)

1748-1708 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22226301> >.

NOCE, F.; TUFIK, S.; MELLO, M. T. D. Professional drivers and working time: journey span, rest, and accidents. **Sleep Science**, v. 1, n. 1, 2008. ISSN 1984-0063. Disponível em: < <http://sleepscience.org.br/details/156/en-US/professional-drivers-and-working-time--journey-span--rest--and-accidents> >.

O'NEILL, J. S.; REDDY, A. B. Circadian clocks in human red blood cells. **Nature**, v. 469, n. 7331, p. 498-503, Jan 27 2011. ISSN 1476-4687 (Electronic)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21270888> >.

OIKE, H. Modulation of circadian clocks by nutrients and food factors. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 81, n. 5, p. 863-870, May 2017. ISSN 1347-6947 (Electronic)

0916-8451 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28114877> >.

PADILHA, H. G. et al. Metabolic responses on the early shift. **Chronobiol Int**, v. 27, n. 5, p. 1080-92, Jul 2010. ISSN 1525-6073 (Electronic)

0742-0528 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20636217> >.

PAPANTONIOU, K. et al. Breast cancer risk and night shift work in a case-control study in a Spanish population. **Eur J Epidemiol**, v. 31, n. 9, p. 867-78, Sep 2016. ISSN 1573-7284 (Electronic)

0393-2990 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26205167> >.

PAPANTONIOU, K. et al. Night shift work, chronotype and prostate cancer risk in the MCC-Spain case-control study. **Int J Cancer**, v. 137, n. 5, p. 1147-57, Sep 1 2015. ISSN 1097-0215 (Electronic)

0020-7136 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25530021> >.

PARK, D.; GRIFFITH, L. C. Electrophysiological and anatomical characterization of PDF-positive clock neurons in the intact adult *Drosophila* brain. **J Neurophysiol**, v. 95, n. 6, p. 3955-60, Jun 2006. ISSN 0022-3077 (Print)

0022-3077 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16554503> >.

PARSONS, M. J. et al. Social jetlag, obesity and metabolic disorder: investigation in a cohort study. **Int J Obes (Lond)**, v. 39, n. 5, p. 842-8, May 2015. ISSN 1476-5497 (Electronic)

0307-0565 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25601363> >.

PATEL, S. R.; HU, F. B. Short sleep duration and weight gain: a systematic review. **Obesity (Silver Spring)**, v. 16, n. 3, p. 643-53, Mar 2008. ISSN 1930-7381 (Print)

1930-7381 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18239586> >.

PENA, J. L. et al. Sleep and wakefulness modulation of the neuronal firing in the auditory cortex of the guinea pig. **Brain Res**, v. 816, n. 2, p. 463-70, Jan 23 1999. ISSN 0006-8993 (Print)

0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9878870> >.

PENHA-SILVA, N. et al. Effects of glycerol and sorbitol on the thermal dependence of the lysis of human erythrocytes by ethanol. **Bioelectrochemistry**, v. 73, n. 1, p. 23-9, Jun 2008. ISSN 1567-5394 (Print)

1567-5394 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18495554> >.

PERRY, J. J. et al. The structural biochemistry of the superoxide dismutases. **Biochim Biophys Acta**, v. 1804, n. 2, p. 245-62, Feb 2010. ISSN 0006-3002 (Print)

0006-3002 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19914407> >.

PETRU, R. et al. Effects of working permanent night shifts and two shifts on cognitive and psychomotor performance. **Int Arch Occup Environ Health**, v. 78, n. 2, p. 109-16, Mar 2005. ISSN 0340-0131 (Print)

0340-0131 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15726392> >.

PHAM-HUY, L. A.; HE, H.; PHAM-HUY, C. Free radicals, antioxidants in disease and health. **Int J Biomed Sci**, v. 4, n. 2, p. 89-96, Jun 2008. ISSN 1550-9702 (Print)

1550-9702 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23675073> >.

PIETROIUSTI, A. et al. Incidence of metabolic syndrome among night-shift healthcare workers. **Occup Environ Med**, v. 67, n. 1, p. 54-7, Jan 2010. ISSN 1470-7926 (Electronic)

1470-7926 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19737731> >.

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **Eur J Med Chem**, v. 97, p. 55-74, Jun 5 2015. ISSN 1768-3254 (Electronic)

1768-3254 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25942353> >.

POEGGELER, B. et al. Melatonin's unique radical scavenging properties - roles of its functional substituents as revealed by a comparison with its structural analogs. **J Pineal Res**, v. 33, n. 1, p. 20-30, Aug 2002. ISSN 0742-3098 (Print)

0742-3098 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12121482> >.

PRITCHETT, D.; REDDY, A. B. Circadian Clocks in the Hematologic System. **J Biol Rhythms**, v. 30, n. 5, p. 374-88, Oct 2015. ISSN 1552-4531 (Electronic)

0748-7304 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26163380> >.

PUTKER, M.; O'NEILL, J. S. Reciprocal Control of the Circadian Clock and Cellular Redox State - a Critical Appraisal. **Mol Cells**, v. 39, n. 1, p. 6-19, Jan 2016. ISSN 0219-1032 (Electronic)

1016-8478 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26810072> >.

RAHAL, A. et al. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 761264, 2014. ISSN 2314-6141 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24587990> >.

RAINS, J. L.; JAIN, S. K. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. **Free Radic Biol Med**, v. 50, n. 5, p. 567-75, Mar 1 2011. ISSN 1873-4596 (Electronic)

0891-5849 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21163346> >.

RAJARATNAM, S. M.; ARENDT, J. Health in a 24-h society. **Lancet**, v. 358, n. 9286, p. 999-1005, Sep 22 2001. ISSN 0140-6736 (Print)

0140-6736 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11583769> >.

RAMANATHAN, L. et al. Sleep deprivation decreases superoxide dismutase activity in rat hippocampus and brainstem. **Neuroreport**, v. 13, n. 11, p. 1387-90, Aug 7 2002. ISSN 0959-4965 (Print)

0959-4965 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12167758> >.

RAMEL, A.; WAGNER, K. H.; ELMADFA, I. Plasma antioxidants and lipid oxidation after submaximal resistance exercise in men. **Eur J Nutr**, v. 43, n. 1, p. 2-6, Feb 2004. ISSN 1436-6207 (Print)

1436-6207 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14991263> >.

RANDLER, C.; SCHAAL, S. Morningness-eveningness, habitual sleep-wake variables and cortisol level. **Biol Psychol**, v. 85, n. 1, p. 14-8, Sep 2010. ISSN 1873-6246 (Electronic)

0301-0511 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20450953> >.

RAO, D. et al. Does night-shift work increase the risk of prostate cancer? a systematic review and meta-analysis. **Onco Targets Ther**, v. 8, p. 2817-26, 2015. ISSN 1178-6930 (Print)

1178-6930 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26491356> >.

REUTRAKUL, S. et al. Chronotype is independently associated with glycemic control in type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 36, n. 9, p. 2523-9, Sep 2013. ISSN 1935-5548 (Electronic)

0149-5992 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23637357> >.

RICHARDS, J.; GUMZ, M. L. Advances in understanding the peripheral circadian clocks. **FASEB J**, v. 26, n. 9, p. 3602-13, Sep 2012. ISSN 1530-6860 (Electronic)

0892-6638 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22661008> >.

ROBINSON, I.; REDDY, A. B. Molecular mechanisms of the circadian clockwork in mammals. **FEBS Lett**, v. 588, n. 15, p. 2477-83, Aug 1 2014. ISSN 1873-3468 (Electronic)

0014-5793 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24911207> >.

RODRIGUEZ, C. et al. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. **J Pineal Res**, v. 36, n. 1, p. 1-9, Jan 2004. ISSN 0742-3098 (Print)

0742-3098 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14675124> >.

ROENNEBERG, T. et al. Social jetlag and obesity. **Curr Biol**, v. 22, n. 10, p. 939-43, May 22 2012. ISSN 1879-0445 (Electronic)

0960-9822 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22578422> >.

ROENNEBERG, T.; MERROW, M. Entrainment of the human circadian clock. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, v. 72, p. 293-9, 2007. ISSN 0091-7451 (Print)

0091-7451 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18419286> >.

SALLINEN, M.; KECKLUND, G. Shift work, sleep, and sleepiness - differences between shift schedules and systems. **Scand J Work Environ Health**, v. 36, n. 2, p. 121-33, Mar 2010. ISSN 1795-990X (Electronic)

0355-3140 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20119631> >.

SAND, P. et al. Naturally occurring benzodiazepines may codetermine chronotypes. **J Neural Transm (Vienna)**, v. 108, n. 6, p. 747-53, 2001. ISSN 0300-9564 (Print)

0300-9564 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11478424> >.

SCHEER, F. A. et al. Adverse metabolic and cardiovascular consequences of circadian misalignment. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 11, p. 4453-8, Mar 17 2009. ISSN 1091-6490 (Electronic)

0027-8424 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19255424> >.

SCHERNHAMMER, E. S. et al. Rotating night-shift work and lung cancer risk among female nurses in the United States. **Am J Epidemiol**, v. 178, n. 9, p. 1434-41, Nov 1 2013. ISSN 1476-6256 (Electronic)

0002-9262 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24049158> >.

SCHLAFER, O.; WENZEL, V.; HOGL, B. [Sleep disorders among physicians on shift work]. **Anaesthesist**, v. 63, n. 11, p. 844-51, Nov 2014. ISSN 1432-055X (Electronic)

0003-2417 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25213642> >.

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina e Esporte**, v. 10, n. 4, p. 308-313, 2004.

SHARIFIAN, A. et al. Shift work as an oxidative stressor. **J Circadian Rhythms**, v. 3, p. 15, Dec 28 2005. ISSN 1740-3391 (Electronic)

1740-3391 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16379673> >.

SMITH, M. R. et al. Morning melatonin has limited benefit as a soporific for daytime sleep after night work. **Chronobiol Int**, v. 22, n. 5, p. 873-88, 2005. ISSN 0742-0528 (Print)

0742-0528 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16298773> >.

SPAETH, A. M.; DINGES, D. F.; GOEL, N. Effects of Experimental Sleep Restriction on Weight Gain, Caloric Intake, and Meal Timing in Healthy Adults. **Sleep**, v. 36, n. 7, p. 981-990, Jul 1 2013. ISSN 1550-9109 (Electronic)

0161-8105 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23814334> >.

SPIEGEL, K. et al. Brief communication: Sleep curtailment in healthy young men is associated with decreased leptin levels, elevated ghrelin levels, and increased hunger and appetite. **Ann Intern Med**, v. 141, n. 11, p. 846-50, Dec 7 2004. ISSN 1539-3704 (Electronic)

0003-4819 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15583226> >.

STAGSTED, J.; YOUNG, J. F. Large differences in erythrocyte stability between species reflect different antioxidative defense mechanisms. **Free Radic Res**, v. 36, n. 7, p. 779-89, Jul 2002. ISSN 1071-5762 (Print)

1029-2470 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12180129> >.

STANOJEVIC, C.; SIMIC, S.; MILUTINOVIC, D. Health Effects of Sleep Deprivation on Nurses Working Shifts. **Med Pregl**, v. 69, n. 5-6, p. 183-188, Oct 2016. ISSN 0025-8105 (Print)

0025-8105 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29693847> >.

STEVENS, R. G. et al. Considerations of circadian impact for defining 'shift work' in cancer studies: IARC Working Group Report. **Occup Environ Med**, v. 68, n. 2, p. 154-62, Feb 2011. ISSN 1470-7926 (Electronic)

1351-0711 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20962033> >.

TAHARA, Y.; SHIBATA, S. Chronobiology and nutrition. **Neuroscience**, v. 253, p. 78-88, Dec 3 2013. ISSN 1873-7544 (Electronic)

0306-4522 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24007937> >.

TAKAHASHI, J. S. et al. The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease. **Nat Rev Genet**, v. 9, n. 10, p. 764-75, Oct 2008. ISSN 1471-0064 (Electronic)

1471-0056 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18802415> >.

UCHIYAMA, S. et al. Relationship between oxidative stress in muscle tissue and weight-lifting-induced muscle damage. **Pflugers Arch**, v. 452, n. 1, p. 109-16, Apr 2006. ISSN 0031-6768 (Print)

0031-6768 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16402246> >.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007. ISSN 1357-2725 (Print)

1357-2725 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16978905> >.

VETTER, C. et al. Aligning work and circadian time in shift workers improves sleep and reduces circadian disruption. **Curr Biol**, v. 25, n. 7, p. 907-11, Mar 30 2015. ISSN 1879-0445 (Electronic)

0960-9822 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25772446> >.

VILLAFUERTE, G. et al. Sleep deprivation and oxidative stress in animal models: a systematic review. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2015, p. 234952, 2015. ISSN 1942-0994 (Electronic)

1942-0994 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25945148> >.

VOSKOU, S. et al. Oxidative stress in beta-thalassaemia and sickle cell disease. **Redox Biol**, v. 6, p. 226-39, Dec 2015. ISSN 2213-2317 (Electronic)

2213-2317 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26285072> >.

VYAS, M. V. et al. Shift work and vascular events: systematic review and meta-analysis. **BMJ**, v. 345, p. e4800, Jul 26 2012. ISSN 1756-1833 (Electronic)

0959-535X (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22835925> >.



WALSKI, T. et al. Individual osmotic fragility distribution: a new parameter for determination of the osmotic properties of human red blood cells. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 162102, 2014. ISSN 2314-6141 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24527436> >.

WANG, F. et al. Meta-analysis on night shift work and risk of metabolic syndrome. **Obes Rev**, v. 15, n. 9, p. 709-20, Sep 2014. ISSN 1467-789X (Electronic) 1467-7881 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24888416> >.

WANG, T. A. et al. Circadian rhythm of redox state regulates excitability in suprachiasmatic nucleus neurons. **Science**, v. 337, n. 6096, p. 839-42, Aug 17 2012. ISSN 1095-9203 (Electronic) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22859819> >.

WATERHOUSE, J. et al. Measurement of, and some reasons for, differences in eating habits between night and day workers. **Chronobiol Int**, v. 20, n. 6, p. 1075-92, Nov 2003. ISSN 0742-0528 (Print) 0742-0528 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14680144> >.

WATERHOUSE, J.; MINORS, D.; REDFERN, P. Some comments on the measurement of circadian rhythms after time-zone transitions and during night work. **Chronobiol Int**, v. 14, n. 2, p. 125-32, Mar 1997. ISSN 0742-0528 (Print) 0742-0528 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9095373> >.

WATSON, H. Biological membranes. **Essays Biochem**, v. 59, p. 43-69, 2015. ISSN 1744-1358 (Electronic) 0071-1365 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26504250> >.

WELSH, D. K.; TAKAHASHI, J. S.; KAY, S. A. Suprachiasmatic nucleus: cell autonomy and network properties. **Annu Rev Physiol**, v. 72, p. 551-77, 2010. ISSN 1545-1585 (Electronic) 0066-4278 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20148688> >.

WIDE, L.; BENGTSSON, C.; BIRGEGARD, G. Circadian rhythm of erythropoietin in human serum. **Br J Haematol**, v. 72, n. 1, p. 85-90, May 1989. ISSN 0007-1048 (Print)

0007-1048 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2736245> >.

WILKING, M. et al. Circadian rhythm connections to oxidative stress: implications for human health. **Antioxid Redox Signal**, v. 19, n. 2, p. 192-208, Jul 10 2013. ISSN 1557-7716 (Electronic)

1523-0864 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23198849> >.

WITTMANN, M. et al. Social jetlag: misalignment of biological and social time. **Chronobiol Int**, v. 23, n. 1-2, p. 497-509, 2006. ISSN 0742-0528 (Print)

0742-0528 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16687322> >.

WITTMANN, M.; PAULUS, M.; ROENNEBERG, T. Decreased psychological well-being in late 'chronotypes' is mediated by smoking and alcohol consumption. **Subst Use Misuse**, v. 45, n. 1-2, p. 15-30, 2010. ISSN 1532-2491 (Electronic)

1082-6084 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20025436> >.

WONG, P. M. et al. Social Jetlag, Chronotype, and Cardiometabolic Risk. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 100, n. 12, p. 4612-20, Dec 2015. ISSN 1945-7197 (Electronic)

0021-972X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26580236> >.

WRIGHT, K. P., JR. et al. Influence of sleep deprivation and circadian misalignment on cortisol, inflammatory markers, and cytokine balance. **Brain Behav Immun**, v. 47, p. 24-34, Jul 2015. ISSN 1090-2139 (Electronic)

0889-1591 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25640603> >.

XIAO, M. Y. et al. [Relationship between shift work and overweight/obesity in male steel workers]. **Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi**, v. 37, n. 11, p. 1468-1472, Nov 10 2016. ISSN 0254-6450 (Print)

0254-6450 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28057136> >.

ZAVADA, A. et al. Comparison of the Munich Chronotype Questionnaire with the Horne-Ostberg's Morningness-Eveningness Score. **Chronobiol Int**, v. 22, n. 2, p. 267-78, 2005. ISSN 0742-0528 (Print)

0742-0528 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16021843> >.

**CAPÍTULO 2 - ARTIGO 1: OXIDATIVE STRESS  
IS INFLUENCED BY NIGHT WORK AND SOCIAL  
JETLAG**

## Oxidative Stress Is Influenced by Night Work and Social Jetlag

Kely R. C. Teixeira<sup>1</sup>, Camila P. dos Santos<sup>2</sup>, Luciana A. de Medeiros<sup>3</sup>, Jordane A. Mendes<sup>1</sup>, Thúlio M. Cunha<sup>1</sup>, Kátia de Angelis<sup>2</sup>, Nilson Penha-Silva<sup>3</sup>, Erick P. de Oliveira<sup>1</sup>, Cibele A. Crispim<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil.

<sup>2</sup> Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

<sup>3</sup> Instituto de Biotecnologia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil.

\*Corresponding author: Cibele Aparecida Crispim. Telephone: +55 34 3218 2084. Email: [cibelecrispim@gmail.com](mailto:cibelecrispim@gmail.com)

Address: Avenida Pará, 1720, Sala 2U-20, Campus Umuarama, Uberlândia, MG, 38405-320, Brazil

### Highlights

- The night workers had higher levels of oxidative damage markers and lower levels of antioxidant defense when compared to day workers.
- Social Jetlag is one of the possible factors responsible for oxidative stress in shift workers.
- Circadian misalignment decrease activity of antioxidant enzymes.

### Abstract

Social Jetlag (SJL), defined as a measure of rupture of the circadian system, is usually elevated in shift workers and is associated with metabolic and cardiovascular diseases in different population groups. However, the effects of SJL and work shift on oxidative stress profile of workers have not been explored in the literature. The objective of the present study was to evaluate the association of shift work and SJL with parameters of oxidative damage and antioxidant defense. A cross-sectional study was carried out with 79 men (21-65 years-old,  $27.56 \pm 4.0$  kg/m<sup>2</sup>) who worked at night shift (N=37) and daytime (N=42). The analyzed variables included anthropometric measures and determination of systemic levels of markers of oxidative damage and antioxidant defense. SJL was calculated by the absolute difference between the mean sleep point on working and rest days. The Generalized Linear Model (GzLM) was used to evaluate the effects of shift work and SJL on oxidative stress damage and antioxidant defense. Correlation and/or linear regression tests were used to analyze association between the studied variables. The night group presented higher systemic values of thiobarbituric acid reactive substances and oxygen peroxide, and lower levels of nitrite, total antioxidant capacity, and catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) activities in relation to the day group. In addition, negative associations were found between the SJL and the CAT and SOD enzymes. These results suggest that the night worker has higher levels of oxidative stress damage and lower levels of antioxidant defenses, being the SJL a possible responsible factor for this condition.

**Key words:** oxidative stress, antioxidants, shift work, social jetlag, circadian.

## Introduction

In Western society, the demand for work for twenty-four hours a day and seven days a week is increasing. As a result, the number of shift workers has increased massively in the last decades, corresponding to about 10% to 20% of the workforce in Europe and the United States [1] and approximately 14.9% in Brazil [2]. However, this work modality leads to circadian misalignment [3-5], which is associated with the onset of several pathological conditions such as dyslipidemia [6], obesity [7], metabolic syndrome [8], type 2 diabetes mellitus [9] and cardiovascular diseases [10], among others.

Currently, circadian misalignment has been measured by the calculation of the Social Jetlag (SJL) [10, 11], a term used in similarity to the jetlag resulting from trans-meridional journeys. However, unlike the displacement jetlag, the SJL occurs chronically throughout the professional life of the individual and can lead to chronic health effects [12]. Indeed, SJL has been associated with biomarkers of inflammation and diseases such as diabetes and obesity [13], as well as smoking, alcohol abuse and sedentary lifestyle [14].

The circadian system represents a complex temporal regulatory network, which plays an important role in the synchronization of various biological processes within the organism and in its coordination with the environment. Circadian disorders, caused by work shift, may lead to the desynchronization of multiple physiological processes and the disruption of normal homeostasis in tissues [15], leading to an increase in inflammatory activity [16], disturbance in the activity of the neuroendocrine stress system [17, 18], reduction of immunological defenses [18] and excessive formation of reactive oxygen species (ROS) [18, 19].

ROS is a very broad term that encompasses in addition to free radicals (hydroxyl radical, nitric oxide and superoxide radical), other non-radical species also derived from oxygen, such as hydrogen peroxide [20, 21]. Oxidative stress, a condition that characterizes the imbalance between oxidative and antioxidant compounds, due to the excessive generation of free radicals or the deficiency in the capacity to fight them [22, 23], leads to the oxidation of biomolecules, with consequent loss of their biological functions and generation of homeostatic breaks that can affect the cell, tissues and organs [24, 25].

Oxidative stress is considered a cardiometabolic risk factor [26] and has been related to the pathophysiology of a wide variety of diseases [27, 28], many of them highly frequent in shift workers [29, 30].

Although these concepts are already individually established in the literature [23, 31], there is still limited evidence on the relationship between SJL, oxidative stressors, antioxidant defenses and shift work. Given the importance of investigating the connection of oxidative stress to the health-illness relation of shift workers, this study was designed from the hypothesis that night workers present higher values of oxidative stress markers and lower levels of antioxidant defenses, in relation to day workers. Also, we believe that SJL is positively associated with oxidative stress markers and negatively associated with antioxidant defenses in these workers. Thus, the objective of the present study was to evaluate the association of shift work and SJL with parameters of oxidative stress damage and antioxidant defense in shift workers.

## Material and Methods

This study is in accordance with the Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) and was previously approved by the Human Research Ethics Committee of the Federal University of Uberlândia. The population of this cross-sectional study was composed of male workers from two hospitals in the city of Uberlândia, MG,

Brazil, aged between 21 and 65 years. The volunteers worked in the same routine for at least six months in administrative and health-related functions (nurse, physiotherapist, nursing technician, laboratory technician and stretcher bearers) and were classified according to their work shift in: 1) day workers, who worked only during the day, morning and/or afternoon, without developing any work activity at night, and with additional shifts always also daytime; and 2) night workers, who worked at least six hours after midnight, and with and without daytime additional work activities.

The recruitment flowchart of the volunteers, according to the adopted exclusion criteria, is represented in Figure 1. Individuals with previous illnesses and under treatment, except obesity, with work schedules different from the two classifications of this study, smokers, and users of drugs or substances with antioxidant properties were excluded from this study. All selected volunteers signed a free and informed consent form to participate in the study.

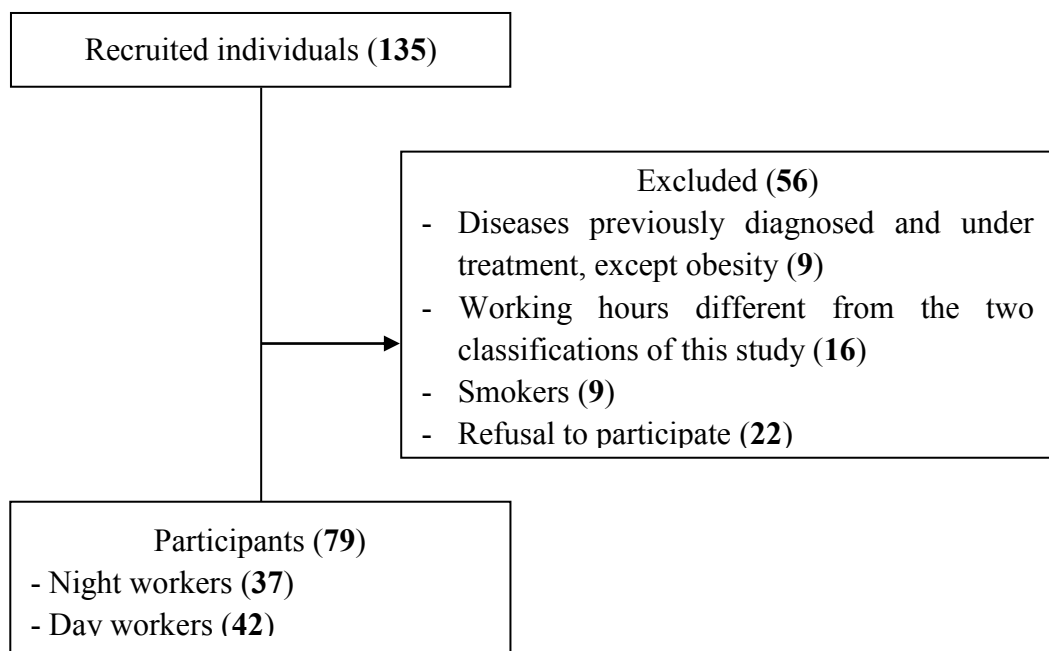


Fig. 1. Flow chart of the volunteer recruitment process.

The volunteers who met the inclusion and exclusion criteria were submitted to anthropometric, chronobiological and sleep evaluations, as well as to laboratory dosages. In addition, data on socio-demographic characteristics, physical exercise and alcohol consumption were also collected. These assessments were made in the morning after a night's sleep, before the work shift.

#### *Anthropometric Assessment*

Body mass index (BMI, kg/m<sup>2</sup>) was calculated from the weight, measured in a scale with 0.1 kg precision (Welmy™, São Paulo, SP, Brazil), and height, measured using a wall-fixed stadiometer with 0.1 cm precision (Welmy™, São Paulo, SP, Brazil) [32]. The waist circumference (WC) was measured between the last costal arch and the iliac crest in volunteers with normal BMI or overweight, as recommended by the World Health Organization [32], and at the navel level in obese volunteers [33].

### *Sleep Pattern, Chronotype and Social Jetlag*

These evaluations were performed by a specialized team trained in sleep studies based on the information compiled in the participants' responses to a previously reported questionnaire: What time do you usually go to sleep on work days? How long (how many minutes, on average) do you stay up in bed before falling asleep (after turning off the lights) on work days? At what time do you usually wake up during work days? What time do you usually go to sleep on rest days? How long (how many minutes on average) do you stay up in bed before falling asleep (after turning off the lights) on rest days? What time do you usually wake up on rest days? [34]. The answers to these questions were used to account for hours of sleep on work and rest days, taking into account the time it took for each worker to fall asleep (sleep latency).

Sleep duration was calculated using the weighted average of the self-reported sleep duration, given by the following equation: [(sleep duration reported for working days × number of days worked in the week) + (sleep duration reported for rest days × number of rest days in the week)] ÷ 7 [35].

The mid-sleep time on free days (MSF) of the weekend, with a sleep debt correction (MSF<sub>sc</sub>) given by the difference between average sleep duration at rest and work days, was used to establish the chronotype of the daytime worker [36]. A specific formula proposed by Juda et al. [37] was used to calculate MSF<sup>E</sup><sub>sc</sub> and establish the chronotype of the night worker. The shift workers were categorized in early, intermediate and late chronotypes when their MSF<sub>sc</sub> values were ≤ 3:59 h, between 4:00 and 4:59 h and ≥ 5:00 h, respectively [31]. Social jetlag was estimated with basis in the absolute difference between mid-sleep time on weekends and on weekdays [11].

### *Epworth Sleepiness Scale (ESS)*

The Epworth Sleepiness Scale (ESS) is a widely used and reliable predictor of daytime sleepiness [38], and therefore its Portuguese-language version [39], previously validated for use by Brazilian participants [40], was used to evaluate daytime sleepiness. A total score ≥ 8 was considered indicative of excessive sleepiness [39].

### *Blood Collection and Sample Preparation*

Erythrocytes were washed three times with saline and stored in a preservative solution (3.98 mM MgSO<sub>4</sub> and 0.96 mM glacial acetic acid) in an ultrafreezer at -80 °C for analysis of the activity of antioxidant defense enzymes.

Blood samples were collected by venipuncture in heparinized tubes (Vacutainer™, BD, Juiz de Fora, MG, Brazil) after 12 h of fasting and immediately centrifuged at 1,300 x g for 15 min in a refrigerated centrifuge at 4 °C (Hitachi Koki™, model CFR15XRII Hitachinaka, Japan). The obtained supernatants were then frozen at -80 °C in an ultrafreezer model CUK-UB2I-PW (Panasonic™, Nijverheidsweg, The Netherlands) for further determination of the oxidative stress variables [41]. The erythrocytes were washed three times with saline and stored in a solution of 3.98 mM MgSO<sub>4</sub> and 0.96 mM glacial acetic acid in an ultrafreezer at -80 °C for further determination of the activity of antioxidant enzymes. All blood samples were performed in a single moment, the morning after a night's sleep, before the start of the work shift.

### *Determination of Total Plasma Proteins*

The protein concentration was determined according to the method previously described by Lowry et al. [41], which uses bovine albumin solution at a concentration of 1 mg/ml as standard and 10 µL of sample.



#### Determination of Lipoperoxidation by Dosage of Thiobarbituric-Acid Reactive Substances (TBARS) in Plasma

A volume of 0.75 mL of 10% (w/v) trichloroacetic acid (TCA) was added to 0.25 mL of homogenate to denature its proteins and acidify the reaction medium. This solution was then stirred and centrifuged for 3 minutes at 1000 rpm. A mixture of 0.5 mL of its supernatant was added to 0.5 mL of 0.67% (w/v) thiobarbituric acid (TBA) was incubated at 100 °C in a thermostated water bath for 15 minutes and then cooled in an ice-water bath. Then, the absorbance generated at 535 nm, due to the reaction of the TBA with lipoperoxidation products present in the biological sample, was measured in a UV-VIS spectrophotometer [42].

#### Determination of Protein Oxidation by Dosage of Carbonyls in Plasma

Oxidatively modified plasma proteins were determined by carbonyls quantification, based on the reaction with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) in 2.5 M HCl, followed by successive washes with organic acids and solvents and final incubation with guanidine (20% v/v TCA; 10% v/v TCA; 1:1 v:v ethanol and ethyl acetate; and 6 M guanidine in 2.5 M HCl pH 2.5) [43]. The absorbance at 360 nm of carbonyls was measured in a UV-VIS spectrophotometer.

#### Determination of Superoxide Dismutase (SOD) from Erythrocytes

The determination of the SOD activity was based on the reaction of the superoxide radical with pyrogallol, with the formation of a colored product, detected spectrophotometrically at 420 nm for 2 minutes. The percentage inhibition of initial reaction rates depends on the pH and amount of SOD present in the reaction mixtures. The amount of enzyme required to inhibit the reaction by 50% was defined as one unit of SOD. The reaction mixture contained 980  $\mu$ L of 50 mM Tris-phosphate buffer pH 8.2, 10  $\mu$ L of 24 mM pyrogallol, 5  $\mu$ L of 30 mM CAT, and 5  $\mu$ L of sample. A standard line with three different concentrations of SOD (0.25, 0.5 and 1 U) was obtained to determine the equation used in the calculations [44].

#### Determination of Catalase (CAT) from Erythrocytes

The activity of CAT was determined by measuring the absorbance at 240 nm of a solution of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The decomposition rate of hydrogen peroxide is directly proportional to the activity of CAT. CAT activity was given by peroxide consumption and expressed in  $\mu$ mol/mg protein.

#### Determination of Glutathione Peroxidase (GPx) from Erythrocytes

GPx activity was expressed as nmol peroxide/hydroperoxide reduced/min/mg protein and was based on the consumption of NADPH at 480 nm [45].

#### Determination of Total Antioxidant Capacity in Plasma

The total antioxidant capacity of the plasma was determined by the Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP), based on the production of Fe<sup>2+</sup> (ferrous ion) from the reduction of the Fe<sup>3+</sup> (ferric ion) present in the 2,4,6-tripyridyl-S-triazine complex (TPTZ). The reduction reaction changes the color of the medium from light purple to dark purple, and this allows the determination of the total reduction power of a sample by reading the absorbance at 593 nm. The assays were performed on a microplate with the addition of 290  $\mu$ L of the FRAP reagent (sodium acetate and acetic acid buffer pH 3.6, 10 mM TPTZ and 20 mM ferric chloride hexahydrate) to 10  $\mu$ L of ferrous sulfate heptahydrate solutions at 0, 0.25, 0.5, and 1 mM (for the standard-line construction) or 10  $\mu$ L of sample (for FRAP determination by

interpolation in the standard line). The microplate was incubated under stirring at 37 °C for 5 min before absorbance readings [46].

#### Determination of Hydrogen Peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in Plasma

The plasma sample was initially incubated for 30 min at 37 °C in 10 mM phosphate buffer containing 140 mM NaCl and 5 mM dextrose. After adding an aliquot of this plasma treated sample to a solution containing 0.28 mM phenol red and 8.5 U/mL horseradish peroxidase (HRPO), and incubating for 5 min, a 1 M solution of NaOH was added, before reading of absorbance at 610 nm, which detects the oxidation product formed by the peroxidase-catalyzed reaction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> with phenol red. The results were expressed in μM of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [47].

#### Determination of Total Plasma Nitrite

Total plasma nitrite was determined by reacting the plasma samples with 50 μL of Griess's reagent and using a standard nitrite curve. Assays were performed on 96-well microplates in an ELISA reader at 592 nm [48] and values were expressed as nmol/mg protein.

#### *Statistical Analysis*

The statistical analysis of the data was done using the IBM SPSS software version 20.0. Initially, the normality of the data was verified with the Shapiro-Wilk Test. Parametric data were presented as means and standard deviations and non-parametric data were presented as median and interquartile range. Comparison of proportions between groups for the variables expressed as frequency was done using the Chi-square test. The comparison between groups of variables related to socio-demographic and anthropometric characteristics, sleep patterns, drowsiness scores, chronotype, social jetlag, life habits and stress parameters was done using the Student's t-test for independent samples or the Mann-Whitney Test.

The Generalized Linear Model (GzLM) was used to compare the differences of the variables of oxidative stress and antioxidant defense between shifts, SJL and shift versus SJL interaction, adjusted for age and working time per week. The Sequential Sidak Test was used to compare estimated marginal means. Multiple regression analysis with the total population and the populations of each work shift, adjusted for age and time, was used to determine if the variables of oxidative stress and antioxidant defense are associated with SJL. Statistical tests with values of  $p < 0.05$  were accepted as significant.

## **Results**

The volunteers were between 21 and 65 years of age. There was no difference between the shifts in relation to the workers' age (night: 42.43 ± 8.50; day: 43.40 ± 12.72,  $p=0.688$ ) and working time in the current shift (night: 5.00 [2.00-12.5]; day: 4.00 [2.00-10.75],  $p=0.348$ ). In addition, there was also no difference between the shifts in relation to body weight (night: 83.49 ± 11.73; day: 81.13 ± 13.97,  $p=0.427$ ), BMI (night: 27.24 [26.05-29.64]; day: 26.51 [24.00-28.49],  $p=0.115$ ), WC (night: 97.62 ± 11.04; day: 95.17 ± 11.04,  $p=0.334$ ) and duration of physical exercise per week (night: 240.0 [157.50-330.00]; day: 240.0 [135.00-435.00],  $p=0.601$ ). On the other hand, night workers presented higher workload ( $p < 0.001$ ), daytime sleepiness ( $p=0.002$ ) and SJL ( $p < 0.001$ ), as well as shorter sleep time in workdays ( $p < 0.001$ ), in relation to day workers (Table 1).

**Table 1**

Working hours per week, sleep patterns, score sleepiness, chronotype and social jetlag of employees according to shift worked.

	<b>Night (n=37)</b>	<b>Day (N=42)</b>	<b>p-value</b>
<b>Working Hours/week</b>	57.0 [42.0-69.0]	36.0 [36.0-40.0]	<0.001*
<b>Sleepiness Score (<i>Epworth</i>)</b>	10.76 ± 4.88	7.48 ± 4.00	0.002*
Daytime Sleepiness	16 (43.2)	9 (21.4)	0.037*
No Drowsiness	21 (56.8)	33 (78.6)	
<b>Mean Sleep Duration (h)</b>			
Work days	3:50 [2:22-4:27]	6:35 [5:28-7:35]	<0.001*
Rest days	7:56 ± 1:58	8:33 ± 1:52	0.170
<b>Chronotype (MSF<sup>E</sup>sc) (h)</b>	3:44 ± 1:00	3:38 ± 1:25	0.708
Morning	21 (56.8)	29 (69.0)	0.260
Indifferent	12 (32.4)	7 (16.7)	
Evening	4 (10.8)	6 (14.3)	
<b>Social Jetlag (h)</b>	5:07 [2:35-7:53]	1:15 [0:45-2:02]	<0.001*
Yes	32 (86.5)	25 (59.5)	0.011*
No	5 (13.5)	17 (40.5)	

Values are presented as mean ± SD for normally distributed data or median (interquartile range) for non-normally distributed data. Comparisons between groups were done using the Student's t-test or the Mann-Whitney test, for independent samples, for data with and without normal distribution, respectively, or by the Chi-square test, for variables expressed as frequency. \* p <0.05 indicates statistically significant difference. SJL was calculated based on the absolute difference between the average sleep time on working and rest days and was dichotomically categorized as >60 min (with SJL) or <60 min (without SJL).

The parameters of oxidative stress between the work shifts are presented in Figure 2.

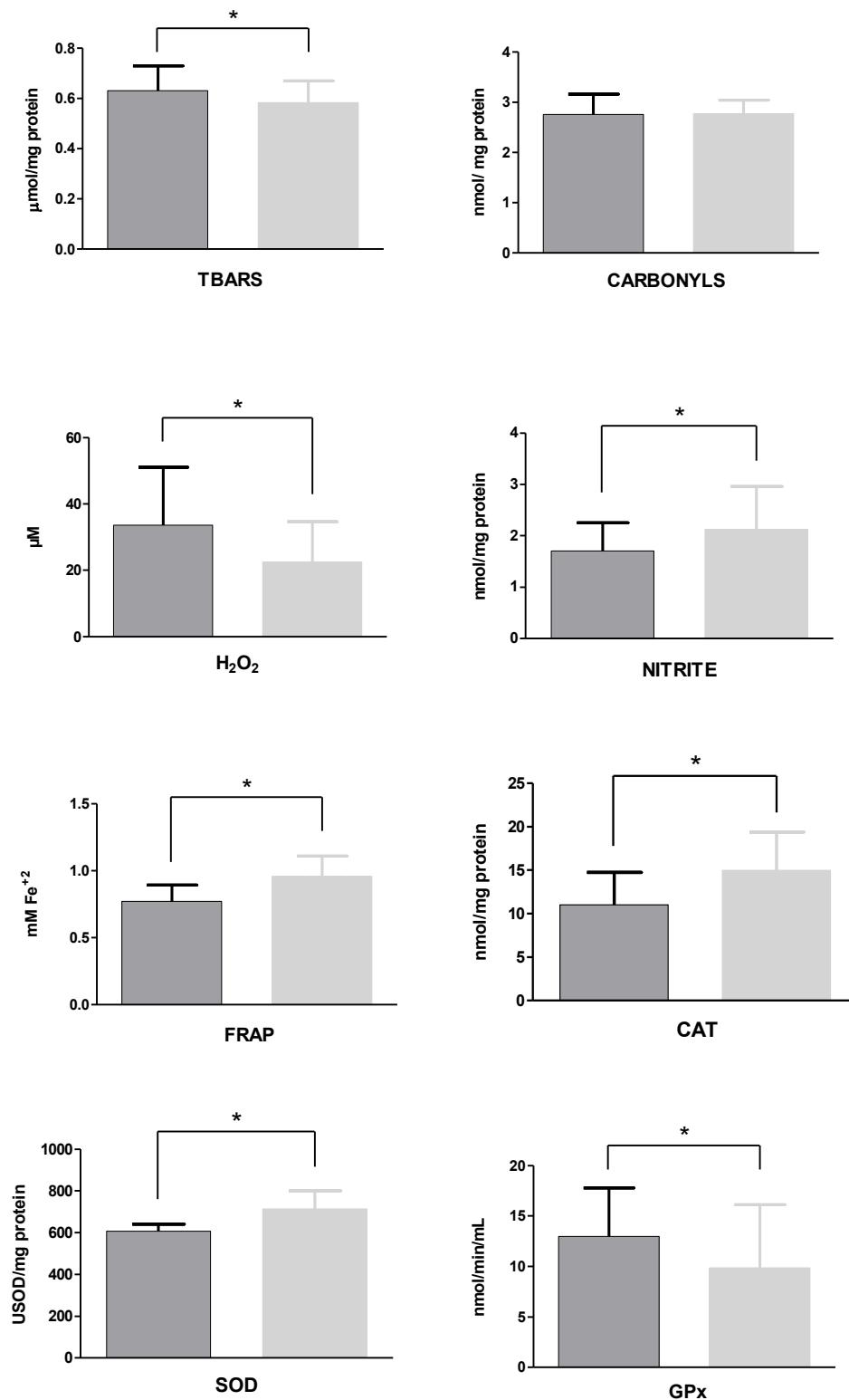


Fig. 2. Comparison of parameters of oxidative stress damage (TBARS, thiobarbituric acid reactive substances; carbonyls, plasma protein oxidation); prooxidants (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, hydrogen peroxide; and nitrite) and antioxidant defense (FRAP, *ferric* reducing/antioxidant power; CAT, catalase; SOD, superoxide dismutase; and GPx, glutathione peroxidase) between night (dark grey) and day (light grey) workers, using Student's t-test or Mann-Whitney test for independent samples. \*p<0.05 and \*\*p<0.001 indicates statistically significant difference.

Significantly higher values were found in night workers compared to day workers for the variables of lipoperoxidation (TBARS), 0.60 (0.57-0.65) and 0.57 (0.52-0.65)  $\mu\text{M}/\text{mg}$  protein ( $p=0.028$ );  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 28.70 (19.81-41.25) and 19.26 (13.33-30.18)  $\mu\text{M}$  ( $p=0.005$ ); and GPx,  $12.97\pm 4.79$  and  $9.85\pm 6.26$   $\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}$  ( $p=0.016$ ); respectively (Figure 2).

On the other hand, significantly lower values were found in night workers in relation to day worker for the variables nitrite, 1.57 (1.24-2.13) and 1.99 (1.42-2.63)  $\text{nmol}/\text{mg}$  protein ( $p=0.017$ ); FRAP, 0.76 (0.67-0.85) and 0.92 (0.84-1.03)  $\text{mM Fe(II)}$  ( $p<0.001$ ); CAT ( $11.03 \pm 3.72$  and  $14.96 \pm 4.45$   $\text{nmol}/\text{mg}$  protein ( $p<0.001$ ) and SOD, 603.41 (595.32-627.53) and 714.77 (663.99-761.29)  $\text{USOD}/\text{mg}$  protein ( $p<0.001$ ); respectively (Figure 2).

Only protein oxidation values of night and day workers, 2.65 (2.53-2.89) and 2.78 (2.65-2.99)  $\text{nmol}/\text{mg}$  protein, respectively, did not differ significantly ( $p=0.109$ ).

In relation to the variables of oxidative stress damage and antioxidant defense, the comparison of work shifts, SJL and work shift\*SJL interaction (Table 2) revealed the influence of the work shift in the variables FRAP ( $p = 0.002$ ), CAT ( $p=0.034$ ) and SOD ( $p<0.001$ ). In this analysis, significantly lower values were found in night workers compared to day workers for the variables FRAP, 0.78 (0.71-0.86) and 0.95 (0.89-1.00)  $\text{mM Fe(ii)}$ ; CAT, 11.33 (9.30-13.79) and 14.76 (13.12-16.60)  $\text{nmol}/\text{mg}$  protein; and SOD, 609 (578-641) and 712 (687-738)  $\text{U}/\text{mg}$ ; respectively. None of the analyzes found interactions between work shift and SJL.

**Table 2.**

Main effects of interaction between work shift and Social Jetlag (SJL) for parameters of oxidative damage and antioxidant defenses, adjusted for age and working hours.

	Night		Day		DF	p-value	SJL	DF	p-value	Shift*SJL	DF	p-value
	With SJL (n=33)	Without SJL (n=4)	With SJL (n=25)	Without SJL (n=17)								
<b>TBARS</b> ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein)	0.62 [0.59-0.66]	0.56 [0.49-0.65]	0.58 [0.54-0.61]	0.61 [0.57-0.66]	1	0.896	1	0.468	1	0.064	1	0.064
<b>Carbonyls</b> (nmol/mg protein)	2.79 [2.66-2.93]	2.51 [2.23-2.81]	2.74 [2.60-2.88]	2.79 [2.62-2.98]	1	0.288	1	0.237	1	0.080	1	0.080
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> ( $\mu\text{M}$ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	32.5 [26.2-40.4]	24.5 [14.9-40.3]	26.2 [20.9-32.9]	18.7 [14.2-24.7]	1	0.204	1	0.051	1	0.867	1	0.867
<b>Nitrite</b> (nmol/mg protein)	1.74 [1.53-1.97]	1.64 [1.21-2.21]	2.02 [1.77-2.30]	2.05 [1.75-2.41]	1	0.089	1	0.823	1	0.684	1	0.684
<b>FRAP</b> (mM Fe <sup>+2</sup> )	0.78 [0.73-0.83]	0.77 [0.64-0.91]	0.95 [0.89-1.02]	0.95 [0.88-1.03]	1	0.002*	1	0.961	1	0.994	1	0.994
<b>CAT</b> (nmol/mg protein)	11.1 [9.7-12.6]	11.6 [8.1-16.7]	15.2 [13.2-17.4]	14.1 [11.7-16.8]	1	0.034*	1	0.951	1	0.570	1	0.570
<b>SOD</b> (USOD/mg protein)	610 [587-633]	610 [556-669]	712 [684-742]	697 [660-736]	1	<0.001*	1	0.915	1	0.900	1	0.900
<b>GPx</b> (nmol/min/mL)	12.8 [10.3-16.2]	14.4 [8.32-25.1]	8.4 [6.6-10.8]	11.9 [8.90-16.1]	1	0.085	1	0.126	1	0.571	1	0.571

SJL was calculated based on the absolute difference between the average sleep time on working and rest days and was dichotomically categorized as > 60 min (with SJL) or <60 min (without SJL).

Abbreviations: TBARS, thiobarbituric acid reactive substances; carbonyls, plasma protein oxidation; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, oxygen peroxide; FRAP, *ferric* reducing antioxidant power (total antioxidant capacity); CAT: catalase; SOD, superoxide dismutase; GPx, glutathione peroxidase.

\*p<0.05 indicates statistically significant values.

When the variables of all volunteers were evaluated without stratification by work shift, through linear regression analysis, negative associations were found between SJL and CAT ( $\beta = -0.37$ ,  $p = 0.028$ ) and SJL and SOD ( $\beta = -7.88$ ,  $p = 0.007$ ). The same analysis, with the stratification of the volunteers per shift, revealed the existence of only one negative association, which occurred between SJL and TBARS ( $\beta = -0.03$ ,  $p = 0.013$ ) in day workers. For the other variables, other associations were not found either for the whole population or for the population stratified per work shift (Table 3).

**Table 3.**

Linear regression of SJL in relation to parameters of oxidative damage and antioxidant defense, adjusted for age and working hours.

	All			Night			Day		
	$\beta$	p-value	R <sup>2</sup>	B	p-value	R <sup>2</sup>	$\beta$	p-value	R <sup>2</sup>
<b>TBARS</b>	-0.01	0.793	0.10	0.01	0.919	0.01	-0.03	0.013*	0.16
<b>Carbonyls</b>	0.01	0.808	0.04	-0.01	0.983	0.07	-0.05	0.380	0.03
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	0.96	0.133	0.11	0.28	0.775	0.07	2.56	0.185	0.07
<b>Nitrite</b>	-0.02	0.518	0.22	-0.01	0.958	0.08	0.02	0.898	0.20
<b>FRAP</b>	-0.01	0.071	0.20	-0.01	0.863	0.08	0.02	0.578	0.20
<b>CAT</b>	-0.37	0.028*	0.13	-0.18	0.331	0.06	0.84	0.269	0.04
<b>SOD</b>	-7.88	0.007*	0.23	-0.77	0.638	0.06	-6.51	0.656	0.07
<b>GPx</b>	-0.01	0.975	0.01	-0.36	0.136	0.01	-1.02	0.337	0.03

Abbreviations: SJL, Social Jetlag; TBARS, thiobarbituric acid reactive substances; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, oxygen peroxide; FRAP, ferric reducing antioxidant power (total antioxidant capacity); CAT: catalase; SOD, superoxide dismutase; GPx, glutathione peroxidase.

\* $p < 0.05$  indicates statistically significant adjustments.

## Discussion

This study aimed to evaluate the profile of oxidative stress according to the work shift and the circadian misalignment associated with social jetlag. The night workers had lower levels of antioxidant defense and higher levels of ROS and oxidative stress damage when compared to day workers, which confirms the initial hypothesis of this study. In addition, although there were no differences in relation to those variables between individuals with and without SJL, this chronobiological variable was associated with the levels of antioxidant defense enzymes. According to our literature review, this is the first study that showed that the oxidative damage variables suffer a chronic effect of working hours and that the antioxidant defense system itself is influenced by circadian misalignment.

Some studies have shown reduction in total antioxidant capacity [17, 49] and increase in levels of oxidative stressors [17] after continuous hours of shift work. Indeed, the present study showed that night workers presented higher values of TBARS and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and lower values of nitrite, FRAP, CAT and SOD.

Thus, shift work may be leading to increased oxidative stress damage (TBARS) in these workers, through an increase in ROS production (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and a reduction in enzymatic (CAT e SOD) and non-enzymatic (FRAP) antioxidant defenses (Figure 3).

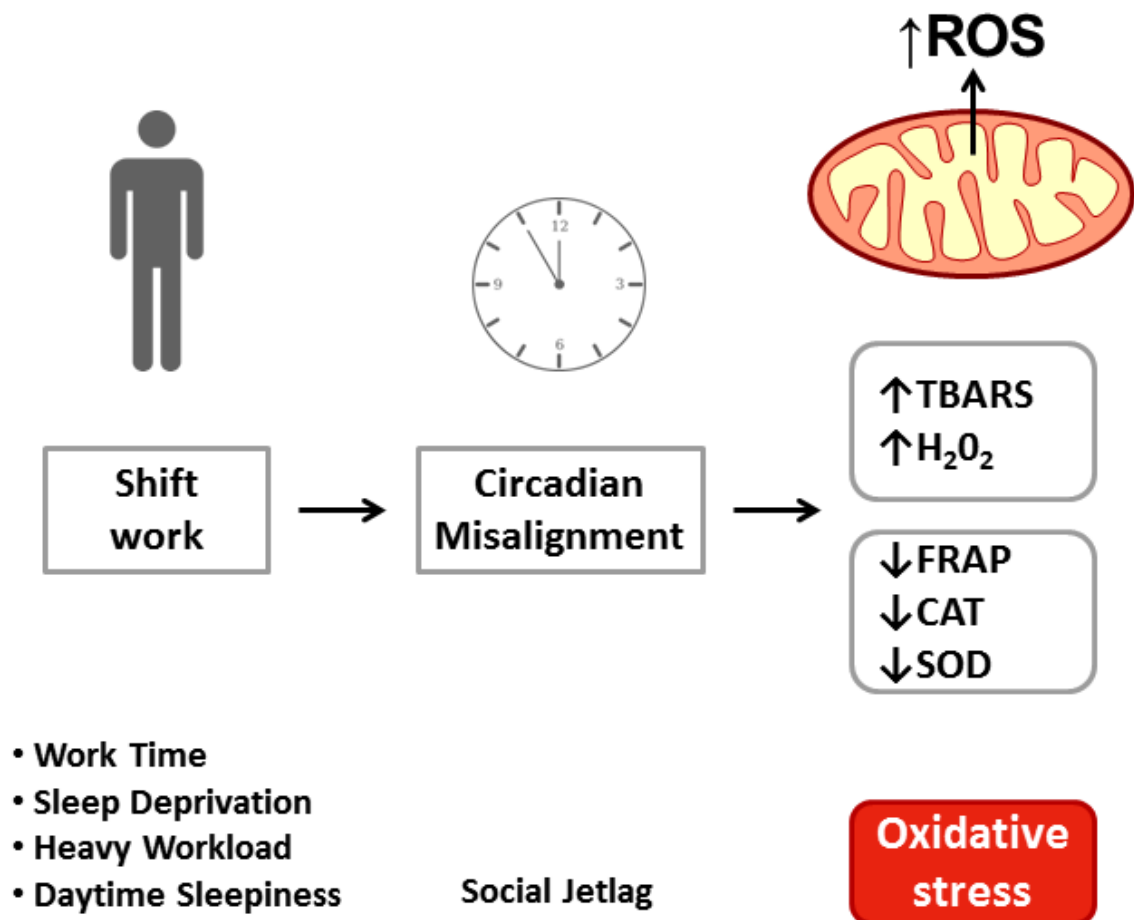


Fig. 3. Influence of shift work on circadian cycles and oxidative profile.

The formation of oxidants seems to be under the influence of circadian factors that regulate the energetic metabolism [50]. Thus, a circadian misalignment could actually lead to exacerbation of ROS production as a result of changes in mitochondrial functioning [51, 52]. In fact, the increase in ROS levels during prolonged wakefulness suggests the existence of interrelation between redox metabolism and circadian rhythm [53, 54].

Considering that oxidative stress plays a harmful effect on vital cell structures [55], this would be one of the possible mechanisms for the higher incidence of disease in this population. Oxidative damage to DNA, for example, is a factor that has been related to several diseases [56] and in the face of oxidative stress, the repair of such damage is essential to prevent the onset of these diseases. Since shift work promotes increased prooxidants, but also decreased antioxidant defense, as observed in this study, the cell is at the mercy of oxidative stress damage.

The decreased antioxidant defense in shift workers appears to occur via suppression of melatonin production [57]. Indeed, some studies have shown that a key element in the relationship between work shift and oxidative stress is melatonin [57-59]. Endocrine changes caused by circadian rupture in shift workers result in suppression of melatonin production through light exposure at night, leading them to maintain



chronically reduced levels of this hormone [60]. Melatonin production adjusts to the light/dark cycle, allowing it to act as an endogenous synchronizer that stabilizes and enhances circadian rhythms. Melatonin, in addition, exhibits antioxidant properties. Indeed, this hormone is a powerful eliminator of ROS, such as the hydroxyl radical, being more effective than glutathione and trolox [61]. It is speculated that the activities of some antioxidant defense enzymes are stimulated by melatonin, and that the increase of oxidative stress (due to constant exposure to light) may be related to both the formation of free radicals and the decrease in the secretion of this hormone [62-64]. It is possible that it is the low level of circulating melatonin during night work, not adequately compensated by the sleep period during the day [57], the explanation for the association of oxidative stress with the circadian misalignment caused by the night work schedule observed in the present study.

Both the expression and activity of antioxidant enzymes and the overall oxidative balance are synchronized with the biological rhythms [65, 66]. The SJL reflects the misalignment between the endogenous circadian rhythm and the real time of sleep [31] and has been associated with several metabolic risk factors, such as altered glycemia, lipid profile and adiposity [10, 12]. The present study found negative associations between the SJL and CAT and SOD, i.e., the higher the SJL the lower the activity of these enzymes in all (night and day) workers. SOD is an enzyme that catalyzes the formation of  $H_2O_2$  from the superoxide radical.  $H_2O_2$  is responsible for the formation of the hydroxyl radical, but can be removed by a reaction catalyzed by GPx or CAT [18]. GPx has a higher affinity for  $H_2O_2$  than CAT, which means that, at low concentrations of  $H_2O_2$ , GPx plays a much more active role in its removal [67]. In this sense, it is possible that the increased GPx values in the night group may represent an unsuccessful attempt to adapt the organism to cope with increased oxidative stress. It is noteworthy that a loss in antioxidant protection, as verified in the present study, can generate lesions in the cells that would then be repaired with metabolic and molecular adaptive changes that, if not properly controlled, could result in apoptosis and even cell death [52]. Nevertheless, the findings of the present study confirm that the misalignment caused by the work shift can directly influence the correct functioning of the antioxidant defense mechanisms [68, 69].

Ulas et al. [27] found that the increase in oxidative stress parameters observed at the end of the night shift in health professionals was not influenced by the position or function at work, but by prolonged work activity and inadequate rest time. In the present study, the analyzes were adjusted for working hours and, even so, the differences of these parameters between the shifts remained. Thus, it seems that night work and circadian misalignment promote oxidative stress. It is important to mention that the studies found in the literature evaluated workers at different moments of the work shift (before and after), capturing only the acute effects of the same, instead of their long-term consequences. In the present study, shift workers were compared in a real-life situation, which expresses the chronic effects of shift and desynchronization of biological rhythms in the parameters of oxidative stress damage and antioxidant defense.

Another finding of this study was that night workers had more evening habits, a higher social jetlag value and lower average sleep time on workdays, and, consequently, greater daytime sleepiness, compared to daytime workers. In an intervention study, Vetter et al. [5] adjusted the daytime preference of the volunteers to their work shift and found a mean reduction in SJL of 1 h and 20 min ( $p = 0.002$ ), and improvement in duration and quality of sleep. For these authors, SJL is lower in individuals whose chronotype is in line with their working hours. Juda et al. [70] showed that SJL depends

on the work shift ( $p < 0.001$ ). And, as observed in the current study, these authors found higher SJL in the night shift ( $p < 0.05$ ). The results of the present study and other studies previously found in the literature [5, 14, 70, 71] clearly indicate the importance of aligning the individual's chronotype to his or her work shift to minimize the differences between biological and social clocks, in order to reduce SJL and, possibly, the consequences of circadian misalignment.

This study presents some limitations, such as the variability in the work time among volunteers of both work shifts, especially in night workers, characterized by having more than one job and having few hours of rest; therefore, it is necessary to consider these factors when comparing the night workers with the day workers. But statistical adjustments were made to remove the effect of this confounding factor. It should also be noted that the analyzes of TBARS and FRAP, used here, although not specific, are widely used [17, 49, 72-74] and may indicate important characteristics of the oxidative status. In addition, although the cross-sectional nature of this study does not allow the establishment of causal relationships, the large number of parameters analyzed in this study allowed a better understanding of the oxidative profile in shift workers, and this should serve as a basis for future research. Of course, new studies and new tools will be needed to clarify how the circadian rhythm can modulate the oxidative profile, leading to a new understanding of its outcomes in the health of these workers.

In conclusion, the findings of this study indicate that the night workers have lower levels of antioxidant defense and higher levels of ROS and lipoperoxidation, determining a condition of oxidative stress, probably associated to their social jetlag. Preventive changes in working conditions and lifestyle are necessary to improve the health and quality of life of these workers. The effectiveness of these changes could be monitored through the evaluation of oxidative stress status.

#### *Acknowledgments*

To the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES) for the doctoral scholarship granted to K. R. C. Teixeira. To the *Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento* (CNPq) for the productivity grant awarded to Nilson Penha-Silva. To the *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais* (FAPEMIG) for the funding granted for the development of this work. To the volunteers who participated in the study. To the *Universidade Federal de Uberlândia* (UFU), especially to the *Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde* (PPGCS), which made possible the accomplishment of this research.

#### *Funding*

*Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais* (FAPEMIG).

#### *Conflict of Interest*

None of the authors presents conflict of interest to declare.

#### **References**

- [1] R.G. Stevens, J. Hansen, G. Costa, E. Haus, T. Kauppinen, K.J. Aronson, G. Castano-Vinyals, S. Davis, M.H. Frings-Dresen, L. Fritschi, M. Kogevinas, K. Kogi, J.A. Lie, A. Lowden, B. Peplonska, B. Pesch, E. Pukkala, E. Schernhammer, R.C. Travis, R. Vermeulen, T. Zheng, V. Coglianò, K. Straif, Considerations of circadian

- impact for defining 'shift work' in cancer studies: IARC Working Group Report, *Occupational and environmental medicine* 68(2) (2011) 154-62.
- [2] I.B.d.G.e.E. IBGE, Pesquisa nacional de saúde : 2013 : indicadores de saúde e mercado de trabalho : Brasil e grandes regiões, in: I.B.d.G.e.E. IBGE (Ed.) Rio de Janeiro, 2016, p. 66.
- [3] J. Waterhouse, P. Buckley, B. Edwards, T. Reilly, Measurement of, and some reasons for, differences in eating habits between night and day workers, *Chronobiology international* 20(6) (2003) 1075-92.
- [4] M. Garaulet, J.M. Ordovas, J.A. Madrid, The chronobiology, etiology and pathophysiology of obesity, *Int J Obes (Lond)* 34(12) (2010) 1667-83.
- [5] C. Vetter, D. Fischer, J.L. Madera, T. Roenneberg, Aligning work and circadian time in shift workers improves sleep and reduces circadian disruption, *Current biology : CB* 25(7) (2015) 907-11.
- [6] M. Dochi, Y. Suwazono, K. Sakata, Y. Okubo, M. Oishi, K. Tanaka, E. Kobayashi, K. Nogawa, Shift work is a risk factor for increased total cholesterol level: a 14-year prospective cohort study in 6886 male workers, *Occupational and environmental medicine* 66(9) (2009) 592-7.
- [7] H.G. Padilha, C.A. Crispim, I.Z. Zimberg, S. Folkard, S. Tufik, M.T. de Mello, Metabolic responses on the early shift, *Chronobiology international* 27(5) (2010) 1080-92.
- [8] A. Pietroiusti, A. Neri, G. Somma, L. Coppeta, I. Iavicoli, A. Bergamaschi, A. Magrini, Incidence of metabolic syndrome among night-shift healthcare workers, *Occupational and environmental medicine* 67(1) (2010) 54-7.
- [9] Y. Esquirol, V. Bongard, L. Mabile, B. Jonnier, J.M. Soulat, B. Perret, Shift work and metabolic syndrome: respective impacts of job strain, physical activity, and dietary rhythms, *Chronobiology international* 26(3) (2009) 544-59.
- [10] P.M. Wong, B.P. Hasler, T.W. Kamarck, M.F. Muldoon, S.B. Manuck, Social Jetlag, Chronotype, and Cardiometabolic Risk, *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 100(12) (2015) 4612-20.
- [11] M. Wittmann, J. Dinich, M. Meroz, T. Roenneberg, Social jetlag: misalignment of biological and social time, *Chronobiology international* 23(1-2) (2006) 497-509.
- [12] A.D.M. Koopman, S.P. Rauh, E. van 't Riet, L. Groeneveld, A.A. van der Heijden, P.J. Elders, J.M. Dekker, G. Nijpels, J.W. Beulens, F. Rutters, The Association between Social Jetlag, the Metabolic Syndrome, and Type 2 Diabetes Mellitus in the General Population: The New Hoorn Study, *J Biol Rhythms* 32(4) (2017) 359-368.
- [13] M.J. Parsons, T.E. Moffitt, A.M. Gregory, S. Goldman-Mellor, P.M. Nolan, R. Poulton, A. Caspi, Social jetlag, obesity and metabolic disorder: investigation in a cohort study, *International journal of obesity* 39(5) (2015) 842-8.

- [14] M.S. Alves, R.Z. Andrade, G.C. Silva, M.C. Mota, S.G. Resende, K.R. Teixeira, B.F. Goncalves, C.A. Crispim, Social Jetlag Among Night Workers is Negatively Associated with the Frequency of Moderate or Vigorous Physical Activity and with Energy Expenditure Related to Physical Activity, *Journal of biological rhythms* 32(1) (2017) 83-93.
- [15] R.V. Kondratov, V.Y. Gorbacheva, M.P. Antoch, The role of mammalian circadian proteins in normal physiology and genotoxic stress responses, *Curr Top Dev Biol* 78 (2007) 173-216.
- [16] Y. Gan, C. Yang, X. Tong, H. Sun, Y. Cong, X. Yin, L. Li, S. Cao, X. Dong, Y. Gong, O. Shi, J. Deng, H. Bi, Z. Lu, Shift work and diabetes mellitus: a meta-analysis of observational studies, *Occupational and environmental medicine* 72(1) (2015) 72-8.
- [17] H. Buyukhatipoglu, I. Kirhan, M. Vural, A. Taskin, Y. Sezen, O.F. Dag, M.N. Turan, N. Aksoy, Oxidative stress increased in healthcare workers working 24-hour on-call shifts, *The American journal of the medical sciences* 340(6) (2010) 462-7.
- [18] B. Faraut, V. Bayon, D. Leger, Neuroendocrine, immune and oxidative stress in shift workers, *Sleep medicine reviews* 17(6) (2013) 433-44.
- [19] A. Casado, A. Castellanos, M.E. Lopez-Fernandez, R. Ruiz, C.G. Aroca, F. Noriega, Relationship between oxidative and occupational stress and aging in nurses of an intensive care unit, *Age* 30(4) (2008) 229-36.
- [20] A.L.B.S. Barreiros, J.M. David, J.P. David, Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo, *Nova Química* 29(1) (2006) 113-123.
- [21] J.M. Mates, Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology, *Toxicology* 153(1-3) (2000) 83-104.
- [22] B. Halliwell, M. Whiteman, Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?, *Br J Pharmacol* 142(2) (2004) 231-55.
- [23] K.B.F. Barbosa, N.M.B. Costa, R.d.C.G. Alfenas, S.O.D. Paula, V.P.R. Minim, J. Bressan, Oxidative stress: concept, implications and modulating factors, *Revista de Nutrição* 23(4) (2010).
- [24] K. Green, M.D. Brand, M.P. Murphy, Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes, *Diabetes* 53 Suppl 1 (2004) S110-8.
- [25] A. Inoue, N. Kawakami, M. Ishizaki, M. Tabata, M. Tsuchiya, M. Akiyama, A. Kitazume, M. Kuroda, A. Shimazu, Three job stress models/concepts and oxidative DNA damage in a sample of workers in Japan, *J Psychosom Res* 66(4) (2009) 329-34.
- [26] K. Syslova, A. Bohmova, M. Mikoska, M. Kuzma, D. Pelclova, P. Kacer, Multimarker screening of oxidative stress in aging, *Oxid Med Cell Longev* 2014 (2014) 562860.

- [27] T. Ulas, H. Buyukhatipoglu, I. Kirhan, M.S. Dal, M.A. Eren, A. Hazar, M.E. Demir, T. Aydogan, F. Karababa, A. Uyanikoglu, I.C. Kurkcuoglu, The effect of day and night shifts on oxidative stress and anxiety symptoms of the nurses, *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 16(5) (2012) 594-9.
- [28] S. Santos Bernardes, F.P. de Souza-Neto, G. Pasqual Melo, F.A. Guarnier, P.C. Marinello, R. Cecchini, A.L. Cecchini, Correlation of TGF-beta1 and oxidative stress in the blood of patients with melanoma: a clue to understanding melanoma progression?, *Tumour Biol* 37(8) (2016) 10753-61.
- [29] Y. Guo, Y. Liu, X. Huang, Y. Rong, M. He, Y. Wang, J. Yuan, T. Wu, W. Chen, The effects of shift work on sleeping quality, hypertension and diabetes in retired workers, *PloS one* 8(8) (2013) e71107.
- [30] M.C. Brum, F.F. Filho, C.C. Schnorr, G.B. Bottega, T.C. Rodrigues, Shift work and its association with metabolic disorders, *Diabetology & metabolic syndrome* 7 (2015) 45.
- [31] T. Roenneberg, K.V. Allebrandt, M. Merrow, C. Vetter, Social jetlag and obesity, *Current biology* : CB 22(10) (2012) 939-43.
- [32] WHO, Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation, *World Health Organ Tech Rep Ser* 894 (2000) i-xii, 1-253.
- [33] WHO, Waist circumference and waist-hip ratio: report of a WHO expert consultation, in: W. World Health Organization (Ed.) Geneva, 2008.
- [34] M.C. Mota, C.M. Silva, L.C.T. Balieiro, W.M. Fahmy, C.A. Crispim, Social jetlag and metabolic control in non-communicable chronic diseases: a study addressing different obesity statuses, *Sci Rep* 7(1) (2017) 6358.
- [35] S. Reutrakul, M.M. Hood, S.J. Crowley, M.K. Morgan, M. Teodori, K.L. Knutson, E. Van Cauter, Chronotype is independently associated with glycemic control in type 2 diabetes, *Diabetes Care* 36(9) (2013) 2523-9.
- [36] M. Juda, C. Vetter, T. Roenneberg, The Munich ChronoType Questionnaire for Shift-Workers (MCTQShift), *Journal of biological rhythms* 28(2) (2013) 130-40.
- [37] M.W. Johns, A new method for measuring daytime sleepiness: the Epworth sleepiness scale, *Sleep* 14(6) (1991) 540-5.
- [38] A.N. Bertolazi, Tradução, adaptação cultural e validação de dois instrumentos de avaliação Do sono: Escala de Sonolência de Epworth e Índice de Qualidade de sono de Pittsburgh., Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Universidade Federal do Rio Grande do Sul., Porto Alegre, 2008, p. 93.
- [39] T.B. Kendzerska, P.M. Smith, R. Brignardello-Petersen, R.S. Leung, G.A. Tomlinson, Evaluation of the measurement properties of the Epworth sleepiness scale: a systematic review, *Sleep Med Rev* 18(4) (2014) 321-31.

- [40] S.F. Llesuy, J. Milei, H. Molina, A. Boveris, S. Milei, Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4'-epiadriamycin in mice, *Tumori* 71(3) (1985) 241-9.
- [41] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J Biol Chem* 193(1) (1951) 265-75.
- [42] J.A. Buege, S.D. Aust, Microsomal lipid peroxidation, *Methods Enzymol* 52 (1978) 302-10.
- [43] A.Z. Reznick, L. Packer, Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay, *Methods Enzymol* 233 (1994) 357-63.
- [44] I. Fridovich, Superoxide dismutases, *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 58 (1986) 61-97.
- [45] L. Flohe, W.A. Gunzler, Assays of glutathione peroxidase, *Methods Enzymol* 105 (1984) 114-21.
- [46] I.F. Benzie, J.J. Strain, The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay, *Anal Biochem* 239(1) (1996) 70-6.
- [47] E. Pick, Y. Keisari, A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture, *J Immunol Methods* 38(1-2) (1980) 161-70.
- [48] J.P. Granger, S. Kassab, J. Novak, J.F. Reckelhoff, B. Tucker, M.T. Miller, Role of nitric oxide in modulating renal function and arterial pressure during chronic aldosterone excess, *Am J Physiol* 276(1 Pt 2) (1999) R197-202.
- [49] A. Sharifian, S. Farahani, P. Pasalar, M. Gharavi, O. Aminian, Shift work as an oxidative stressor, *Journal of circadian rhythms* 3 (2005) 15.
- [50] C.B. Green, J.S. Takahashi, J. Bass, The meter of metabolism, *Cell* 134(5) (2008) 728-42.
- [51] J.L. Pena, L. Perez-Perera, M. Bouvier, R.A. Velluti, Sleep and wakefulness modulation of the neuronal firing in the auditory cortex of the guinea pig, *Brain research* 816(2) (1999) 463-70.
- [52] M.S. Trivedi, D. Holger, A.T. Bui, T.J.A. Craddock, J.L. Tartar, Short-term sleep deprivation leads to decreased systemic redox metabolites and altered epigenetic status, *PLoS One* 12(7) (2017) e0181978.
- [53] G. Villafuerte, A. Miguel-Puga, E.M. Rodriguez, S. Machado, E. Manjarrez, O. Arias-Carrion, Sleep deprivation and oxidative stress in animal models: a systematic review, *Oxidative medicine and cellular longevity* 2015 (2015) 234952.
- [54] L. Ramanathan, S. Gulyani, R. Nienhuis, J.M. Siegel, Sleep deprivation decreases superoxide dismutase activity in rat hippocampus and brainstem, *Neuroreport* 13(11) (2002) 1387-90.

- [55] I. Ishihara, M. Nakano, M. Ikushima, Y. Hara, T. Yoshimine, M. Haraga, J. Nakatani, R. Kawamoto, H. Kasai, Effect of work conditions and work environments on the formation of 8-OH-dG in nurses and non-nurse female workers, *Journal of UOEH* 30(3) (2008) 293-308.
- [56] M. Wilking, M. Ndiaye, H. Mukhtar, N. Ahmad, Circadian rhythm connections to oxidative stress: implications for human health, *Antioxidants & redox signaling* 19(2) (2013) 192-208.
- [57] P. Bhatti, D.K. Mirick, T.W. Randolph, J. Gong, D.T. Buchanan, J.J. Zhang, S. Davis, Oxidative DNA damage during night shift work, *Occup Environ Med* 74(9) (2017) 680-683.
- [58] F. Nduhirabandi, E.F. du Toit, A. Lochner, Melatonin and the metabolic syndrome: a tool for effective therapy in obesity-associated abnormalities?, *Acta physiologica* 205(2) (2012) 209-23.
- [59] C. Nagata, T. Tamura, K. Wada, K. Konishi, Y. Goto, Y. Nagao, K. Ishihara, S. Yamamoto, Sleep duration, nightshift work, and the timing of meals and urinary levels of 8-isoprostane and 6-sulfatoxymelatonin in Japanese women, *Chronobiol Int* 34(9) (2017) 1187-1196.
- [60] S. Folkard, Do permanent night workers show circadian adjustment? A review based on the endogenous melatonin rhythm, *Chronobiology international* 25(2) (2008) 215-24.
- [61] B. Claustrat, J. Brun, G. Chazot, The basic physiology and pathophysiology of melatonin, *Sleep Med Rev* 9(1) (2005) 11-24.
- [62] G. Baydas, E. Ercel, H. Canatan, E. Donder, A. Akyol, Effect of melatonin on oxidative status of rat brain, liver and kidney tissues under constant light exposure, *Cell biochemistry and function* 19(1) (2001) 37-41.
- [63] B. Poeggeler, S. Thuermann, A. Dose, M. Schoenke, S. Burkhardt, R. Hardeland, Melatonin's unique radical scavenging properties - roles of its functional substituents as revealed by a comparison with its structural analogs, *Journal of pineal research* 33(1) (2002) 20-30.
- [64] C. Rodriguez, J.C. Mayo, R.M. Sainz, I. Antolin, F. Herrera, V. Martin, R.J. Reiter, Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin, *Journal of pineal research* 36(1) (2004) 1-9.
- [65] R. Hardeland, A. Coto-Montes, B. Poeggeler, Circadian rhythms, oxidative stress, and antioxidative defense mechanisms, *Chronobiology international* 20(6) (2003) 921-62.
- [66] I.K. Sundar, M.T. Sellix, I. Rahman, Redox regulation of circadian molecular clock in chronic airway diseases, *Free radical biology & medicine* (2017).
- [67] A.M. Pisoschi, A. Pop, The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review, *European journal of medicinal chemistry* 97 (2015) 55-74.

- [68] N. Krishnan, A.J. Davis, J.M. Giebultowicz, Circadian regulation of response to oxidative stress in *Drosophila melanogaster*, *Biochem Biophys Res Commun* 374(2) (2008) 299-303.
- [69] M.L. Fanjul-Moles, J. Prieto-Sagredo, D.S. Lopez, R. Bartolo-Orozco, H. Cruz-Rosas, Crayfish *Procambarus clarkii* retina and nervous system exhibit antioxidant circadian rhythms coupled with metabolic and luminous daily cycles, *Photochem Photobiol* 85(1) (2009) 78-87.
- [70] M. Juda, C. Vetter, T. Roenneberg, Chronotype modulates sleep duration, sleep quality, and social jet lag in shift-workers, *Journal of biological rhythms* 28(2) (2013) 141-51.
- [71] R. Petru, M. Wittmann, D. Nowak, B. Birkholz, P. Angerer, Effects of working permanent night shifts and two shifts on cognitive and psychomotor performance, *International archives of occupational and environmental health* 78(2) (2005) 109-16.
- [72] R. Rodrigues, L. Alves de Medeiros, L. Moreira Cunha, M. da Silva Garrote-Filho, M. Bernardino Neto, P. Tannus Jorge, E. Santos Resende, N. Penha-Silva, Correlations of the glycemic variability with oxidative stress and erythrocytes membrane stability in patients with type 1 diabetes under intensive treatment, *Diabetes research and clinical practice* (2018).
- [73] A.M. Jacomini, D.D. Dias, J.O. Brito, R.F. da Silva, H.L. Monteiro, S. Llesuy, K. De Angelis, S.L. Amaral, A.S. Zago, Influence of Estimated Training Status on Anti and Pro-Oxidant Activity, Nitrite Concentration, and Blood Pressure in Middle-Aged and Older Women, *Frontiers in physiology* 8 (2017) 122.
- [74] A.M. Jacomini, H.C. de Souza, S. Dias Dda, O. Brito Jde, L.C. Pinheiro, A.B. da Silva, R.F. da Silva, A.A. Trape, K. De Angelis, J.E. Tanus-Santos, S.L. do Amaral, A.S. Zago, Training Status as a Marker of the Relationship between Nitric Oxide, Oxidative Stress, and Blood Pressure in Older Adult Women, *Oxidative medicine and cellular longevity* 2015 (2015) 8262383.



**CAPÍTULO 3 - ARTIGO 2: THE  
ERYTHROCYTE MEMBRANE STABILITY IS  
INFLUENCED BY SLEEP TIME AND SOCIAL  
JETLAG IN SHIFT WORKERS**

## **The erythrocyte membrane stability is influenced by sleep time and social jetlag in shift workers**

Kely Raspante Cerqueira Teixeira<sup>1</sup>, Luciana Alves de Medeiros<sup>2</sup>, Jordane Amaral Mendes<sup>1</sup>, Emília Rezende Vaz<sup>2</sup>, Thúlio Marquez Cunha<sup>1</sup>, Erick Prado de Oliveira<sup>1</sup>, Nilson Penha-Silva<sup>2</sup>, Cibele Aparecida Crispim<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil

<sup>2</sup> Instituto de Biotecnologia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil

**\*Corresponding author:** Kely Raspante Cerqueira Teixeira. Telephone: +55 34 3218 2084. **E-mail:** kelyraspante@gmail.com

**Address:** Avenida Pará, 1720, Sala 2U-20, Campus Umuarama, Uberlândia, MG, 38405-320, Brazil

### **Abstract**

The osmotic stability of the erythrocyte membrane (OSEM) has been associated with lipid profile, blood glucose and blood pressure. Changes in these parameters are very frequent in shift workers, possibly because of the lack of synchronization of biological rhythms, which results in the social jetlag. However, the existence of association between OSEM and circadian misalignment has not been investigated in this population. Therefore, this study investigated the influence of shift work, sleep time and social jetlag (SJL) on biochemical and hematological variables. A population consisting of 79 men working at night ( $n = 37$ ) or during the day ( $n = 42$ ), aged between 21 and 65 years and with a mean BMI of  $27.56 \pm 4.0 \text{ kg/m}^2$ , was investigated transversally in relation to sleep time, SJL, anthropometric (height, weight and waist circumference) and blood variables, with emphasis on the OSEM. SJL was calculated by the absolute difference between the midpoint of sleep on work and rest days. The Generalized Linear Test (GzLM) was used to investigate the existence of associations between SJL and average sleep time in relation to the analyzed variables. Night shift workers without SJL presented lower baseline lysis values of erythrocytes in isotonic medium in relation to night worker with SJL. In addition, workers who slept on average less than 6 hours had higher OSEM, and total and LDL-cholesterol total values in relation to those who slept more than 6 hours, regardless of the shift. It is possible that the association of sleep deprivation and SJL with erythrocyte membrane stability is mediated through changes in the lipid profile.

**Key words:** Erythrocyte, Sleep, Membrane Stability, Shift Work, Social Jet Lag.

### **Introduction**

Circadian rhythms are evident in virtually all biological processes, from the cellular level to the whole organism [1]. These rhythms are generated by endogenous biological clocks, being the suprachiasmatic nucleus the major pacemaker in mammals [2]. There also exist biological clocks generating circadian rhythms in peripheral tissues, as is the case of the liver, adipose tissue, heart and skeletal muscle. Also, stimuli

such as body temperature, light/dark cycles, fasting/feeding and hormone secretion are responsible for the circadian modulation of the body [3]. This regulation may suffer misalignment when, for example, the sleep/wake cycle, food intake and/or physical exertion occur at times drastically different from usual [1]. Thus, a real-world condition in which circadian misalignment undoubtedly occurs is the shift work environment [4]. In addition to the adaptation of biological rhythms to inversions of periods of activity and rest, these workers are also subject to a drastic change of lifestyle, which negatively influences general health, sleep and social and family interactions [5].

Due to desynchronization of biological rhythms [6] and sleep deprivation [7], shift workers are at increased risk of developing sleep disturbances [8], and nutritional, metabolic [9], gastrointestinal and cardiac disorders [10-12], and even cancer [13], among other conditions. One way to measure circadian misalignment is by calculating the social jetlag (SJL) - a parameter that measures the discrepancy in sleep time on working days in relation to free days [14, 15]. SJL has been associated with biomarkers of inflammation and diseases such as obesity [16] and diabetes mellitus [17].

Alterations in glucose [18, 19] and lipids [20] blood levels, as well in blood pressure [21] commonly present in shift workers have been associated with osmotic stability, i.e., the ability of the erythrocyte to resist lysis under hyposmotic conditions. However, little is known about the influence of shift work and circadian misalignment on erythrocytes. The levels of erythropoietin (EPO), a hormone that stimulates erythrocyte production, has a well-marked circadian rhythm [22]. The erythrocyte is the most abundant cell in the blood, being responsible for the transport of oxygen and carbon dioxide [23]. Despite being an apparently simple and anucleate cell, the erythrocyte participates in functions that are essential to the organism, and therefore is involved in the pathophysiology of numerous diseases [20]. The osmotic fragility test is a simple way to evaluate the erythrocyte membrane behavior [24]; however, the relationship between erythrocyte membrane stability and circadian misalignment is still unclear.

Given the above understanding, the hypothesis raised in this study is that night workers have a difference in erythrocyte membrane stability in relation to day workers. Therefore, the objective of this work was to evaluate the influence of shift work, sleep hours and SJL on biochemical, hematologic and erythrocyte membrane stability parameters.

## **Material and Methods**

This study cross-sectional study was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Uberlandia. The study population comprised 79 workers men (37 night workers and 42 day workers) of two hospitals of Uberlandia, a city located in the state of Minas Gerais, Brazil. The volunteers worked in the same routine for at least six months in administrative and health-related functions (nurse, physiotherapist, nursing technician, laboratory technician and stretcher bearers) and were classified according to their work shift in: 1) day workers, who worked only during the day, morning and/or afternoon, without developing any work activity at night, and with additional shifts always also daytime; and 2) night workers, who worked at least six hours after midnight, and with and without daytime additional work activities.

From the total of one hundred and thirty-five workers who agreed to participate in this study, a total of 79 male adult workers were selected. The exclusion criteria comprised diseases previously diagnosed and under treatment, except obesity; current or

past active smoking and work schedules different from the classifications stipulated in this study. Twenty two workers refused to participate. All participants included in this study had not recently used any drug with antioxidant properties, such as vitamin C or E or acetylcysteine. Each participant signed a written informed consent.

After completing the criteria for inclusion and exclusion and selection of participants, data on socio-demographic characteristics, physical exercise and alcohol consumption were collected. All selected volunteers were subjected to anthropometric, chronobiological and sleep evaluations, and to laboratory dosages. All evaluations were performed in a single moment of the morning following a night's sleep before the work shift.

#### *Assessment of body composition*

Anthropometric variables such as weight and height were measured, respectively, using an electronic scale (Welmy™) and a wall-mounted portable stadiometer e (Welmy™), and used to calculate the body mass index (BMI, kg/m<sup>2</sup>) of the volunteers [25]. The waist circumference (WC) was measured in agreement with the standard proposed by [26]. WC values of the male population studied here were considered increased when they were  $\geq 94$  cm [25].

#### *Sleep pattern, chronotype and social jetlag*

These evaluations were performed by a specialized team trained in sleep studies based on the information compiled in the participants' responses to a previously reported questionnaire [27].

The bedtime on working days and rest days was obtained considering the time it took for the volunteer to fall asleep. Sleep duration, for day shift, was computed using the weighted average of self-reported sleep duration, which considers both work days and days off, using the formula: [(Reported current weekday sleep duration x 5) + (Reported current weekend sleep duration x 2)]/7. For the night shift, using the formula: [(Reported current weekday sleep duration x 3.5) + (Reported current weekend sleep duration x 3.5)]/7 [28].

For day workers, chronotype was derived from the time of mid-sleep time on free days at the weekend (MSF) with a further correction for calculated sleep debt (MSF<sup>sc</sup>), calculated as the difference between average sleep duration at the rest days and work days (Roenneberg et al., 2007). For night workers, chronotype was calculated with the specific formula for shift workers (MSF<sup>E</sup><sup>sc</sup>) proposed by Juda et al. [29]. The chronotype was classified in: early types: MSF<sup>sc</sup>  $\leq$  3:59 h; intermediate types: MSF<sup>sc</sup>  $>$  4:00 and  $<$  4:59 h; and late types: MSF<sup>sc</sup>  $\geq$  5:00 h [16]. Social jetlag was calculated based on the absolute difference between mid-sleep time at weekends and on weekdays [14].

#### *Epworth Sleepiness Scale (ESS)*

Daytime sleepiness was assessed from the Epworth Sleepiness Scale (ESS)[30], previously translated into the language of the study participants [31], with a total score  $\geq 8$  indicating excessive drowsiness [30]. ESS is a widely used tool to characterize daytime sleepiness [32].

#### *Biochemical dosages*

Blood collection was performed in a single moment of the morning following a night's sleep before the work shift. Blood samples were collected by venipuncture in tubes containing EDTA and separating gel (Vacutainer™, BD, Juiz de Fora, MG,

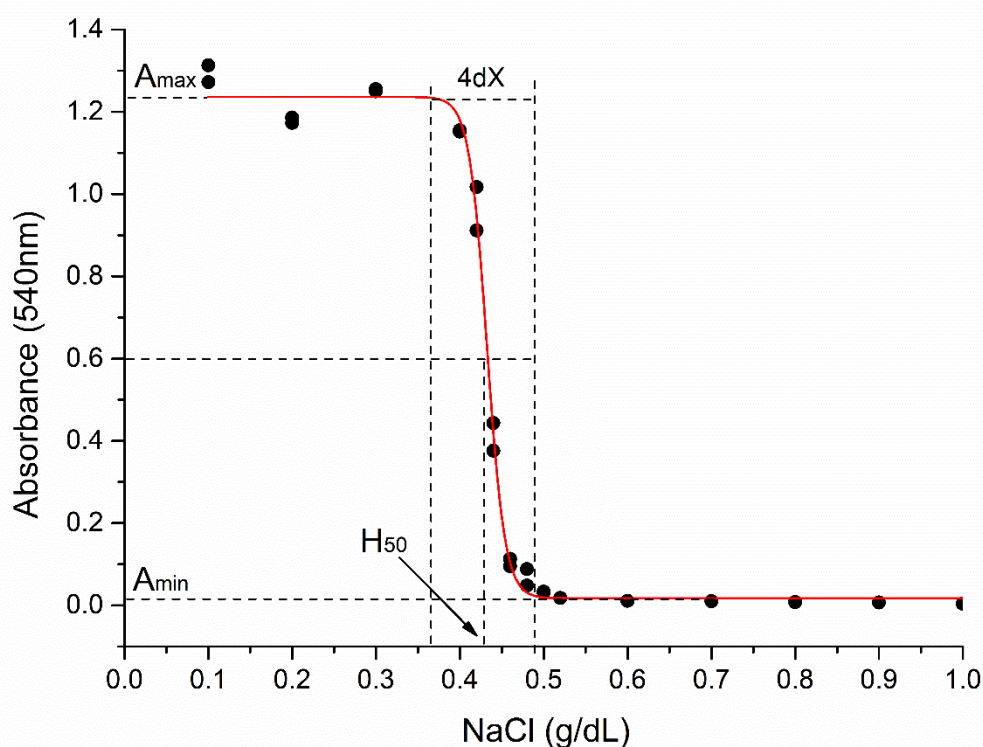
Brazil) and immediately centrifuged at 1,300 x g for 15 min in a refrigerated centrifuge (Hitachi Koki, model CFR15XRII™, Hitachinaka, Japan) at 4 °C. Supernatants from these centrifuges were frozen at -80 °C (Panasonic™, model CUK-UB2I-PW, Nijverheidsweg, Netherlands). The volunteers were instructed to fast for 12 hours and abstain from physical exercise and alcohol consumption 24 hours prior to collection. The collected blood samples were used for for determination of hematologic, biochemical and OSEM variables. The osmotic fragility test used to evaluate the OSEM variables.

*Determination of the osmotic stability of the erythrocyte membrane (OSEM)*

Microtubes containing 1 mL of 0.1-0.9 g/dL NaCl solution were preincubated at 37 °C in a thermostated bath (Marconi™, Model MA 184, Piracicaba, SP, Brazil) for 10 minutes. After adding 10 µL of whole blood, the tubes were carefully homogenized, reincubated at 37 °C for 30 minutes and then centrifuged at 1600 x g for 10 min. The amount of hemoglobin released on lysis was expressed by reading the absorbance of the supernatant at 540 nm in a UV-VIS spectrophotometer (Shimadzu™, UV1650TC model, Japan). Absorbance at 540 nm ( $A_{540}$ ) as a function of NaCl concentration was adjusted by sigmoidal regression based on the Boltzmann equation:

$$A_{540} = \frac{A_{\max} - A_{\min}}{1 + e^{(X-H_{50})/dX}} + A_{\min} \quad (1),$$

where  $A_{\min}$  and  $A_{\max}$  are the mean absorbance values at the minimum and maximum plateaus of the simoid and represent the initial and the maximum hemolysis rate, respectively;  $H_{50}$  is the NaCl concentration capable of promoting 50% hemolysis and  $dX$  is the variation in the NaCl concentration necessary to promote 100% hemolysis [24].



**Figure 1.** Boltzmann's sigmoidal fitting of a typical curve erythrocyte lysis in relation to NaCl concentration in a shift worker volunteer.  $H_{50}$  is the NaCl concentration that promotes 50% hemolysis;  $dX$  is the salt concentration variation necessary to promote 100% hemolysis;  $A_{min}$  is the minimum value of absorbance presented under conditions of blood-like osmolarity; and  $A_{max}$  is the maximum value of absorbance associated with 100% hemolysis.

#### Statistical Analysis

Data analysis was performed using SPSS version 20.0 (IBM Corp., Armonk, NY). The existence of normality in the data distribution was verified using the Shapiro-Wilk test. Parametric data were presented as means and standard deviations and non-parametric data were presented as median and interquartile range. The chi-square test was used to compare variables presented in frequency. The existence of differences between the groups in relation to the studied variables (socio-demographic, anthropometric, sleep patterns, sleepiness score, chronotype, social jetlag, life habits and stress parameters) was analyzed using Student's t-test for independent samples or the Mann-Whitney test.

The Generalized Linear Model (GzLM) was used to analyze the existence of differences in biochemical parameters and membrane stability between shifts, hours of sleep, SJL and the interactions (shift x hours of sleep, shift x SJL), adjusted for age, BMI, working hours and exercise (min/wk). The sequential Šidák procedure was used for the comparisons of the estimated marginal means. Statistical tests with  $p < 0.05$  were accepted as significant.

## Results

The volunteers had aged between 21 and 65 years. Night and day workers did not differ in age ( $p = 0.688$ ) and working time in the current shift ( $p=0.348$ ). The workers of the two shifts also did not present difference of weight ( $p=0.427$ ), BMI ( $p=0.115$ ) and WC ( $p=0.334$ ). Regarding the sleep and chronobiological variables, sleep time on days off ( $p=0.170$ ) and MSF<sup>E</sup>sc ( $p=0.708$ ) were not different between the work shifts. On the other hand, night workers presented higher workload ( $p<0.001$ ), greater daytime sleepiness ( $p=0.002$ ) and shorter sleep time in workdays ( $p<0.001$ ), but a higher value of social jetlag ( $p<0.001$ ) in relation to the day workers (Table 1).

**Table 1.** Sociodemographic characteristics, anthropometric indices, life habits, sleep patterns, score sleepiness, chronotype and social jetlag of employees according to shift worked.

	Night (n=37)	Day (N=42)	p-value
<b>Mean Sleep Duration (h)</b>			
Work days	3:50 [2:22-4:27]	6:35 [5:28-7:35]	<0.001*
Rest days	7:56 ± 1:58	8:33 ± 1:52	0.170
<b>Chronotype (MSF<sup>E</sup>sc) (h)</b>	3:44 ± 1:00	3:38 ± 1:25	0.708
Morning	21 (56.8)	29 (69.0)	0.260
Indifferent	12 (32.4)	7 (16.7)	
Evening	4 (10.8)	6 (14.3)	
<b>Social Jet Lag (h)</b>	5:07 [2:35-7:53]	1:15 [0:45-2:02]	<0.001*
Yes	32 (86.5)	25 (59.5)	0.011*
No	5 (13.5)	17 (40.5)	
<b>Sleepiness Score (Epworth)</b>	10.76 ± 4.88	7.48 ± 4.00	0.002*
Daytime Sleepiness	16 (43.2)	9 (21.4)	0.037*
No Drowsiness	21 (56.8)	33 (78.6)	
<b>Age (years)</b>	42.43 ± 8.50	43.40 ± 12.72	0.688
<b>Working time (years)</b>	5.00 [2.00-12.5]	4.00 [2.00-10.75]	0.348
<b>Workload (h/week)</b>	57.0 [42.0-69.0]	36.0 [36.0-40.0]	<0.001*
<b>Anthropometry</b>			
Weight (kg)	83.49 ± 11.73	81.13 ± 13.97	0.427
Height (m)	1.72 ± 0.06	1.73 ± 0.07	0.585
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	27.24 [26.05-29.64]	26.51 [24.00-28.49]	0.115
Waist Circumference (cm)	97.62 ± 11.04	95.17 ± 11.04	0.334
<b>Physical Exercise (N, %)</b>			
Yes	17 (45.9)	21 (50.0)	0.718
No	20 (54.1)	21 (50.0)	
Duration (min/week)	240.0 [157.50-330.00]	240.0 [135.00-435.00]	0.601
<b>Alcohol Consumption (N, %)</b>			
Yes	20 (54.1)	26 (61.9)	0.502
No	17 (45.9)	16 (38.1)	
<b>Beer (cans/week)</b>	4.00 [1.00-10.00]	5.0 [2.25-6.75]	0.330

Values are presented as mean ± SD for normally distributed data or median (interquartile range) for non-normally distributed data.

\* $p<0.05$  indicates statistically significant difference. SJL was calculated based on the absolute difference between the average sleep time on working and rest days and was dichotomically categorized as >60 min (with SJL) or <60 min (without SJL). Comparisons between groups were done using the Student's t-test or the Mann-Whitney test, for independent samples, for data with and without normal distribution, respectively, or by the Chi-square test, for variables expressed as frequency.

There was no statistically significant difference between the work shifts in relation to the OSEM, hematologic and biochemical variables studied here (Table 2).

**Table 2.** Comparison of OSEM, hematologic and biochemical parameters between work shifts.

	Day Workers (n=37)	Night Workers (n=42)	p-value
A <sub>max</sub> (abs)	1.24 [1.18-1.28]	1.25 [1.21-1.30]	0.207
A <sub>min</sub> (abs)	0.011 ± 0,006	0.009 ± 0.007	0.400
1/H <sub>50</sub> (g/dL NaCl) <sup>-1</sup>	2.29 [2.26-2.37]	2.31 [2.26-2.38]	0.467
dX (g/dL NaCl)	0.011 [0.009-0.013]	0.011 [0.010-0.014]	0.559
Red Blood Cells (million/mm <sup>3</sup> )	5.20 [4.98-5.31]	5.19 [4.85-5.41]	0.949
Hemoglobin (g/dL)	15.33 ± 1.05	15.36 ± 0.99	0.892
Hematocrit (%)	47.65 ± 3.12	47.52 ± 2.84	0.840
Mean Corpuscular Volume (fL)	91.68 ± 4.86	91.81 ± 4.70	0.911
Leukocyte Count (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	5.91 ± 0.15	6.05 ± 1.51	0.686
Platelet Count (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	213.41 ± 45.85	205.93 ± 41.70	0.450
Serum Iron (µg/dL)	114.20 [90.10-140.10]	114.5 [94.32-139.30]	0.898
Reticulocyte Count (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	62.37 [48.97-88.73]	56.05 [44.19-73.50]	0.205
Reticulocyte Index (%)	1.10 [1.00-1.70]	1.10 [0.90-1.50]	0.366
Total Cholesterol (mg/dL)	172.0 [155.5-198.0]	167.0 [148.25-190.25]	0.309
HDL-Cholesterol (mg/dL)	38.50 ± 6.89	39.54 ± 10.33	0.603
LDL-Cholesterol (mg/dL)	107.1 [88.75-124.80]	105.1 [87.3-125.75]	0.902
Glucose (mg/dL)	82.0 [76.0-87.5]	82.0 [76.0-87.5]	0.476
HbA1c (%)	5.3 [5.05-5.55]	5.20 [5.1-5.5]	0.437
Triglycerides (mg/dL)	127.0 [97.5-229.0]	111.0 [82.25-163.25]	0.115
Uric acid (mg/dL)	6.18 ± 1.44	6.01 ± 1.31	0.593

Abbreviations: OSEM, osmotic stability of erythrocytes membrane; A<sub>max</sub>, absorbance obtained by lysis of the total erythrocyte population used in the test; A<sub>min</sub>, absorbance obtained by hemolysis under isotonic conditions with blood; 1/H<sub>50</sub>, inversion of saline concentration in which there is 50% hemolysis; dX, saline concentration range involved in the lysis process of the total erythrocyte population used in the test; HbA1c, glycated hemoglobin A1c.

\*p<0.05 indicates statistically significant difference. Values are presented as mean ± SD for normally distributed data or median (interquartile range) for non-normally distributed data. Comparisons between groups were done using the Student's t-test or the Mann-Whitney test, for independent samples, for data with and without normal distribution, respectively.

In order to investigate the occurrence of some impropriety with the results, correlation analyzes were performed between the A<sub>max</sub> variable and erythrogram variables that are conceptually associated with that OSEM variable. Strong positive associations were observed between A<sub>max</sub> values and erythrocyte counts, hemoglobin levels and hematocrit values for the entire studied population (r=0.68, p<0.001; r=0.80, p<0.001; r=0.71, p<0.001) and also for night (r=0.71, p<0.001; r=0.82, p<0.001; r=0.67, p<0.011) and day (r=0.64, p<0.001; r=0.77, p<0.001; r=0.75, p<0.001) workers, respectively. This confirms the reliability of the data obtained in this study.

Table 3 presents the comparison of the studied variables in relation shift and average sleep time (<6 hours or ≥ 6 hours), and the interaction shift\*hours of sleep, after adjustment for age, BMI, and exercise. There was influence of sleep time on the variables 1/H<sub>50</sub> (p=0.031), dX (p=0.020), MCV (p=0.004), RBC count (p=0.005), and total (p=0.027) and LDL-cholesterol (p=0.009). Workers who slept less than 6 hours on



average had higher values of 1/H50 (<6h: 2.44 [2.37-2.50]; ≥6h: 2.33 [2.28-2.38]) and dX (<6h: 0.015 [0.012-0.18]; ≥6h: 0.011 [0.009-0.013]). In addition, subjects who slept less than 6 hours had lower MCV values (<6h: 89.3 [87.1-91.5]; ≥6h: 93.6 [91.7-95.5]) and higher RBC counts (<6h: 5.33 [5.17-5.50]; ≥6h: 5.04 [4.92-5.17]) and blood levels of total (<6h: 185 [169-203]; ≥6h: 163 [151-175]) and LDL-cholesterol (<6h: 121 [107-137]; ≥6h: 98.0 [88.4-108]), in relation to those who had longer average sleep time. There was no interaction between shift and mean sleep time for any of the variables.

**Table 3.** Comparison of OSEM, hematologic and biochemical variables of shift workers in relation shift and average sleep time (<6 hours or  $\geq$  6 hours), and interaction shift\*hours of sleep, after adjustment for age, body mass index, workload and physical exercise.

Parameters	Night Workers		Day Workers		Shift		Hours of sleep		Shift*Hours of sleep	
	< 6 hours of sleep (n=23)	$\geq$ 6 hours of sleep (n=14)	< 6 hours of sleep (n=9)	$\geq$ 6 hours of sleep (n=33)	Df	p-value	Df	p-value	Df	p-value
A <sub>max</sub> (abs)	1.27 [1.22-1.31]	1.25 [1.20-1.31]	1.26 [1.21-1.32]	1.22 [1.18-1.26]	1	0.572	1	0.214	1	0.586
A <sub>min</sub> (abs)	0.007 [0.004-0.013]	0.011 [0.006-0.021]	0.011 [0.005-0.022]	0.011 [0.007-0.017]	1	0.656	1	0.466	1	0.550
1/H <sub>50</sub> (g/dL NaCl) <sup>-1</sup>	2.38 [2.28-2.47]	2.32 [2.21-2.43]	2.49 [2.37-2.62]	2.35 [2.26-2.42]	1	0.288	1	0.020*	1	0.356
dX (g/dL NaCl)	0.014 [0.010-0.019]	0.009 [0.006-0.014]	0.016 [0.011-0.023]	0.012 [0.009-0.016]	1	0.356	1	0.031*	1	0.769
RBC (million/mm <sup>3</sup> )	5.21 [5.00-5.44]	5.04 [4.78-5.30]	5.46 [5.18-5.76]	5.05 [4.86-5.24]	1	0.392	1	0.005*	1	0.364
Hemoglobin (g/dL)	15.5 [14.8-16.2]	15.3 [14.5-16.2]	15.3 [14.4-16.2]	15.2 [14.6-15.8]	1	0.753	1	0.694	1	0.844
Hematocrit (%)	48.1 [46.2-50.1]	47.3 [45.0-49.7]	47.1 [44.7-49.6]	47.0 [45.3-48.7]	1	0.612	1	0.630	1	0.736
Mean Corpuscular Volume (fL)	92.3 [89.2-95.5]	93.9 [90.1-97.9]	86.3 [82.6-90.2]	93.2 [90.5-96.1]	1	0.114	1	0.004*	1	0.133
Leukocyte Count (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	5.59 [4.67-6.70]	5.72 [4.54-7.22]	6.25 [4.97-7.86]	6.14 [5.24-7.21]	1	0.473	1	0.977	1	0.849
Platelet Count (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	223.21 [198.84-250.57]	192.94 [166.74-223.26]	212.08 [183.07-223.26]	205.69 [185.33-228.28]	1	0.938	1	0.117	1	0.387
Serum Iron ( $\mu$ g/dL)	139 [111-172]	124 [95.8-161]	116 [88.2-153]	112 [92.8-136]	1	0.341	1	0.486	1	0.766
Reticulocyte Index (%)	1.08 [0.86-1.34]	1.04 [0.79-1.35]	1.07 [0.81-1.40]	1.43 [1.18-1.73]	1	0.289	1	0.208	1	0.190
Total Cholesterol (mg/dL)	194 [172-220]	150 [129-176]	176 [152-206]	176 [157-196]	1	0.749	1	0.027*	1	0.082
HDL-C (mg/dL)	38.5 [33.7-44.1]	41.8 [35.4-49.4]	38.2 [32.3-45.3]	37.8 [33.6-42.7]	1	0.565	1	0.581	1	0.557
LDL-C (mg/dL)	122 [103-144]	87.7 [70.7-109]	120 [97.7-148]	110 [94.0-127]	1	0.379	1	0.009*	1	0.232
Glucose (mg/dL)	87.2 [81.2-93.5]	86.0 [79.0-93.6]	83.2 [76.2-90.9]	77.3 [72.7-82.2]	1	0.114	1	0.191	1	0.442
HbA1c (%)	5.35 [5.16-5.54]	5.42 [5.18-5.65]	5.32 [5.08-5.56]	5.09 [4.93-5.25]	1	0.175	1	0.372	1	0.173
Triglycerides (mg/dL)	155 [112-216]	100 [65.9-152]	96.2 [62.3-148]	137 [102-183]	1	0.708	1	0.778	1	0.050
Uric acid (mg/dL)	6.06 [5.17-7.11]	4.89 [4.03-5.95]	5.65 [4.59-6.95]	6.46 [5.60-7.44]	1	0.357	1	0.611	1	0.059

Abbreviations: OSEM, osmotic stability of erythrocytes membrane; A<sub>max</sub>, absorbance obtained by lysis of the total erythrocyte population used in the test; A<sub>min</sub>, absorbance obtained by hemolysis under isotonic conditions with blood; 1/H<sub>50</sub>, inversion of saline concentration in which there is 50% hemolysis; dX, saline concentration range involved in the lysis process of the total erythrocyte population used in the test; HbA1c, glycated hemoglobin A1c.

\*p<0.05 indicates statistically significant difference (Generalized Linear Model and sequential Šidák procedure).

Table 4 presents the comparison of the studied variables in relation shift and SJL, and the interaction shift\*SJL, after adjustment for age, BMI, workload and exercise. There was a significant effect of the work shift and the SJL on the values of the stability variable  $A_{\min}$  and the blood levels of uric acid. The night workers (0.003 [0.001-0.006]) had lower  $A_{\min}$  values than day workers (0.012 [0.008-0.017]); on the other hand, workers without SJL (0.003 [0.001-0.006]) had lower  $A_{\min}$  values than workers with SJL (0.012 [0.009-0.016]). Furthermore, the night workers (4.54 [3.53-5.84]) presented lower values of uric acid than the day workers (6.20 [5.49-7.01]), and the workers without SJL (4.65 [3.69-5.86]) also presented lower values of uric acid than the workers with SJL (6.05 [5.52-6.64]). In addition, there was interaction between shift and SJL for the variable  $A_{\min}$  ( $p = 0.034$ ); the individuals without SJL of the night shift had lower values of  $A_{\min}$  in relation to the others.

**Table 4.** Comparison of the studied variables in relation shift and social jetlag (SJL), and the interaction shift\*SJL, after adjustment for age, body mass index, workload and physical exercise.

	Night Workers		Day Workers		Shift		SJL		Shift*SJL	
	With SJL (n=33)	Without SJL (n=4)	With SJL (n=25)	Without SJL (n=17)	Df	p-value	Df	p-value	Df	p-value
A <sub>max</sub> (abs)	1.26 [1.22-1.30]	1.22 [1.10-1.35]	1.25 [1.20-1.30]	1.22 [1.18-1.26]	1	0.963	1	0.347	1	0.896
A <sub>min</sub> (abs)	0.009 [0.006-0.013] <sup>a</sup>	0.001 [0.0002-0.004] <sup>b</sup>	0.016 [0.009-0.027] <sup>a</sup>	0.009 [0.006-0.014] <sup>a</sup>	1	0.003*	1	<0.001*	1	0.034*
1/H <sub>50</sub> (g/dL NaCl) <sup>-1</sup>	2.36 [2.29-2.44]	2.38 [2.13-2.65]	2.28 [2.18-2.38]	2.45 [2.37-2.53]	1	0.926	1	0.201	1	0.279
dX (g/dL NaCl)	0.013 [0.009-0.017]	0.012 [0.005-0.028]	0.009 [0.007-0.013]	0.015 [0.012-0.020]	1	0.972	1	0.438	1	0.264
Red Blood Cells (million/mm <sup>3</sup> )	5.14 [4.94-5.35]	5.14 [4.50-5.87]	5.08 [4.82-5.35]	5.21 [5.00-5.43]	1	0.986	1	0.733	1	0.712
Hemoglobin (g/dL)	15.4 [14.8-16.0]	14.5 [12.7-16.4]	15.6 [14.8-16.4]	15.0 [14.5-15.6]	1	0.561	1	0.160	1	0.671
Hematocrit (%)	47.6 [46.0-49.2]	49.3 [44.0-55.2]	48.0 [45.9-50.2]	46.3 [44.7-47.9]	1	0.482	1	0.980	1	0.267
Mean Corpuscular Volume (fL)	92.6 [89.8-95.4]	96.1 [86.8-106]	94.7 [91.1-98.5]	89.0 [86.3-91.8]	1	0.435	1	0.651	1	0.080
Leukocyte Count (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	5.60 [4.82-6.50]	4.48 [2.70-7.42]	7.01 [5.76-8.53]	5.75 [4.92-6.72]	1	0.166	1	1.36	1	0.927
Platelet Count (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	214.60 [193.50-238.01]	184.23 [130.89-259.29]	195.11 [170.44-223.37]	211.49 [190.35-234.98]	1	0.856	1	0.705	1	0.223
Serum iron(μg/dL)	133 [110-161]	128 [68.5-239]	111 [86.8-143]	113 [93.9-137]	1	0.486	1	0.947	1	0.862
Reticulocyte Index (%)	1.07 [0.88-1.30]	0.88 [0.46-1.67]	1.35 [1.05-1.70]	1.30 [1.06-1.58]	1	0.160	1	0.506	1	0.663
Total Cholesterol (mg/dL)	179 [160-202]	142 [96.8-209]	172 [148-200]	173 [154-195]	1	0.553	1	0.279	1	0.274
HDL-C (mg/dL)	40.4 [36.1-45.1]	33.3 [23.0-48.1]	35.2 [30.5-40.6]	40.2 [35.9-45.0]	1	0.840	1	0.774	1	0.112
LDL-C (mg/dL)	109 [93.2-129]	87.4 [51.0-149]	108 [87.7-133]	111 [94.9-132]	1	0.532	1	0.514	1	0.384
Glucose (mg/dL)	86.9 [81.8-92.4]	74.7 [61.2-91.3]	78.9 [72.9-85.4]	79.5 [74.7-84.5]	1	0.792	1	0.195	1	0.157
HbA1c (%)	5.40 [5.20-5.54]	5.16 [4.65-5.73]	5.19 [4.99-5.41]	5.15 [4.99-5.32]	1	0.633	1	0.419	1	0.602
Triglycerides (mg/dL)	134 [100-179]	100 [38.3-265]	143 [98.1-208]	106 [78.5-142]	1	0.864	1	0.282	1	0.983
Uric Acid (mg/dL)	5.68 [4.94-6.53]	3.62 [2.29-5.74]	6.45 [5.39-7.73]	5.96 [5.17-6.87]	1	0.048*	1	0.039*	1	0.149

Abbreviations: A<sub>max</sub>, absorbance obtained by lysis of the total erythrocyte population used in the test; A<sub>min</sub>, absorbance obtained by hemolysis under isotonic conditions with blood; 1/H<sub>50</sub>, inversion of saline concentration in which there is 50% hemolysis; dX, saline concentration range involved in the lysis process of the total erythrocyte population used in the test; HbA1c, glycated hemoglobin A1c.

\*p<0.05 indicates statistically significant difference. SJL was calculated based on the absolute difference between the average sleep time on working and rest days and was dichotomically categorized as > 60 min (with SJL) or < 60 min (without SJL) (Generalized Linear Model and sequential Šidák procedure).

## Discussion

The present study evaluated the influence of sleep time and SJL on the parameters of erythrocyte membrane stability and its relation to the work shift. The use of the Generalized Linear Model and sequential Šidák procedure showed that workers without SJL presented higher membrane stability, since they presented lower  $A_{\min}$  values, in relation to workers with SJL. Besides that, there was interaction between shift and SJL for this variable  $A_{\min}$ , since the individuals without SJL of the night shift presented lower values of  $A_{\min}$  in relation to the others. On the other hand, the use of this same statistical formalism showed that workers who have less than 6 hours of sleep have erythrocytes with greater osmotic stability, since they presented higher values of  $1/H_{50}$  and  $dX$ . It is important to note that this behavior, although evaluated *in vitro*, reflects changes present *in vivo* conditions of the workers.

It is important to note that  $A_{\min}$ ,  $1/H_{50}$  and  $dX$ , which are all erythrocyte membrane stability variables, have different meanings. As can be seen in Figure 1,  $A_{\min}$  is a variable that is directly proportional to the initial lysis rate, even under conditions of blood-like osmolarity. Therefore, this variable is the one that most represents the membrane stability of erythrocytes *in vivo*. On the other hand, as can still be seen in Figure 1,  $H_{50}$  and  $dX$  are variables that in fact will represent the osmotic behaviour of RBC. Indeed, it is easy to infer from that figure that  $H_{50}$  is a variable of osmotic fragility, while  $dX$  is effectively a variable of osmotic stability. That's why the  $H_{50}$  results are often represented as  $1/H_{50}$ , so that both  $1/H_{50}$  and  $dX$  can represent the osmotic stability of those cells.

The erythrocyte membrane stability may be influenced by several factors, such as the LDL-C levels [24], which were also investigated in this study. Indeed, the cholesterol content of the erythrocyte membrane is directly associated with LDL-C levels, as a function of cholesterol transfer from this plasma lipoprotein to the red blood cell membrane [33, 34]. It is important to note that this increase in membrane cholesterol content to a certain extent allows the membrane to achieve the so-called critical fluidity and the stability required to perform its functions. Thus, the cholesterol content in the membrane is important to maintain erythrocyte stability. That is why non-excessive increases in membrane cholesterol content raise the osmotic stability of the cell [35]. However, beyond this critical level, the increase in cholesterol content may decrease membrane stability, due to a decrease in the deformability, essential property to allow the passage of the erythrocyte through capillaries of narrower caliber by the organism [20, 36, 37], leading to impairment of its functions. In the present study, since erythrocytes of workers who had less than six hours of sleep per day were osmotically more stable, it is possible that this increased erythrocyte stability was due to higher levels of LDL-C, since those workers also had higher levels of LDL-C (Table 3). This makes a lot of sense with the recognized influence that plasma lipid concentrations suffer from circadian misalignment and sleep deprivation [38], especially with the inverse association reported between blood levels of non-HDL-C and sleep duration [39].

Regarding the two stability variables that had a relation with sleep time, it is important to highlight  $dX$ . An extremely small value of  $dX$  indicates a transition between two states, one intact and another lysate, ie, an all-or-nothing transition, while a higher value of  $dX$  indicates existence of intermediate states, which suggests existence of cellular heterogeneity in the lysis transition, with subpopulations of erythrocytes with different vulnerabilities to osmotic lysis.

Among the erythrogram parameters, the red cell distribution width (RDW) has a meaning similar to  $dX$ , since RDW, which is obtained from the standard deviation of the mean corpuscular volume (MCV), represents the volume variability of the erythrocyte. This is why RDW is widely used to indicate heterogeneity in the erythrocyte population. Certainly it is because of the common meaning between  $dX$  and RDW that these two variables have been directly associated [24]. Unfortunately, in the present study there was no evaluation of RDW, but the association of higher  $dX$  values with an average sleep time  $< 6$  h suggests the

existence of greater variability in the erythrocyte population in this group. This question is very important because RDW was associated with sleep time according to a U-shaped curve, with lower RDW values associated with mean sleep duration of 7-8 h and higher values associated with sleep duration time  $\leq 5$  and  $\geq 10$  hours per night. This is very worrying, since the elevation of RDW has the potential to predict premature mortality [40] due to many diseases [41-43], among which the cardiovascular disease of atherosclerotic origin stands out [44-50], particularly by the interposition of the erythrocyte in the relationship between hypercholesterolemia and progression of the atherosclerotic lesion [20]. Surely this is an important reason why the shift work has been considered as a risk factor for hypertension, inflammation and cardiovascular disease [51, 52].

The association between  $A_{\min}$  and SJL also deserves attention, bearing in mind that  $A_{\min}$  has a different meaning in relation to the other stability variables, as previously mentioned. In this case, the fact that workers without SJL have presented higher membrane stability, since they have lower  $A_{\min}$  values in relation to workers with SJL, seems to be a good association for the shift workers without SJL. Once the individuals without SJL of the night shift were the workers who presented lower values of  $A_{\min}$  in relation to the others, this means that the SJL is a variable that has its own deleterious implications. Indeed, SJL has been associated with inflammatory biomarkers [17] and in this study was positively associated with the amount of lymphocytes ( $r = 0.23$ ,  $p < 0.05$ ). Actually, in addition to SJL, sleep restriction has also been related to changes in immune function, with a gradual increase in subpopulations of white blood cells and changes in their rhythmicity [53].

In addition to sleep deprivation [7], shift work causes misalignment of the biological rhythms, which can negatively affect the regulation of the hematologic system [54]. The erythrocyte population in the blood is under constant change due to the removal of degenerate and/or old erythrocytes and the production of new erythrocytes [55]. Circulating erythrocytes exhibit circadian fluctuation that is regulated not only by the endogenous biological clock, but also by the light/dark and sleep/wake cycles [56, 57]. The subcellular processes within the erythrocytes are not the only ones that undergo circadian oscillations; the number of red blood cells also varies rhythmically [56]. The lower MCV values and the higher RBC counts in the group of workers who slept on average less than 6 hours per day seem to be due to the stochastic influence of the lower average sleep time, caused by shift work, on the volume and number of circulating erythrocytes. However, the mechanisms by which this influence would have occurred can not be inferred from the results of this study, but can certainly involve aspects of selective nutritional nature.

It is important that other limitations of the present study are also considered. First, the cross-sectional nature of the study does not allow the establishment of causal relationships. Second, the relatively small population size impairs its characterization and analysis, although significant results have been found in this study. Another difficulty found in the study was the variability of the workload between the two work shifts, which required statistical adjustments to remove the effect of this and other confounding factors. In addition, although the findings reported here are important and essential for understanding the mechanisms of circadian misalignment over membrane stability, it should be noted that the results of experiments in *in vitro* models can not be directly extrapolated to *in vivo* systems. Therefore, it is important to highlight the need to carry out new studies using new tools in order to clarify how the circadian rhythm can influence the erythrocyte membrane stability, leading to a new understanding of its outcomes in the health of these workers. There is also a need to study further the relation between shift work and chronotype, with the aim to reduce the consequences of circadian rhythm misalignment and sleep deprivation [58, 59].

In summary, the results of this study confirm the initial hypothesis raised, since night workers with SJL have erythrocytes with lower stability compared to night workers without

SJL, under conditions of blood-like osmolarity. On the other hand, regardless of the work shift, sleeping on average less than 6 hours per day is associated with in vitro increase in erythrocyte membrane stability and cellular heterogeneity. To the best of our knowledge, this is the first study that has identified that a sleep time < 6 hours per day is able to interfere with the erythrocyte membrane stability. It is possible that this behavior is associated with changes in the lipid profile. Due to the high risk of diseases in this group, the execution of new studies focusing on hematologic parameters in shift workers becomes a task of great importance.

### **Aknowledgments**

The authors wish to thank the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES), for the doctoral scholarship granted to K. R. C. Teixeira; the *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais* (FAPEMIG), for the funding of this study; the *Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde* (PPGCS) da *Universidade Federal de Uberlândia* (UFU), which enabled the realization of this research; the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq), for the productivity grant awarded to N. Penha-Silva; and the study volunteers.

### **Funding**

*Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais* (FAPEMIG)

### **Conflict of interest**

The authors state that they have no conflicts of interest.

### **References**

1. Gamble KL, Young ME. Metabolism as an integral cog in the mammalian circadian clockwork. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2013;48(4):317-31. doi: 10.3109/10409238.2013.786672. PubMed PMID: 23594144; PubMed Central PMCID: PMC3862897.
2. Schulz P, Steimer T. Neurobiology of circadian systems. *CNS drugs*. 2009;23 Suppl 2:3-13. doi: 10.2165/11318620-000000000-00000. PubMed PMID: 19708721.
3. de Goede P, Wefers J, Brombacher EC, Schrauwen P, Kalsbeek A. Circadian rhythms in mitochondrial respiration. *Journal of molecular endocrinology*. 2018;60(3):R115-R30. doi: 10.1530/JME-17-0196. PubMed PMID: 29378772; PubMed Central PMCID: PMC5854864.
4. Lu LF, Wang CP, Tsai IT, Hung WC, Yu TH, Wu CC, et al. Relationship between shift work and peripheral total and differential leukocyte counts in Chinese steel workers. *J Occup Health*. 2016;58(1):81-8. doi: 10.1539/joh.15-0137-OA. PubMed PMID: 26549833.
5. Tai SY, Lin PC, Chen YM, Hung HC, Pan CH, Pan SM, et al. Effects of marital status and shift work on family function among registered nurses. *Ind Health*. 2014;52(4):296-303. PubMed PMID: 24909112; PubMed Central PMCID: PMC4243015.
6. Waterhouse J, Buckley P, Edwards B, Reilly T. Measurement of, and some reasons for, differences in eating habits between night and day workers. *Chronobiol Int*. 2003;20(6):1075-92. PubMed PMID: 14680144.
7. Padilha HG, Crispim CA, Zimberg IZ, Folkard S, Tufik S, de Mello MT. Metabolic responses on the early shift. *Chronobiol Int*. 2010;27(5):1080-92. doi: 10.3109/07420528.2010.489883. PubMed PMID: 20636217.

8. Schlafer O, Wenzel V, Hogl B. [Sleep disorders among physicians on shift work]. *Der Anaesthetist*. 2014;63(11):844-51. doi: 10.1007/s00101-014-2374-z. PubMed PMID: 25213642.
9. Pietroiusti A, Neri A, Somma G, Coppeta L, Iavicoli I, Bergamaschi A, et al. Incidence of metabolic syndrome among night-shift healthcare workers. *Occup Environ Med*. 2010;67(1):54-7. doi: 10.1136/oem.2009.046797. PubMed PMID: 19737731.
10. Foster RG, Wulff K. The rhythm of rest and excess. *Nat Rev Neurosci*. 2005;6(5):407-14. doi: 10.1038/nrn1670. PubMed PMID: 15861183.
11. Boivin J, Bunting L, Collins JA, Nygren KG. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Hum Reprod*. 2007;22(6):1506-12. doi: 10.1093/humrep/dem046. PubMed PMID: 17376819.
12. Scheer FA, Hilton MF, Mantzoros CS, Shea SA. Adverse metabolic and cardiovascular consequences of circadian misalignment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(11):4453-8. doi: 10.1073/pnas.0808180106. PubMed PMID: 19255424; PubMed Central PMCID: PMC2657421.
13. Papantoniou K, Castano-Vinyals G, Espinosa A, Aragonés N, Pérez-Gómez B, Ardanaz E, et al. Breast cancer risk and night shift work in a case-control study in a Spanish population. *Eur J Epidemiol*. 2016;31(9):867-78. doi: 10.1007/s10654-015-0073-y. PubMed PMID: 26205167.
14. Wittmann M, Dinich J, Meroow M, Roenneberg T. Social jetlag: misalignment of biological and social time. *Chronobiol Int*. 2006;23(1-2):497-509. doi: 10.1080/07420520500545979. PubMed PMID: 16687322.
15. Roenneberg T, Meroow M. Entrainment of the human circadian clock. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2007;72:293-9. doi: 10.1101/sqb.2007.72.043. PubMed PMID: 18419286.
16. Roenneberg T, Allebrandt KV, Meroow M, Vetter C. Social jetlag and obesity. *Curr Biol*. 2012;22(10):939-43. doi: 10.1016/j.cub.2012.03.038. PubMed PMID: 22578422.
17. Parsons MJ, Moffitt TE, Gregory AM, Goldman-Mellor S, Nolan PM, Poulton R, et al. Social jetlag, obesity and metabolic disorder: investigation in a cohort study. *Int J Obes (Lond)*. 2015;39(5):842-8. doi: 10.1038/ijo.2014.201. PubMed PMID: 25601363; PubMed Central PMCID: PMC4422765.
18. Rodrigues R, Alves de Medeiros L, Moreira Cunha L, da Silva Garrote-Filho M, Bernardino Neto M, Tannus Jorge P, et al. Correlations of the glycemic variability with oxidative stress and erythrocytes membrane stability in patients with type 1 diabetes under intensive treatment. *Diabetes Res Clin Pract*. 2018. doi: 10.1016/j.diabres.2018.01.031. PubMed PMID: 29427698.
19. Osuntokun AA, Fasanmade OA, Adekola AO, Amira CO. Lipid peroxidation and erythrocyte fragility in poorly controlled type 2 diabetes mellitus. *Nig Q J Hosp Med*. 2007;17(4):148-51. PubMed PMID: 18320761.
20. da Silva Garrote-Filho M, Bernardino-Neto M, Penha-Silva N. Influence of Erythrocyte Membrane Stability in Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*. 2017;19(4):17. doi: 10.1007/s11883-017-0653-2. PubMed PMID: 28243806.
21. Gaikwad SS, Avari JG. Effect On Morphology, Osmotic Fragility And Electro Kinetic Potential Of Erythrocytes In Hypertension. *Curr Hypertens Rev*. 2017. doi: 10.2174/1573402113666170911140747. PubMed PMID: 28901247.
22. Wide L, Bengtsson C, Birgegård G. Circadian rhythm of erythropoietin in human serum. *Br J Haematol*. 1989;72(1):85-90. PubMed PMID: 2736245.
23. Mohandas N, Gallagher PG. Red cell membrane: past, present, and future. *Blood*. 2008;112(10):3939-48. doi: 10.1182/blood-2008-07-161166. PubMed PMID: 18988878; PubMed Central PMCID: PMC2582001.



24. Bernardino Neto M, de Avelar EB, Jr., Arantes TS, Jordao IA, da Costa Huss JC, de Souza TM, et al. Bivariate and multivariate analyses of the correlations between stability of the erythrocyte membrane, serum lipids and hematological variables. *Biorheology*. 2013;50(5-6):305-20. doi: 10.3233/BIR-130641. PubMed PMID: 24398611.
25. WHO. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. World Health Organization technical report series. 2000;894:i-xii, 1-253. PubMed PMID: 11234459.
26. WHO. Waist circumference and waist-hip ratio: report of a WHO expert consultation. In: World Health Organization W, editor. Geneva2008.
27. Mota MC, Silva CM, Balieiro LCT, Fahmy WM, Crispim CA. Social jetlag and metabolic control in non-communicable chronic diseases: a study addressing different obesity statuses. *Sci Rep*. 2017;7(1):6358. doi: 10.1038/s41598-017-06723-w. PubMed PMID: 28743872; PubMed Central PMCID: PMC5526860.
28. Reutrakul S, Hood MM, Crowley SJ, Morgan MK, Teodori M, Knutson KL, et al. Chronotype is independently associated with glycemic control in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2013;36(9):2523-9. doi: 10.2337/dc12-2697. PubMed PMID: 23637357; PubMed Central PMCID: PMC3747872.
29. Juda M, Vetter C, Roenneberg T. The Munich ChronoType Questionnaire for Shift-Workers (MCTQShift). *J Biol Rhythms*. 2013;28(2):130-40. doi: 10.1177/0748730412475041. PubMed PMID: 23606612.
30. Johns MW. A new method for measuring daytime sleepiness: the Epworth sleepiness scale. *Sleep*. 1991;14(6):540-5. PubMed PMID: 1798888.
31. Bertolazi AN. Tradução, adaptação cultural e validação de dois instrumentos de avaliação Do sono: Escala de Sonolência de Epworth e Índice de Qualidade de sono de Pittsburgh. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul.; 2008.
32. Kendzerska TB, Smith PM, Brignardello-Petersen R, Leung RS, Tomlinson GA. Evaluation of the measurement properties of the Epworth sleepiness scale: a systematic review. *Sleep Med Rev*. 2014;18(4):321-31. doi: 10.1016/j.smrv.2013.08.002. PubMed PMID: 24135493.
33. Cooper RA. Influence of increased membrane cholesterol on membrane fluidity and cell function in human red blood cells. *J Supramol Struct*. 1978;8(4):413-30. doi: 10.1002/jss.400080404. PubMed PMID: 723275.
34. Koter M, Franiak I, Strychalska K, Broncel M, Chojnowska-Jeziarska J. Damage to the structure of erythrocyte plasma membranes in patients with type-2 hypercholesterolemia. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36(2):205-15. PubMed PMID: 14643886.
35. Marks PA, Johnson AB. Relationship between the age of human erythrocytes and their osmotic resistance: a basis for separating young and old erythrocytes. *J Clin Invest*. 1958;37(11):1542-8. doi: 10.1172/JCI103746. PubMed PMID: 13587663; PubMed Central PMCID: PMC1062836.
36. de Freitas MV, de Oliveira MR, dos Santos DF, de Cassia Mascarenhas Netto R, Fenelon SB, Penha-Silva N. Influence of the use of statin on the stability of erythrocyte membranes in multiple sclerosis. *J Membr Biol*. 2010;233(1-3):127-34. doi: 10.1007/s00232-010-9232-y. PubMed PMID: 20146058.
37. Hui SW, Stewart CM, Carpenter MP, Stewart TP. Effects of cholesterol on lipid organization in human erythrocyte membrane. *J Cell Biol*. 1980;85(2):283-91. PubMed PMID: 7372709; PubMed Central PMCID: PMC2110611.
38. Chua EC, Shui G, Cazenave-Gassiot A, Wenk MR, Gooley JJ. Changes in Plasma Lipids during Exposure to Total Sleep Deprivation. *Sleep*. 2015;38(11):1683-91. doi: 10.5665/sleep.5142. PubMed PMID: 26194579; PubMed Central PMCID: PMC4813350.

39. Lemke MK, Apostolopoulos Y, Hege A, Wideman L, Sonmez S. Work, sleep, and cholesterol levels of U.S. long-haul truck drivers. *Ind Health*. 2017;55(2):149-61. doi: 10.2486/indhealth.2016-0127. PubMed PMID: 28049935; PubMed Central PMCID: PMC5383412.
40. Loprinzi PD. Sleep duration and sleep disorder with red blood cell distribution width. *Am J Health Behav*. 2015;39(4):471-4. doi: 10.5993/AJHB.39.4.3. PubMed PMID: 26018095.
41. Lippi G, Plebani M. Red blood cell distribution width (RDW) and human pathology. One size fits all. *Clin Chem Lab Med*. 2014;52(9):1247-9. doi: 10.1515/cclm-2014-0585. PubMed PMID: 24945432.
42. Park KI, Kim KY. Clinical evaluation of red cell volume distribution width (RDW). *Yonsei Med J*. 1987;28(4):282-90. doi: 10.3349/ymj.1987.28.4.282. PubMed PMID: 3439197.
43. Salvagno GL, Sanchis-Gomar F, Picanza A, Lippi G. Red blood cell distribution width: A simple parameter with multiple clinical applications. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2015;52(2):86-105. doi: 10.3109/10408363.2014.992064. PubMed PMID: 25535770.
44. Danese E, Lippi G, Montagnana M. Red blood cell distribution width and cardiovascular diseases. *J Thorac Dis*. 2015;7(10):E402-11. doi: 10.3978/j.issn.2072-1439.2015.10.04. PubMed PMID: 26623117; PubMed Central PMCID: PMC4635283.
45. Li N, Zhou H, Tang Q. Red Blood Cell Distribution Width: A Novel Predictive Indicator for Cardiovascular and Cerebrovascular Diseases. *Dis Markers*. 2017;2017:7089493. doi: 10.1155/2017/7089493. PubMed PMID: 29038615; PubMed Central PMCID: PMC5606102.
46. Su C, Liao LZ, Song Y, Xu ZW, Mei WY. The role of red blood cell distribution width in mortality and cardiovascular risk among patients with coronary artery diseases: a systematic review and meta-analysis. *J Thorac Dis*. 2014;6(10):1429-40. doi: 10.3978/j.issn.2072-1439.2014.09.10. PubMed PMID: 25364520; PubMed Central PMCID: PMC4215144.
47. Bujak K, Wasilewski J, Osadnik T, Jonczyk S, Kolodziejaska A, Gierlotka M, et al. The Prognostic Role of Red Blood Cell Distribution Width in Coronary Artery Disease: A Review of the Pathophysiology. *Dis Markers*. 2015;2015:824624. doi: 10.1155/2015/824624. PubMed PMID: 26379362; PubMed Central PMCID: PMC4563066.
48. Wonnerth A, Krychtiuk KA, Mayer FJ, Minar E, Wojta J, Schillinger M, et al. Red cell distribution width and mortality in carotid atherosclerosis. *Eur J Clin Invest*. 2016;46(2):198-204. doi: 10.1111/eci.12584. PubMed PMID: 26709235.
49. Tziakas D, Chalikias G, Grapsa A, Gioka T, Tentes I, Konstantinides S. Red blood cell distribution width: a strong prognostic marker in cardiovascular disease: is associated with cholesterol content of erythrocyte membrane. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2012;51(4):243-54. doi: 10.3233/CH-2012-1530. PubMed PMID: 22277951.
50. Tziakas DN, Chalikias GK, Stakos D, Boudoulas H. The role of red blood cells in the progression and instability of atherosclerotic plaque. *Int J Cardiol*. 2010;142(1):2-7. doi: 10.1016/j.ijcard.2009.10.031. PubMed PMID: 19906450.
51. Burgueno A, Gemma C, Gianotti TF, Sookoian S, Pirola CJ. Increased levels of resistin in rotating shift workers: a potential mediator of cardiovascular risk associated with circadian misalignment. *Atherosclerosis*. 2010;210(2):625-9. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2009.12.032. PubMed PMID: 20106477.
52. Puttonen S, Viitasalo K, Harma M. Effect of shiftwork on systemic markers of inflammation. *Chronobiol Int*. 2011;28(6):528-35. doi: 10.3109/07420528.2011.580869. PubMed PMID: 21797781.

53. Lasselin J, Rehman JU, Akerstedt T, Lekander M, Axelsson J. Effect of long-term sleep restriction and subsequent recovery sleep on the diurnal rhythms of white blood cell subpopulations. *Brain Behav Immun.* 2015;47:93-9. doi: 10.1016/j.bbi.2014.10.004. PubMed PMID: 25451611.
54. Pritchett D, Reddy AB. Circadian Clocks in the Hematologic System. *J Biol Rhythms.* 2015;30(5):374-88. doi: 10.1177/0748730415592729. PubMed PMID: 26163380.
55. Dinarelli S, Longo G, Dietler G, Francioso A, Mosca L, Pannitteri G, et al. Erythrocyte's aging in microgravity highlights how environmental stimuli shape metabolism and morphology. *Sci Rep.* 2018;8(1):5277. doi: 10.1038/s41598-018-22870-0. PubMed PMID: 29588453; PubMed Central PMCID: PMC5869709.
56. Oishi K, Ohkura N, Kadota K, Kasamatsu M, Shibusawa K, Matsuda J, et al. Clock mutation affects circadian regulation of circulating blood cells. *J Circadian Rhythms.* 2006;4:13. doi: 10.1186/1740-3391-4-13. PubMed PMID: 17014730; PubMed Central PMCID: PMC1592512.
57. Haus E, Lakatua DJ, Swoyer J, Sackett-Lundeen L. Chronobiology in hematology and immunology. *Am J Anat.* 1983;168(4):467-517. doi: 10.1002/aja.1001680406. PubMed PMID: 6364772.
58. Kantermann T, Wehrens SM, Ulhoa MA, Moreno C, Skene DJ. Noisy and individual, but doable: shift-work research in humans. *Prog Brain Res.* 2012;199:399-411. doi: 10.1016/B978-0-444-59427-3.00022-8. PubMed PMID: 22877677.
59. Vetter C, Fischer D, Matera JL, Roenneberg T. Aligning work and circadian time in shift workers improves sleep and reduces circadian disruption. *Curr Biol.* 2015;25(7):907-11. doi: 10.1016/j.cub.2015.01.064. PubMed PMID: 25772446.

## ANEXO A – Comprovante de Submissão do Artigo 1

The screenshot shows a web browser window displaying the Outlook interface. The address bar shows the URL: <https://outlook.live.com/owa/?path=/mail/inbox/rp>. The page title is "Email do Outlook". The interface includes a search bar, navigation buttons (Novo, Responder, Excluir, Arquivar, Lixo eletrônico, Limpar), and a list of folders on the left. The main content area displays an email with the following details:

**Title:** Oxidative Stress Is Influenced by Night Work and Social Jetlag  
**Corresponding Author:** Dr. Cibebe Aparecida Crispim  
**All Authors:** Kely Teixeira; Camila P dos Santos; Luciana A de Medeiros; Jordane A Mendes; Thúlio M Cunha; Kátia de Angelis; Nilson Penha-Silva; Erick P de Oliveira; Cibebe A Crispim  
**Article type:** Original article

Dear Dr. Crispim,

This is to confirm that the above-mentioned manuscript has been received for consideration in Free Radical Biology & Medicine.

You will be able to check on the progress of your manuscript by logging on to the Elsevier Editorial System as an author:  
<https://ees.elsevier.com/frbm/>  
Your username is: [cibebecripsim@gmail.com](mailto:cibebecripsim@gmail.com)

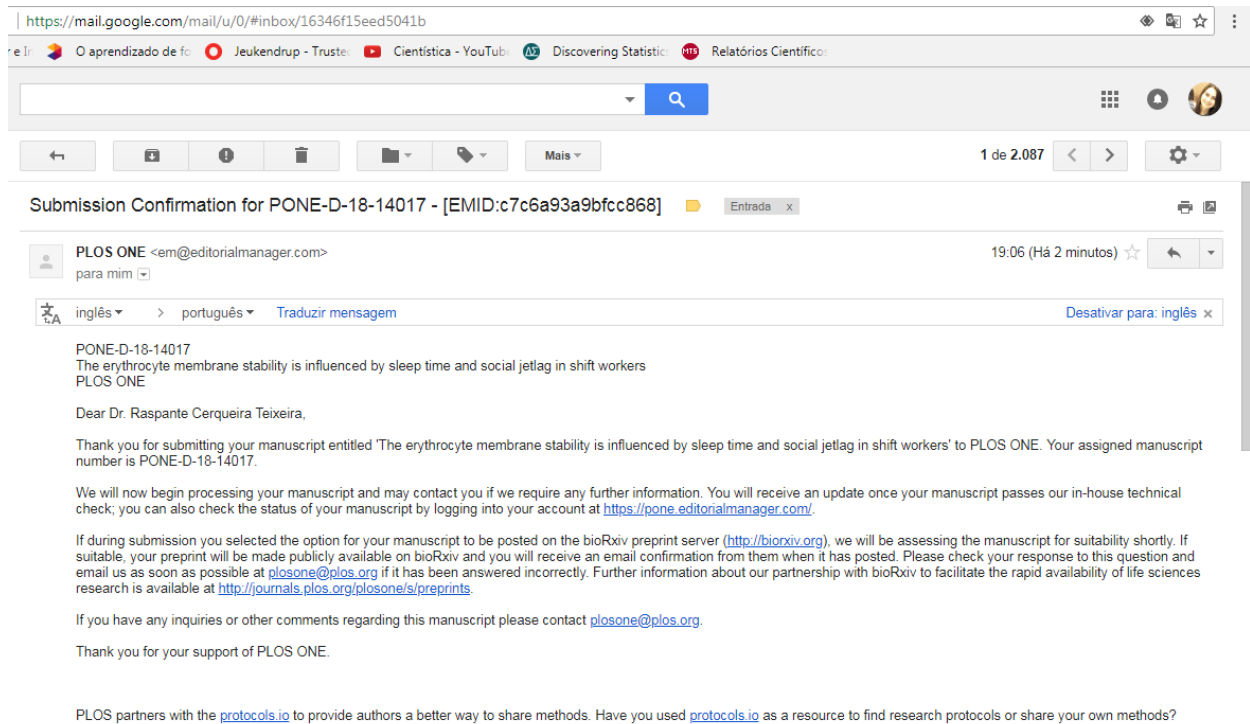
If you need to retrieve password details, please go to: [http://ees.elsevier.com/frbm/automail\\_query.asp%](http://ees.elsevier.com/frbm/automail_query.asp%)

Your paper will be given a manuscript number shortly and you will soon receive an e-mail with this number for your reference.

Thank you for submitting your work to Free Radical Biology & Medicine. Should you have any questions, please feel free to contact our office.

Sincerely,  
Editorial Office  
Free Radical Biology & Medicine

## ANEXO B – Comprovante de Submissão do Artigo 2



The screenshot shows a Gmail interface with a browser address bar at the top displaying <https://mail.google.com/mail/u/0/#inbox/16346f15eed5041b>. The email subject is "Submission Confirmation for PONE-D-18-14017 - [EMID:c7c6a93a9bfcc868]". The sender is "PLOS ONE <em@editorialmanager.com>" and the recipient is "para mim". The email is in Portuguese, with a language selector at the top showing "Inglês" and "português". The main body of the email contains the following text:

PONE-D-18-14017  
The erythrocyte membrane stability is influenced by sleep time and social jetlag in shift workers  
PLOS ONE

Dear Dr. Raspante Cerqueira Teixeira,

Thank you for submitting your manuscript entitled 'The erythrocyte membrane stability is influenced by sleep time and social jetlag in shift workers' to PLOS ONE. Your assigned manuscript number is PONE-D-18-14017.

We will now begin processing your manuscript and may contact you if we require any further information. You will receive an update once your manuscript passes our in-house technical check; you can also check the status of your manuscript by logging into your account at <https://pone.editorialmanager.com/>.

If during submission you selected the option for your manuscript to be posted on the bioRxiv preprint server (<http://biorxiv.org>), we will be assessing the manuscript for suitability shortly. If suitable, your preprint will be made publicly available on bioRxiv and you will receive an email confirmation from them when it has posted. Please check your response to this question and email us as soon as possible at [plosone@plos.org](mailto:plosone@plos.org) if it has been answered incorrectly. Further information about our partnership with bioRxiv to facilitate the rapid availability of life sciences research is available at <http://journals.plos.org/plosone/s/preprints>.

If you have any inquiries or other comments regarding this manuscript please contact [plosone@plos.org](mailto:plosone@plos.org).

Thank you for your support of PLOS ONE.

PLOS partners with the [protocols.io](http://protocols.io) to provide authors a better way to share methods. Have you used [protocols.io](http://protocols.io) as a resource to find research protocols or share your own methods?

## APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) para participar da pesquisa intitulada “**Associação entre índice inflamatório da dieta, estabilidade de membrana dos eritrócitos e marcadores do estresse oxidativo em trabalhadores em turnos**”, sob a responsabilidade dos pesquisadores: Kely Raspante Teixeira, Érick Prado de Oliveira e Cibele Aparecida Crispim. Nesta pesquisa buscaremos estabelecer, principalmente, a associação dos alimentos ingeridos com os exames de sangue. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será obtido pela pesquisadora Kely Raspante Teixeira no momento da coleta dos dados do estudo que será realizada no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), campus Umuarama e no hospital Uberlândia Medical Center (UMC). Na participação você será questionado sobre dados socioeconômicos, de saúde e dos hábitos de vida (perguntas sobre o horário que você trabalha, dorme e acorda, a qualidade do seu sono, se você fuma, se possui algumas doenças, como diabetes, hipertensão, problemas cardíacos, pulmonares e alteração no colesterol e triglicérides, e quantas vezes vai ao médico por ano). Em jejum, independente do seu turno de trabalho, você vai passar por dois equipamentos que aferem o Gasto Energético de Repouso (GER) e a composição corporal. Você também será pesado e medido (altura, circunferência da cintura), sendo necessário a retirada do seu calçado e que você esteja trajando roupas leves. Se você não estiver trajando roupas leves, nós descontaremos o peso da sua roupa (nós sabemos quanto pesam diferentes vestimentas) do seu peso total obtido. Após a aplicação das questões e das medições, ocorrerá o preenchimento de questionários sobre os seus hábitos alimentares, seu nível de atividade física e sobre o seu sono-, e coleta de sangue para análise de alguns parâmetros que podem indicar alteração sanguínea no seu corpo, que pode ser devido à alguma doença, excesso de peso ou alimentação. Este procedimento pode causar uma leve dor. Você terá que dispor de aproximadamente 45 minutos para participar da pesquisa. Após as avaliações será oferecido a você um lanche. Ao analisar seus exames e estudá-lo conjuntamente aos parâmetros relacionados à sua alimentação, você em nenhum momento será identificado. Os resultados da pesquisa serão publicados e ainda assim a sua identidade será preservada. Você não terá nenhum ganho financeiro por participar na pesquisa e nem gastos, nem mesmo de transporte, pois todas as avaliações e análises serão por conta dos pesquisadores. Os riscos consistem em: constrangimento (“vergonha”) para medição de peso e circunferência da cintura, além de uma possível identificação do participante; entretanto, todos os cuidados serão tomados para se evitar qualquer ocorrência deste tipo. Em todos os questionários os participantes não serão referidos por seus nomes e sim por códigos, o que minimiza o risco de identificação. O benefício desse estudo ocorrerá por meio das informações coletadas e analisadas, pois serão gerados resultados compilados retratando a realidade da rotina desses indivíduos em relação aos seus hábitos de vida, no que tange o estado nutricional e hábitos de sono. Espera-se que estes dados possam servir de subsídios para o desenvolvimento de ações e projetos visando à prevenção de agravos e a promoção da qualidade de vida para estes indivíduos.

Você é livre para deixar de participar da pesquisa a qualquer momento sem nenhum prejuízo ou coação. Uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com você. Qualquer dúvida a respeito da pesquisa, você poderá entrar em contato com:

- Kely Raspante Teixeira. Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Uberlândia. Endereço: Avenida Pará, 1720- Bloco 2U, Campus Umuarama. Fone: 3218-2389
- Cibele Aparecida Crispim e Érick Prado de Oliveira. Professores Adjunto I, Curso de Nutrição, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Uberlândia. Endereço: Avenida Pará, 1720- Bloco 2U, Campus Umuarama. Fone: 3218-2084.

Poderá também entrar em contato com o Comitê de Ética na Pesquisa com Seres-Humanos – Universidade Federal de Uberlândia: Av. João Naves de Ávila, nº 2121, bloco J, Campus Santa Mônica – Uberlândia –MG, CEP: 38408-100; fone: 34-32394131. O CEP é um colegiado independente criado para defender os interesses dos participantes das pesquisas em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos conforme resoluções do Conselho Nacional de Saúde.

Uberlândia, ..... de ..... de 201.....

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr<sup>a</sup> Cibele Aparecida Crispim

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr Érick Prado de Oliveira

\_\_\_\_\_  
Kely Raspante Teixeira

Eu aceito participar do projeto citado acima, voluntariamente, após ter sido devidamente esclarecido.

\_\_\_\_\_  
Participante da pesquisa

## APÊNDICE B – Conjunto de Questões Utilizado para Coleta de Dados

Para preenchimento da equipe executora:	Código do voluntário: _____
---	-----------------------------

Data de nascimento: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_      Sexo: Masculino (    ) Feminino (    )

Telefones para contato: \_\_\_\_\_ *Email:* \_\_\_\_\_

Estado Civil: \_\_\_\_\_ Profissão: \_\_\_\_\_ Setor: \_\_\_\_\_

Turno de trabalho:

Noturno (    ) Diurno (    ) Diurno-Noturno (    ) Horário de \_\_\_\_:\_\_\_\_ até \_\_\_\_:\_\_\_\_

Fixo (    ) Alternante (    ) Há quanto tempo nesse turno?

\_\_\_\_\_

Faz plantões?

Sim (    ) Não (    ) Qual frequência? \_\_\_\_\_ Qual

horário? \_\_\_\_\_

Já trabalho no esquema de turnos antes da atividade atual? Sim (    ) Não (    )

Por quanto tempo? \_\_\_\_\_ Há quanto tempo? \_\_\_\_\_

Escolaridade:

(    ) Ensino médio incompleto

(    ) Superior Incompleto

(    ) Ensino médio completo

(    ) Superior Completo

(    ) Curso técnico incompleto

(    ) Pós-graduação incompleto

(    ) Curso técnico completo

(    ) Pós-graduação completo

Com que frequência você consulta seu médico? 3 meses (    ) 6 meses (    ) anualmente (    )

Raramente (    )

Necessitou de internação hospitalar no último ano? (    ) Não (    ) Sim, qual motivo: \_\_\_\_\_

Se afastou ou faltou trabalho por motivo de saúde no último ano? \_\_\_\_\_

Como classificaria seu estado de saúde:

Excelente (    ) Bom (    ) Regular (    ) Ruim ( ) Não sabe (    )

Assinale um X se tem algum dos problemas de saúde listados abaixo:

(    ) Diabetes.

Usa medicamento ( ) Sim ( ) Não, está controlado? ( ) Sim ( ) Não ( ) mais ou menos

(    ) Pressão Alta.

Faz ou já fez tratamento: ( ) Sim ( ) Não, está controlado? ( ) Sim ( ) Não ( ) mais ou menos

(    ) Problemas Cardíacos (incluindo infarto ou derrame)

Faz ou já fez tratamento: ( ) Sim ( ) Não, está controlado? ( ) Sim ( ) Não ( ) mais ou menos

(    ) Doenças Pulmonares (Asma, Bronquite, etc)

Faz ou já fez tratamento: ( ) Sim ( ) Não, está controlado? ( ) Sim ( ) Não ( ) mais ou menos  
( ) Colesterol Alto

Faz ou já fez tratamento: ( ) Sim ( ) Não, está controlado? ( ) Sim ( ) Não ( ) mais ou menos  
( ) Triglicerídeos alto

Faz ou já fez tratamento: ( ) Sim ( ) Não, está controlado? ( ) Sim ( ) Não ( ) mais ou menos  
Outras? \_\_\_\_\_

Faz uso de algum medicamento? Qual? \_\_\_\_\_

### Antecedentes familiares

Paternos: ( ) Obesidade ( ) HAS ( ) DM2 ( ) DCV ( ) Câncer ( ) Outros:

Maternos: ( ) Obesidade ( ) HAS ( ) DM2 ( ) DCV ( ) Câncer ( ) Outros:

### Hábitos de vida

Consumo de tabaco ( ) Sim ( ) Não N° de cigarros: \_\_\_\_\_ ( ) dia ( ) semana ( ) mês

Consumo de bebidas alcoólicas ( ) Sim ( ) Não

Tipo de bebida mais frequentemente consumida: ( ) cerveja ( ) destilada ( ) vinho

Quantidade: \_\_\_\_\_ Lata(s) ( ) Dose(s) ( ) Garrafa(s) ( )

Frequência: ( ) dia ( ) semana ( ) mês

Atividade Física ( ) Sim ( ) Não Há quanto tempo? \_\_\_\_\_ Tipo: ( )

Musculação ( ) Aeróbio Tempo de cada sessão: \_\_\_\_\_ Frequências: \_\_\_\_\_  
semana

### Hábitos de sono

A que horas normalmente você vai dormir durante a semana? \_\_\_\_\_:\_\_\_\_\_ horas

Quanto tempo você leva para dormir a noite durante a semana? \_\_\_\_\_ minutos.

A que horas normalmente você acorda durante a semana? \_\_\_\_\_:\_\_\_\_\_ horas

Você acorda com auxílio de um despertador ou de alguém durante a semana? ( ) sim ( ) não

A que horas normalmente você vai dormir nos dias livres (fins de semana ou folga)?  
\_\_\_\_\_:\_\_\_\_\_ horas

Quanto tempo você leva para dormir a noite nos dias livres (fins de semana ou folga)? \_\_\_\_\_  
minutos.

A que horas normalmente você acorda nos dias livres (fins de semana ou folga)? \_\_\_\_\_:\_\_\_\_\_ horas

Você acorda com auxílio de um despertador ou de alguém nos dias livres (fins de semana/ folga)?

( ) sim ( ) não



Quanto tempo você gostaria de dormir a noite? \_\_\_\_\_ horas \_\_\_\_\_ minutos.

Como você considera a qualidade do seu sono de 0 a 10?

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Muito ruim \_\_\_\_\_ Muito Boa

Uso de medicamento para dormir ou antidepressivos? ( ) Sim ( ) Não

Quais:

1) \_\_\_\_\_ Freq: \_\_\_\_\_ x D S M Consome há \_\_\_\_\_ A M Dose: \_\_\_\_\_ g mg

2) \_\_\_\_\_ Freq: \_\_\_\_\_ x D S M Consome há \_\_\_\_\_ A M Dose: \_\_\_\_\_ g mg

3) \_\_\_\_\_ Freq: \_\_\_\_\_ x D S M Consome há \_\_\_\_\_ A M Dose: \_\_\_\_\_ g mg

4) \_\_\_\_\_ Freq: \_\_\_\_\_ x D S M Consome há \_\_\_\_\_ A M Dose: \_\_\_\_\_ g mg

5) \_\_\_\_\_ Freq: \_\_\_\_\_ x D S M Consome há \_\_\_\_\_ A M Dose: \_\_\_\_\_ g mg

D: Diária; S: Semanal; M: Mensal. A: Anos. M: Meses.

### História dietética

Mudança de hábitos alimentares após iniciar suas atividades profissionais neste turno de trabalho?

Sim ( ) Não ( )

( ) Come mais

( ) Tem menos fome

( ) Come menos

( ) Melhorou a qualidade

( ) Tem mais fome

( ) Piorou a qualidade

Na sua opinião foi para: Melhor ( ) Pior ( ) Indiferente ( )

Consome bebidas (alimento) com cafeína? ( ) Sim ( ) Não

Tipo de bebida:

Café ( ) Chocolate ( ) Refrigerante a base de cola ( ) Energéticos ( ) Chás ( )

Frequência: Dia ( ) Semana ( ) Quantidade: \_\_\_\_\_

### Avaliação Antropométrica:

Após mudar o trabalho para este turno, você:

( ) Ganhou peso Quantos? \_\_\_\_\_ ( ) Perdeu peso Quantos? \_\_\_\_\_

( ) Manteve o peso

<b>Data</b>				
<b>Peso (kg)</b>				
<b>Estatura (m)</b>				
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>				
<b>CC (cm)</b>				

### ESCALA DE SONOLENCIA DE EPWORTH

Para preenchimento da equipe executora: Código do voluntário: \_\_\_\_\_

Qual a probabilidade de você “cochilar” ou adormecer nas situações apresentadas a seguir? Procure separar da condição de se sentir simplesmente cansado (a). Responda pensando no seu modo de vida nas últimas semanas. Mesmo que você não tenha passado por alguma dessas situações recentemente, tente avaliar como se portaria frente a elas.

Utilize a escala apresentada a seguir para escolher o número mais apropriado para cada situação.

- 0 – Nenhuma chance de cochilar
- 1 – Pequena chance de cochilar
- 2 – Moderada chance de cochilar
- 3 – Alta chance de cochilar Sentado e lendo.

Sentado e lendo.	
Vendo televisão.	
Sentado em lugar publico sem atividades (sala de espera, cinema, teatro, reunião).	
Como passageiro de carro, ônibus, trem, andando uma hora sem parar.	
Deitado para descansar à tarde, quando as circunstancias permitem.	
Sentado e conversando com alguém.	
Sentado calmamente, apos o almoço, sem álcool.	
No carro parado por alguns minutos durante o trânsito.	

---

Obrigado! Sua participação é muito importante para nós!