Giovane Carreira Improta

Sincronização por fotoperíodos naturais e artificiais, de verão e de inverno, em roedores subterrâneos (*Ctenomys* aff. *knighti*)

Synchronization by artificial and natural, summer and winter photoperiods, in subterranean rodents (*Ctenomys* aff. *knighti*)

São Paulo
2021

VERSÃO CORRIGIDA

Giovane Carreira Improta

Sincronização por fotoperíodos naturais e artificiais, de verão e de inverno, em roedores subterrâneos (*Ctenomys* aff. *knighti*)

Synchronization by artificial and natural, summer and winter photoperiods, in subterranean rodents (*Ctenomys* aff. *knighti*)

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Mestre em Ciências, na Área de Fisiologia Geral.

Orientadoras: Gisele Akemi Oda
Verónica S. Valentinuzzi

São Paulo
2021

RESUMO

A sintonia dos organismos com o ambiente, por meio da sincronização dos ritmos biológicos endógenos e os ciclos ambientais conferiu uma grande vantagem seletiva aos seres vivos. Ciclos ambientais terrestres, como o de claro/escuro (CE) diário e o de variação fotoperiódica (razão entre duração dia/noite) anual, sincronizam ritmos endógenos com períodos em torno de 24h e 1 ano, respectivamente. Pouco se sabe sobre a existência de ritmicidade anual e de fotoperiodismo em organismos que vivem em ambientes fóticos extremos, como cavernas, túneis subterrâneos e regiões abissais. Nosso grupo tem realizado estudos cronobiológicos em uma espécie de roedor subterrâneo endêmico da América do Sul (*Ctenomys aff. knighti*) conhecido como tuco-tuco. Estes roedores apresentam ritmos diários de atividade locomotora, temperatura corporal e consumo de oxigênio, sendo esses ritmos sincronizados por ciclos de claro/escuro, tanto em campo como em laboratório. Trabalhos anteriores de nosso grupo têm sugerido a existência de sazonalidade nos padrões diários dos ritmos de atividade, em registros realizados em laboratório e em arenas seminaturais. Este projeto teve como objetivo testar a hipótese de que os tuco-tucos, mesmo sendo subterrâneos e se expondo diariamente à luz em horários irregulares, na natureza, possuem capacidade de processar a informação fotoperiódica, ou seja, as durações da fotofase/escotofase, em condições de laboratório. Para tal, verificamos os diferentes padrões de sincronização dos ritmos diários de atividade em animais expostos a fotoperíodos artificiais diferentes (fotofase longa: CE 21:3, CE 18:6 CE 15:9; fotofase curta: CE 9:15, CE 6:18 e CE 3:21), a dinâmica dos transientes e os pós-efeitos dessa sincronização. Os animais experimentais foram, adicionalmente, agrupados entre aqueles que estavam previamente expostos a fotoperíodos naturais de verão ou inverno e submetidos novamente a fotoperíodos artificiais de verão ou inverno, respectivamente (subgrupos afins) ou a fotoperíodos opostos de inverno ou de verão, respectivamente (subgrupos opostos). Dois parâmetros do ritmo diário de atividade em roda caracterizam o padrão de sincronização, para cada condição fotoperiódica: a duração da atividade diária e a relação de fase entre o início da atividade diária e o apagar das luzes do ciclo claro/escuro. Os diferentes padrões de sincronização fótica do ritmo diário de atividade apresentados por tuco-tucos em diferentes fotoperíodos indicam claramente que eles possuem capacidade de medição fotoperiódica, da mesma forma que roedores epígeos.

Palavras-chave: cronobiologia, sincronização, fotoperiodismo, roedores subterrâneos, pós-efeitos.

ABSTRACT

The fine tuning of organisms with their environment, through synchronization of endogenous biological rhythms and environmental cycles conferred a great selective advantage to living beings. Terrestrial environmental cycles, such as the daily light/dark (CE) and the annual photoperiodic variation (ratio between day/night duration), synchronize endogenous rhythms with periods of around 24h and 1 year, respectively. Little is known about the existence of annual rhythmicity and photoperiodism in organisms that live in extreme photic environments, such as caves, underground tunnels and abyssal regions. Our group has carried out chronobiological studies on a species of subterranean rodent, endemic to South America, (*Ctenomys* aff. *knighti*) known as tuco-tucos. These rodents express daily rhythms of locomotor activity, body temperature and oxygen consumption that are synchronized by light/dark cycles, both in the field and in the laboratory. Previous work by our group has suggested the existence of seasonality in the daily patterns of activity rhythms, in records made in the laboratory and in semi-natural arenas. The present project aimed to test the hypothesis that despite the fact that in nature tuco-tucos are subterranean and are exposed to light at irregular times, in the lab they have the capacity to process photoperiodic information (photophase/scotophase durations). To this end, we verified the different synchronization patterns of daily activity rhythms in animals exposed to different artificial photoperiods (long photophase: CE 21: 3, CE 18: 6 CE 15: 9; short photophase: CE 9:15, CE 6: 18, CE 3:21), the dynamics of the transients and the aftereffects of this synchronization. Assayed animals were additionally subgrouped among those that were previously exposed to natural photoperiods of summer or winter and subjected again to artificial photoperiods of summer or winter, respectively (matching subgroups) or to opposite photoperiods of winter or summer, respectively (mismatching subgroups). Two parameters of the daily wheel activity rhythms characterized the synchronization pattern for each photoperiodic condition: the duration of the active phase and the phase relationship between activity onset and lights-off (of the light/dark cycle). The different patterns of photic synchronization of the daily activity rhythm presented by tuco-tucos in different photoperiods clearly indicate that they have photoperiodic measurement capacity, in the same way as epigeous rodents.

Keywords: chronobiology, synchronization, photoperiodism, subterranean rodents, aftereffects.

INTRODUÇÃO GERAL

Este trabalho faz parte do estudo cronobiológico, em campo e em laboratório, de roedores subterrâneos da espécie *Ctenomys aff. knighti*, os tuco-tucos. O grupo de estudo teve início em 2008 em uma colaboração entre o laboratório da Profa. Dra. Gisele Oda (Departamento de Fisiologia, IB - USP) e da Dra. Veronica Valentinuzzi, do *Centro Regional de Investigaciones Científicas y Transferencia Tecnológica* (CRILAR), unidade executora do *Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas* (CONICET) do Governo Argentino, localizado em Anillaco, La Rioja. No decorrer desses 12 anos de colaboração bastante frutífera, emergiu o *Laboratório de Cronobiologia Binacional* (Brasil-Argentina).

Iniciei minha participação nesse projeto, em etapas preliminares, em julho de 2015, e concluí minha iniciação científica em 2017 (2016/25968-6/ FAPESP). Meu mestrado teve início em março de 2018, com aprovação no exame de qualificação em outubro de 2019.

Esta dissertação compila os principais achados e discussões do trabalho, contendo um artigo já publicado na revista *Sleep Science* em 2020, seguido de um manuscrito ainda a ser submetido a uma revista da área.

1.1 Ritmos Biológicos

A vida no planeta Terra está sujeita à influência de diversos ciclos regulares ambientais como o ciclo claro/escuro, das marés e das estações do ano. Dentre os ritmos biológicos, os mais estudados são os diários, que apresentam períodos de 24h, encontrados em praticamente todos os organismos conhecidos, incluindo formas de vida unicelulares. Em organismos pluricelulares, a ritmicidade diária pode ser observada desde o comportamento e em variáveis sistêmicas, o nível celular, em atividades de transcrição e tradução de genes e o nível molecular. Um sistema biológico de temporização permite antecipar desafios previsíveis do ambiente, assim como, coordenar eventos internos, otimizando processos e funções fisiológicas.

Ritmos com períodos diferentes de um dia (24h) também são estudados, sendo conhecidos como ultradianos quando seu período é inferior à duração de um dia ($\tau < 24h$), e infradianos no caso dos ritmos com período superior a duração de um dia ($\tau > 24h$), como é o caso dos ciclos circalunares (período em livre curso com duração próxima à do ciclo lunar) e circanuais (período em livre curso de aproximadamente 365 dias). A organização temporal biológica é baseada na existência de ritmos biológicos fisiológicos e comportamentais endógenos sincronizados pelos ciclos ambientais (Pittendrigh, 1961).

1.1.1. Propriedades dos ritmos biológicos

A expressão de ritmos biológicos é inata e possui mecanismos que asseguram sua robustez. Para detectar se um componente rítmico é gerado internamente, ou se é uma resposta direta do organismo a um ciclo ambiental, deve-se isolar o animal dos ciclos ambientais, verificando sua endogenicidade.

Na persistência de um ritmo biológico na ausência de ciclos externos, dizemos que esse ritmo está na condição de **livre curso**, e que é gerada por um **oscilador biológico**. O período intrínseco do oscilador (τ , tau), expresso em condições constantes, é diferente, mas próximo,

do período do ciclo ambiental (T). Quando os organismos são mantidos em condições constantes, a maioria dos ritmos diários persiste com período de “cerca de um dia”, sendo chamados de **ritmos circadianos**.

As estruturas responsáveis pela geração e regulação dos ritmos circadianos endógenos são chamadas de **osciladores circadianos** (Dunlap *et al.*, 2004) e, em mamíferos, eles estão localizados anatomicamente nos núcleos supraquiasmáticos do hipotálamo (Moore, 1983). As descobertas dos mecanismos moleculares que controlam os ritmos circadianos renderam o Prêmio *Nobel* de Fisiologia ou Medicina para Jeffrey C. Hall, Michael Rosbash e Michael W. Young em 2017, e impulsionaram os estudos das propriedades primordiais desses ritmos na área.

Os osciladores circadianos são **sincronizados** pelos ciclos ambientais diários, sendo o principal sincronizador o ciclo de claro/escuro da Terra. Este fenômeno é primordial para a função adaptativa da organização temporal biológica (Enright, 1970). Um ritmo endógeno dissociado no tempo em relação aos ciclos ambientais não possibilitaria a antecipação temporal correta para eventos externos regulares e não permitiria que populações inteiras estivessem em sincronia em eventos como a reprodução.

1.1.2. Ritmo diário de atividade/repouso

Os animais apresentam ritmicidade na alternância entre momentos de atividade e momentos de repouso ao longo do dia. O ritmo diário de atividade/repouso é especialmente intrigante, pois estar ativo em um determinado horário do dia ou da noite tem um enorme significado ecológico, (Hale & Stenseth, 2012; Tomotani & Oda, 2012). As implicações ecológicas do ritmo de atividade são tão relevantes que, antes mesmo da Cronobiologia existir como área formal de estudo, já era comum classificar animais entre “diurnos” e “noturnos” em investigações de história natural de acordo com a fase em que se mostravam presentes no ambiente ou observados em atividade. Adaptações e exaptações que possibilitaram a ocupação de determinados nichos temporais se evidenciam em aspectos fenotípicos, comportamentais e, de forma especialmente notável, na fisiologia sensorial.

Além de sua relevância, o ritmo de atividade e repouso ganha destaque pois é um dos mais conspícuos em estudos observacionais e, em laboratório, o registro desta variável rítmica pode ser facilmente automatizado com soluções como a roda de atividade. O emprego de rodas de atividade vem se mostrando frequente e consolidado em diversas áreas de pesquisa, havendo registro de um estudo em que Colin C. Stewart já utilizava experimentalmente o recurso em 1898 (Dominguez *et al.*, 2002).

Para a representação gráfica do registro de um ritmo de atividade é utilizado um gráfico chamado actograma (Figura 1). Nos actogramas, os dias estão, sequencialmente, indicados nas ordenadas e cada uma das linhas das abscissas representa 24h. Por motivos práticos, para facilitar a visualização de fenômenos que se iniciam em um dia e se encerram no dia seguinte (como a atividade de animais noturnos), os actogramas costumeiramente representam dois dias em tandem (o chamado “*doubleplot*”), totalizando 48h de registro por linha.

Figura 1. Actograma representando o ritmo diário de atividade/repouso de um tuco-tuco (*Ctenomys aff. knighti*) em roda de atividade: Cada uma das linhas horizontais representa dois dias consecutivos de registro (*doubleplot*), ao longo das 48h deste conjunto, indicado no eixo das abcissas. O fundo em cinza indica momentos em que a luz estava apagada, enquanto o fundo em branco marca a fase em que estavam acesas. Os traços pretos indicam a atividade daquele animal, sendo cada um resultante de um pequeno histograma que representa 5 minutos de registro da atividade em roda (contado em número de revoluções do eixo). A barra preto-e-branco acima do actograma indica o regime do ciclo CE (claro/escuro) 6:18 (6 horas de claro, e 18 horas de escuro, totalizando um período de 24h). Actograma referente aos primeiros 18 dias do animal #278, fêmea capturada no inverno de 2018.

Ao observar a *Figura 1*, podemos notar que a atividade do indivíduo experimental ocorre sempre na fase de escuro do ciclo de iluminação diário, estando, portanto, sincronizado por esse regime de claro/escuro. A barra preto-e-branco acima do actograma indica o regime de iluminação, o qual é denotado como ciclo CE (claro/escuro) 6:18 (6 horas de claro, e 18 horas de escuro, totalizando um período de 24h). A proporção entre a duração das fases de claro e de escuro (6:18 nesse exemplo) é chamado de **fotoperíodo**.

1.1.3. Sincronização dos ritmos circadianos

O processo de sincronização no qual um ciclo externo ajusta o período (e fase) de um oscilador e se estabelece uma **relação de fase** (*i.e.*, estabelecimento de um intervalo de tempo fixo entre duas oscilações) fixa entre o ciclo e o oscilador é chamado de **arrastamento** (em inglês, *entrainment*). Nem todo ciclo ambiental regular promove o arrastamento dos osciladores endógenos, sendo dado o nome de **zeitgeber** (do alemão “zeit” - tempo e “geber” - doador) aos ciclos ambientais com essa propriedade. Dessa forma, podemos dizer que o ciclo claro/escuro é o principal **zeitgeber** dos ritmos circadianos.

A atividade de um animal, quando esta apresenta um padrão rítmico diário, possui uma “duração da atividade” (representada pela letra grega α (alfa) que é definida pelo intervalo entre o início (*onset*) e término (*offset*) da atividade, definida a cada dia (*Figura 2*).

Parte dos termos de Cronobiologia contidos nesta seção estão resumidos de maneira simplificada no actograma esquemático presente na *Figura 2*.

Figura 2. Actograma esquemático: Assim como no actograma da Figura 1, as linhas marcadas em preto representam esquematicamente blocos de atividade. O fundo cinza indica escuridão e as partes em branco a fase com a luz acesa. Note que após o décimo dia, o regime passou de CE 12:12 para escuro constante, como se pode notar pelo fundo cinza. Os símbolos coloridos representam: círculos azuis, *activity onset* (início da atividade); círculos verdes, *activity offset* (término da atividade); α (alfa), em vermelho, a duração da atividade; pós-efeitos da sincronização anterior, em amarelo (no exemplo da figura, o pós-efeito é bastante curto); e, ao fim, em roxo, uma seção em que se visualiza a condição de *livre curso*, com τ diferente, mas próximo de 24h. A barra acima do actograma se refere ao regime luminoso do ciclo CE (claro/escuro) 12:12 (12 horas de claro, e 12 horas de escuro, totalizando um período de 24h). Figura adaptada de Tomotani & Oda, 2012.

Ao transferirmos um organismo de uma condição cíclica para uma condição constante, os ritmos mantêm os mesmos padrões da etapa sincronizada anterior (τ , α e fase) por vários dias, antes da manifestação do ritmo em livre curso, os chamados **pós-efeitos** (em inglês, “*aftereffects*”). Na figura 2, nos dois dias que se seguem após o fim do regime CE 12:12, no dia 10, podemos notar que, mesmo no escuro constante, tanto a fase de expressão da atividade, quanto seu período (24h) e a duração do bloco de atividade (α), se mantiveram com as mesmas características que tinham durante a etapa que o ritmo estava arrastado ao regime CE. Os pós-efeitos podem durar de 1-2 dias até várias semanas (Pittendrigh & Dann 1976).

Outro estado provisório, com duração na ordem de 1 a 7 dias que é observado na transição entre dois ciclos diferentes, são os denominados **transientes** (Pittendrigh & Daan 1976). Dentre as propriedades diferentes que os ciclos podem ter, estão por exemplo, a fase, período, fotoperíodo ou natureza dos ciclos (e.g., mudança de fotoperíodo natural para fotoperíodo artificial).

Figura 3. Actogramas contendo o registro de atividade de tuco-tucos (*Ctenomys aff. knighti*) sob os regimes artificiais de iluminação CE 12:12 (A - cinza) e CE 15:9 (B – amarelo). Indicações de horário da transição da fase de claro para a fase de escuro (“lights-off”) e da localização da duração da atividade (α) entre as linhas pontilhadas. Os círculos coloridos representam a média do horário de início da atividade (“onset”), calculada para comparações da relação de fase, assim como feito por DeCoursey (1972). Os actogramas foram plotados a partir do início da fotofase artificial em ambos os casos, sendo assim, os horários dos eventos não são mutuamente comparáveis, apenas a relação de fase.

Ao manipularmos o fotoperíodo do ciclo claro/escuro artificial, aumentando a duração da fase de claro e diminuindo a de escuro, por exemplo (Figura 3), observamos modificações na fase do *onset* e *offset* da atividade e, conseqüentemente, a duração diária de atividade α . A variação do fotoperíodo dentro das 24h do dia é um processo que também ocorre naturalmente. Ao modificar a duração da fase de claro e de escuro estamos simulando a variação da duração do dia, que ocorre na natureza ao longo das estações do ano.

Em um possível protocolo envolvendo os animais presentes na figura 3 sendo submetidos ao escuro constante, seria esperado que tanto a fase de atividade, quanto a duração da atividade e o período fossem preservados nos primeiros dias após o fim do regime CE, mesmo os animais estando em condições constantes, por conta dos pós-efeitos da sincronização aos ciclos CE diferentes.

Figura 4. Actograma contendo a atividade sob dois fotoperíodos diferentes CE 1:23 e CE 18:6 e a manifestação dos pós-efeitos sob EE(escuro constante). Indicações do horário em que as luzes estavam acesas nas caixas brancas que flanqueiam a atividade. Nessa figura é possível verificar as diferenças nos padrões de atividade dos pós-efeitos (α e τ) da sincronização a diferentes fotoperíodos. Figura adaptada de Pittendrigh, 1974.

A figura 4 ilustra um dos resultados possíveis em um protocolo que expõe indivíduos a regimes com diferentes fotoperíodos (mas com o período fixo em 24h). Do dia 1 ao 50, o ritmo do animal foi arrastado pelo regime CE 1:23, estabelecendo ângulo de fase fixo com a fase de apagar das luzes. Ao liberar o animal em escuro constante, notam-se os pós-efeitos. Por volta do dia 100, o animal é exposto a um novo ciclo CE, desta vez com a proporção 18:6. O bloco de atividade se comprime (diminui α), o período se ajusta e volta a ser de 24h, e uma nova relação de fase fixa é estabelecida com o ciclo CE. Após a liberação em escuro constante, tudo ocorre de maneira bem semelhante ao primeiro bloco do experimento, porém agora com um novo τ menor do que o expresso após fotoperíodo CE 1:23 e α mais curto. Os diferentes τ e α expressos em EE constituem os pós-efeitos do arrastamento a ciclos de mesmo período (24h) porém de diferentes fotoperíodos (CE 1:23 e CE 6:18). Se cada um dos regimes de EE tivesse duração maior da ordem de meses, teríamos ao final de cada condição constante um ritmo em livre-curso com as mesmas propriedades (alfa e tau), uma vez que os pós-efeitos podem ser muito duradouros, dependendo da espécie e da quantidade de ciclos (Pittendrigh & Daan, 1976).

1.1.4. Variação Anual do Fotoperíodo

Apesar da grande fidedignidade do ciclo natural diário de claro/escuro gerado pelo movimento de rotação da Terra em torno do seu eixo, o fotoperíodo definido como a razão entre as duas fases desse ciclo, a fotofase (fase de claro – “dia”) e escotofase (fase de escuro – “noite”) não é a mesma durante o ano todo. Os fotoperíodos anuais extremos são os solstícios, sendo que nos dias de verão (dias longos - DL) a fotofase (fase de claro) é mais longa, enquanto no inverno (dias curtos - DC) a fase mais longa é a escotofase (fase de escuro). Essa variação

anual no fotoperíodo é devido ao movimento de translação e à inclinação do eixo de rotação da Terra em relação ao eixo da órbita em torno do Sol, sendo, portanto, mais acentuada, quanto maior a latitude.

Assim como o ciclo diário claro/escuro sincroniza os ritmos biológicos circadianos, a variação anual do fotoperíodo é o sincronizador de maior importância para diversos ritmos anuais, resultando na sazonalidade de diversos aspectos da fisiologia e do comportamento (Gwinner & Helm, 2003).

1.2. Investigação do fotoperiodismo em um roedor subterrâneo: o tuco-tuco

1.2.1. O modelo animal

O organismo modelo de nosso laboratório é o tuco-tuco (Ordem: Rodentia), que pertence ao gênero *Ctenomys*, o único gênero ainda vivente dentro da família Ctenomyidae, descrita pelo naturalista René Lesson em 1842. A taxa de especiação do gênero é considerada alta, dada riqueza de espécies (aproximadamente 60 espécies atuais – *i.e.*, não extintas - reconhecidas) desde seu surgimento no final do Plioceno (Parada *et al.*, 2011). O nome popular desses animais é originado da onomatopeia tupi “*tukutúku*” (TUCO-TUCO, 2018), provavelmente fazendo alusão à vocalização característica feita por esses animais, ouvida até quando eles estão sob o solo. O hábito de vida escavador permite que estes animais solitários não estejam expostos a ciclos ambientais em sua plenitude, tendo no subterrâneo condições tamponadas de temperatura e umidade (Oliveira & Bonvicino, 2006; Busch *et al.*, 2000).

Figura 5. Um exemplar de tuco-tuco da região onde são conduzidos nossos estudos (Anillaco, La Rioja - Argentina). A foto foi tirada logo após a captura (inverno de 2016), sendo possível ver ao fundo a terra que estava dentro na armadilha antes da transferência para um aquário provisório.

Assim como outros animais subterrâneos, os tuco-tucos apresentam adaptações morfológicas relacionadas à escavação e à vida no subsolo: orelhas reduzidas, garras e membros anteriores bem desenvolvidos, caudas sensíveis e uma franja característica com pelos curtos e rígidos circundando as patas posteriores (Oliveira & Bonvicino, 2006). Possuem, no

entanto, olhos relativamente grandes, ao compará-los com outros roedores subterrâneos (Pearson, 1984).

Além da importância intrínseca do estudo da fauna neotropical, os hábitos de vida subterrâneos dos tuco-tucos representam uma peculiaridade bastante interessante para estudos cronobiológicos.

1.2.2. Indicações preliminares de sazonalidade e fotoperiodismo em *Ctenomys aff. knighti*

Nosso grupo verificou que os tuco-tucos apresentam ritmos circadianos de atividade locomotora (Valentinuzzi *et al.*, 2009), temperatura corporal (Tachinardi *et al.*, 2014) e consumo de oxigênio, sincronizáveis por ciclos claro/escuro (Tachinardi *et al.*, 2015), com valores mais altos durante a fase de escuro. Em campo, o padrão de exposição diário à luz solar é pontuado por episódios como o forrageio e retirada de terra de seus túneis (Tomotani *et al.*, 2012) suficientes para manter a sincronização diária (Flores *et al.*, 2013, 2016).

Em minha iniciação científica, verificamos que os tuco-tucos, mesmo sendo subterrâneos e se expondo diariamente à luz em horários irregulares, alteram padrões de atividade em roda (como α), durante os pós-efeitos medidos em laboratório sob escuro constante (EE). A diferença dos padrões de atividade entre animais capturados no verão e capturados no inverno é evidente. Muito possivelmente esta diferença está associada à mudança do fotoperíodo ao longo das estações, já que, na natureza, o animal estava exposto à esse ciclo antes de ser transferido para o laboratório. Tal diferença não pode ser explicado pelo efeito direto da luz (*i.e.*, mascaramento), pois quando o animal está em escuro constante, não há efeito agudo da luz. No entanto, essas diferenças ainda podem ser devidas a outros fatores ambientais que variam sazonalmente.

Figura 6. Actogramas representativos da atividade de tuco-tucos capturados na natureza e mantidos em escuro constante. Os animais do enquadramento laranja foram capturados no verão, enquanto os do enquadramento azul, no inverno. A duração da atividade (α) é indicada em laranja e azul para os animais capturados, respectivamente, durante o verão (dias longos) e o inverno (dias curtos). A barra acima do actograma indica o fotoperíodo natural aproximado na ocasião da captura, com dias mais longos no verão e mais curtos no inverno. Note que os actogramas estão em *doubleplot*.

Na natureza, os seres vivos estão expostos a **sazonalidade das variáveis ambientais de forma integrada**. Embora, primordialmente, apenas o fotoperíodo seja uma pista ambiental confiável o suficiente para ser usada como “calendário ambiental”, medidas ambientais podem sofrer influência de outras variáveis, sendo difícil delimitar com precisão qual foi o efeito do **fotoperiodismo** (programação biótica baseada na variação anual de fotoperíodo), e quais são decorrentes de respostas diretas a mudanças sazonais na temperatura, umidade, disponibilidade de alimento *etc.* (Bradshaw & Holzapfel, 2007). Na tentativa de isolar essas duas fontes de respostas bióticas, uma das abordagens mais recomendadas é a manipulação de apenas uma variável (no caso, o fotoperíodo) enquanto as outras variáveis são mantidas constantes em condições de laboratório. Apesar do nosso organismo modelo não estar exposto de forma contínua ao ciclo claro/escuro na natureza e do ambiente subterrâneo possuir particularidades como o “tamponamento” das oscilações térmicas e de umidade, essa distinção ainda é válida.

1.3. Local do estudo

O estudo foi realizado no próprio habitat de *Ctenomys* aff. *knighti*, nas proximidades do CRILAR (*Centro Regional de Investigaciones Científicas y Transferencia Tecnológica*) em La Rioja, Argentina (28°48'S; 66°56'O; altitude: 1,350 m). Durante o Solstício de verão, a duração da fotofase calculada para a região é de aproximadamente 14 horas e 2 minutos, sendo 3 horas e 47 minutos mais longa que a fotofase durante o Solstício de inverno (10 horas e 15 minutos de luz do sol) (www.timeanddate.com), ambos valores considerando apenas a duração do dia solar, sem os respectivos crepúsculos.

Figura 7. Mapa mostrando a localização aproximada de Anillaco, onde se localiza o biotério e onde se realizam as capturas. Podemos notar sua posição em relação aos trópicos (28°48'S; 66°56'O; altitude: 1,350 m) e a proximidade da Cordilheira do Andes. (Maphill <<http://www.maphill.com/argentina/la-rioja/castro-barros/anillaco/>>)

HIPÓTESES E OBJETIVOS GERAIS

Temos, como principais hipóteses:

- I. Os tuco-tucos, apesar de serem roedores subterrâneos, apresentam capacidade de medição fotoperiódica, a ciclos diários de diferentes fotoperíodos, da mesma forma como outros roedores epígeos.
- II. Os pós-efeitos dos animais submetidos a diferentes fotoperíodos irão reter informações da sincronização anterior, aumentando α nos fotoperíodos de fotofase curta, com diminuição em fotofase longa; em τ espera-se um aumento ou diminuição progressiva quanto mais extremo for o fotoperíodo experimental.
- III. Tuco-tucos expostos previamente a fotoperíodos de dias curtos (capturados no inverno) e de dias longos (capturados no verão) apresentam diferentes padrões de sincronização para o mesmo fotoperíodo artificial.

Para testar essas hipóteses, temos como objetivos gerais:

I. Verificar a diferença nos padrões de sincronização da atividade em roda entre animais expostos a diferentes fotoperíodos artificiais de fotofase longa (extrapolando a tendência do verão) e de fotofase curta (extrapolando a tendência do inverno).

Para tal, observamos o padrão de sincronização a ciclos claro/escuro diários completos artificiais, dos quais manipulamos sistematicamente os fotoperíodos. Foram testados os fotoperíodos artificiais CE 21:3, CE 18:6, CE 15:9, CE 9:15, CE 6:18 e CE 3:21. Apesar da acentuada diferença entre fotofase e escotofase, todos os regimes possuem o mesmo período (24h). Ao usar uma ampla de faixa de fotoperíodos artificiais também temos a intenção de testar os limites da sincronização a fotoperíodos extremos de dias curtos e longos. A temperatura foi mantida constante ($24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$) no laboratório em todas as condições, com a finalidade de isolar o componente fótico de uma possível resposta à temperatura.

II. Avaliar as mudanças em α e τ em cada grupo experimental durante os pós-efeitos

Os primeiros dias após o início da condição de escuro constante irão reter informações da sincronização anterior por conta dos pós-efeitos, dentre essas informações, mediremos a duração da atividade (desta vez sem nenhum risco de sofrer mascaramento negativo da luz, uma vez que a condição será de escuro). A inclinação do ângulo de fase de arrastamento permitirá avaliar as mudanças em τ .

III. Comparar os efeitos de cada fotoperíodo artificial em animais expostos previamente a dias curtos (capturados no inverno) e animais expostos previamente a dias longos (capturados no verão).

Assim como observado nos pós-efeitos de animais capturados em estações diferentes, o fotoperíodo promove mudanças de longo prazo na estrutura interna do oscilador circadiano.

Sendo assim, assumimos que o fotoperíodo natural de origem possa influenciar no processamento da informação fotoperiódica artificial.

Os parâmetros rítmicos avaliados são: horário de início da atividade (“*onset*”), número de transientes e período (τ) do ritmo de atividade.

CONCLUSÕES GERAIS

Voltando aos nossos objetivos gerais e hipóteses, expostos antes das seções de artigos, concluímos que os tuco-tucos, em laboratório com alimentação *ad libitum* e temperatura controlada, apresentam diferentes padrões gerais de sincronização quando expostos a fotoperíodos experimentais artificiais. Essas diferenças se assemelham com a tendência observada em α de animais capturados no verão e no inverno (Figura 6) e com o ângulo de fase de arrastamento observado por Elliott (1976) em hamsters.

No estágio de escuro constante do protocolo, verificamos os padrões dos pós-efeitos, e assim como observado por Tackenberg *et al.* (2020), também verificamos tendências gerais na duração da atividade associadas aos diferentes fotoperíodos, mas não encontramos mudanças pronunciadas que poderiam ser explicadas pelos fotoperíodos experimentais nos períodos em livre-curso (τ).

A divisão entre animais expostos previamente a fotoperíodos naturais de verão e de inverno, os chamados subgrupos afim (“*matching*”) e oposto (“*mismatching*”), apresentou diferenças nos padrões de arrastamento apenas em relação aos número de transientes. Os transientes eram mais longos nos animais advindos de fotoperíodos opostos (*mismatching*) submetidos a fotoperíodos artificiais. Diferentemente do nossas hipóteses, a distinção entre esses subgrupos não se mostrou explicativa para diferenças no ângulo de fase de arrastamento (mostrando-se significativa apenas no grupo CE 6:18) e nem nos pós-efeitos nos períodos (que não teve diferença nem dentre os grupos de fotoperíodos experimentais).

Verificamos também que em fotoperíodos com fotofases muito longas, ou muito curtas, há um aumento na variabilidade interindividual do ângulo de fase do arrastamento, expresso no aumento nos desvios das médias observadas para as variáveis quantificadas. O caso se torna ainda mais evidente em fotofases muito longas, em especial CE 21:3, onde o mascaramento foi bastante evidente durante o primeiro estágio experimental (fotoperíodos experimentais), e foram mais proeminentes os casos de animais cujos ritmos não sofreram arrastamento ou que estavam com o ritmo sob coordenação relativa.

Vimos que, apesar de não haver diferenças entre os subgrupos “*matching*” e “*mismatching*” numa magnitude tão grande quanto esperávamos, existem diferenças em certos parâmetros rítmicos e talvez esse efeito seja mais pronunciado entre populações com menos variabilidade interna (diferentes idades, massas corpóreas, sexos). Por esse motivo, sugerimos

atenção ao fotoperíodo vigente em experimentos nos quais grupos animais são submetidos a diversos fotoperíodos artificiais simultaneamente.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Quando conduzimos estudos em laboratório com animais selvagens, que dependem de capturas e da disponibilidade natural em campo, não conseguimos padronizar algumas das possíveis fontes de variação nos padrões rítmicos (por exemplo, idade, massa corpórea, linhagem genética, história de vida *etc.*). Ao desenhar nosso protocolo, cientes desta limitação, tentamos manter ao máximo o equilíbrio dessas possíveis fontes de variação dentro dos grupos experimentais, suavizando assim qualquer efeito direcionado que alguma particularidade individual poderia causar nas análises, dado que o montante de nosso n experimental não é tão expressivo quanto os dos estudos em camundongos e animais reproduzidos em cativeiro com facilidade. Por conta desta mesma inconsistência inerente das capturas em campo, reafirmamos que vários dos animais foram reutilizados em experimentos nas temporadas seguintes (como pode ser observado no número de identificação nos actogramas).

Os resultados obtidos nos pós-efeitos de animais capturados no verão e no inverno nos guiaram a fazer divisão em subgrupos “afim” e “oposto”, e muitas de nossas análises. Temos a perspectiva de reanalisar esses dados levando outras particularidades como critério na criação de subgrupos contidos dentro dos grupos com fotoperíodos experimentais diferentes. Atualmente, o Laboratório de Cronobiologia Binacional Argentina-Brasil está empenhado em um esforço conjunto para compilar, em nossa base de dados, os registros de quase 350 animais que passaram pelo laboratório e mais algumas dezenas de dados de vida livre. A sistematização dos animais possibilitará metanálises mais robustas integrando dados de diferentes anos e agrupando animais por suas particularidades individuais.

Dentre os possíveis subgrupos que poderíamos delimitar, analisamos as diferenças entre animais recém capturados e os já mantidos em cativeiro. Essa rápida análise está contida na seção de suplementos (seção S3) desta dissertação, e não apresentou diferenças significativas entre os grupos.

Procurando manter a transparência e a ética no uso de animais, esclarecemos que o protocolo foi realizado em 59 animais, totalizando 74 registros (totais ou parciais), e que foram realizadas 29 capturas novas voltadas a este projeto.

Nosso protocolo utilizou fotoperíodos completos ao invés de fotoperíodos “esqueleto”, nos quais diferentes fotoperíodos são representados por ciclos com dois pulsos diários de luz, variando o intervalo de tempo entre os dois pulsos (Spoelstra *et al.*, 2014). Essa distinção influi, a princípio, na maior ocorrência de eventos de mascaramento durante a fase de claro, mas é a

que acreditamos ser adequada em um primeiro estudo sistemático envolvendo fotoperíodos artificiais em tuco-tucos, uma vez que não tínhamos perspectivas da magnitude das respostas, ou até mesmo em sua ocorrência. Uma vez com essas respostas já observadas e documentadas, protocolos derivados com o uso de fotoperíodos esqueletos podem inclusive verificar as diferenças entre o arrastamento à fotoperíodos completos e fotoperíodos esqueleto, uma vez que, assim como muitos dos modelos biológicos, as visões geralmente são complementares, e não excludentes.

Dados do estado reprodutivo (massa testicular) de machos, que morreram durante ou logo pouco dias após a exposição aos fotoperíodos experimentais, foram coletados e integrarão parte de um estudo sistemático focado em ritmos reprodutivos anuais de tuco-tucos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRADSHAW, William E.; HOLZAPFEL, Christina M. Evolution of animal photoperiodism. **Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.**, v. 38, p. 1-25, 2007.

BUSCH, Cristina et al. Population ecology of subterranean rodents. **Life underground: the biology of subterranean rodents**, p. 183-226, 2000.

DECOURSEY, Patricia J. LD ratios and the entrainment of circadian activity in a nocturnal and a diurnal rodent. **Journal of comparative physiology**, v. 78, n. 3, p. 221-235, 1972.

DOMÍNGUEZ, María Teresa Gutiérrez et al. La rueda de actividad en psicología experimental: Evolución histórica. **Revista de historia de la psicología**, v. 23, n. 3, p. 401-408, 2002.

DUNLAP, Jay C.; LOROS, Jennifer J.; DECOURSEY, Patricia J. **Chronobiology: biological timekeeping**. Sinauer Associates, 2004.

ELLIOTT, J. A. Circadian rhythms and photoperiodic time measurement in mammals. In: **Federation proceedings**. 1976. p. 2339-2346.

ENRIGHT, J. T. Ecological aspects of endogenous rhythmicity. **Annual review of ecology and systematics**, v. 1, n. 1, p. 221-238, 1970.

FLÔRES, Danilo EFL et al. Modeling natural photic entrainment in a subterranean rodent (*Ctenomys aff. knighti*), the tuco-tuco. **PloS one**, v. 8, n. 7, p. e68243, 2013.

FLÔRES, Danilo EFL et al. Entrainment of circadian rhythms to irregular light/dark cycles: a subterranean perspective. **Scientific reports**, v. 6, p. 34264, 2016.

GWINNER, Eberhard; HELM, Barbara. Circannual and circadian contributions to the timing of avian migration. In: **Avian migration**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2003. p. 81-95.

HALLE, Stefan; STENSETH, Nils Christian (Ed.). **Activity patterns in small mammals: an ecological approach**. Springer, 2012.

PARADA, Andrés et al. Species groups and the evolutionary diversification of tuco-tucos, genus *Ctenomys* (Rodentia: Ctenomyidae). **Journal of Mammalogy**, v. 92, n. 3, p. 671-682, 2011.

PEARSON, Oliver P. Taxonomy and natural history of some fossorial rodents of Patagonia, southern Argentina. **Journal of Zoology**, v. 202, n. 2, p. 225-237, 1984.

PITTENDRIGH, Colin S. On temporal organization in living systems. **Harvey lectures**, v. 56, n. 93, p. 125, 1961.

PITTENDRIGH, S. C. Circadian oscillations in cells and the circadian organization of multicellular systems. **The neurosciences third study program**, p. 437-458, 1974.

PITTENDRIGH, Colin S.; DAAN, Serge. A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. **Journal of comparative physiology**, v. 106, n. 3, p. 223-252, 1976.

MOORE-EDE, Martin C.; SULZMAN, Frank M.; FULLER, Charles Albert. **The clocks that time us: physiology of the circadian timing system**. Harvard Univ Pr, 1983.

OLIVEIRA, J. A., BONVICINO, C. R., REIS, N. R., PERACCHI, A. L., PEDRO, W. A., & LIMA, I. P. Mamíferos do Brasil. **Mamíferos do Brasil**. 381p. 2006

SPOELSTRA, K.; COMAS, M.; DAAN, S. Compression of daily activity time in mice lacking functional Per or Cry genes. **Chronobiology international**, v. 31, n. 5, p. 645-654, 2014.

TACHINARDI, Patricia et al. Rhythmic 24 h variation of core body temperature and locomotor activity in a subterranean rodent (*Ctenomys aff. knighti*), the tuco-tuco. **PLoS one**, v. 9, n. 1, p. e85674, 2014.

TACHINARDI, Patricia et al. Nocturnal to diurnal switches with spontaneous suppression of wheel-running behavior in a subterranean rodent. **PLoS One**, v. 10, n. 10, p. e0140500, 2015.

TACKENBERG, Michael C.; HUGHEY, Jacob J.; MCMAHON, Douglas G. Distinct components of photoperiodic light are differentially encoded by the mammalian circadian clock. **Journal of Biological Rhythms**, p. 0748730420929217, 2020.

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2017. *Nobelprize.org*. **Nobel Media AB 2014.** Web. Disponível em: <http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2017/>. Acesso em: 15 Mar 2018.

Time and Date AS. **Sunrise and sunset calculator**. Disponível em <https://www.timeanddate.com/sun/>. Acesso em: 29 Jun 2020.

TOMOTANI, Barbara M.; ODA, Gisele A. Diurnos ou Noturnos? Discutindo padrões temporais de atividade. **Revista da Biologia**, 2012.

TOMOTANI, Barbara M. et al. Field and laboratory studies provide insights into the meaning of day-time activity in a subterranean rodent (*Ctenomys aff. knighti*), the tuco-tuco. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e37918, 2012.

TUCO-TUCO. Em: Dicionário Michaelis online. Disponível em: <<http://michaelis.uol.com.br/busca?id=QwVbZ>>. Acesso em: 08 de abril de 2018.

VALENTINUZZI, Verónica Sandra et al. Circadian Pattern of Wheel-Running Activity of a South American Subterranean Rodent (*Ctenomys cf knightii*). **Chronobiology International**, v. 26, n. 1, p. 14-27, 2009.