Danilo Eugênio de França Laurindo Flôres

Sincronização fótica de um roedor subterrâneo:
um estudo cronobiológico de campo e de
laboratório do tuco-tuco (*Ctenomys* cf. *knighti*).

The photic synchronization of a subterranean
rodent: a field/lab chronobiological study of the
tuco-tuco (*Ctenomys* cf. *knighti*).

São Paulo

2011

Danilo Eugênio de França Laurindo Flôres

Sincronização fótica de um roedor subterrâneo:
um estudo cronobiológico de campo e de
laboratório do tuco-tuco (*Ctenomys* cf. *knighti*).

The photic synchronization of a subterranean
rodent: a field/lab chronobiological study of the
tuco-tuco (*Ctenomys* cf. *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.

Orientador(a): Gisele Akemi Oda

São Paulo

2011

Ficha Catalográfica

Flôres, DaniloEugênio de França Laurindo
Sincronização fótica de um roedor
subterrâneo: um estudo cronobiológico de
campo e de laboratório do tuco-tuco
(Ctenomys cf. knighti).

95 páginas

Dissertação (Mestrado) - Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo.
Departamento de Fisiologia Geral.

1. Ciclo claro-escuro
2. Roedor subterrâneo
3. Simulações computacionais

I. Universidade de São Paulo. Instituto de
Biociências. Departamento de Fisiologia
Geral.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr.(a).Gisele Akemi Oda

Orientador(a)

*And then, having had my ration of Sun
and air, I would go back into the dark..*

Neil Gaiman. The goldfish pool and other stories.

In: *Smoke and Mirrors*.

Agradecimentos

- Meus pais, pelo apoio em todos os sentidos, durante esses três anos de Mestrado.
- Gisele Akemi Oda, minha orientadora brasileira, e Verónica Sandra Valentinuzzi, minha orientadora na Argentina (cuja orientação infelizmente não pôde ser oficializada por questões burocráticas).
- Barbara Tomotani e Patricia Tachinardi, colegas de laboratório, que me suportaram durante as longas estadias em Anillaco, e participaram ativamente no planejamento, execução, análise e discussão de todos os experimentos de campo e laboratório.
- Mirian Marques, que, juntamente com minha orientadora Gisele Oda, me introduziu ao mundo da Cronobiologia e me mostrou o que é fazer uma boa ciência.
- José Paliza, que construiu a maior parte dos equipamentos de laboratório e campo, e garantiu que nossas idéias saíssem do papel.
- Funcionários e Pesquisadores do CRILAR, por tornarem minha estadia em Anillaco uma experiência prazerosa e contribuírem com discussões frutíferas.
- Martin Ralph e John Araújo, pelos equipamentos e pelo auxílio no planejamento da Curva de Resposta de Fase.
- Diego Golombeck e sua equipe, especialmente Juan Chiesa, que nos receberam em seu laboratório e tiraram todas as nossas dúvidas a respeito do Simoneta Sistem.
- Otto von Friesen, por ajudar na utilização e fazer a manutenção do software CircadianDynamix.
- Henrique Soares, Marcelo Toledo e Daniel Caetano da Silva, por todas as dicas com a parte computacional.
- Antoni Díez-Noguera, pelas dicas com o programa El Temps.
- Carlos Rosales, dono do estabelecimento Los Rosales, que serve a melhor comida caseira de Anillaco.
- Todos os tuco-tucos que participaram dos experimentos.

Resumo

As variáveis biológicas de muitos seres vivos apresentam ritmos diários, em paralelo ao dia e à noite do ambiente. A maioria desses ritmos não é uma mera reação aos estímulos cíclicos do ambiente: eles são ritmos circadianos gerados endogenamente por um temporizador interno – o oscilador circadiano – que sustenta uma ritmicidade com período diferente de 24 horas na ausência de pistas ambientais, mas se sincroniza para um período de 24 horas quando exposto ao ambiente cíclico. Em mamíferos, o oscilador circadiano se localiza no cérebro e pode ser sincronizado pelo ciclo diário de claridade e escuridão (ciclo CE) do dia e da noite transmitido através das retinas. Animais subterrâneos passam boa parte do tempo abaixo da terra, onde as condições ambientais variam menos que na superfície. Em razão disso, questiona-se até que ponto estes animais mantêm ritmos circadianos e se seus osciladores circadianos se baseiam no ciclo CE para se sincronizar com o ambiente. Procuramos responder essas questões nos roedores subterrâneos da espécie *Ctenomys* cf. *knighti* (tuco-tucos). Em campo, realizamos observações visuais diretas para registrar o padrão temporal de exposição à luz. Em laboratório, construímos a Curva de Resposta de Fase (CRF), que consiste em medir indiretamente a resposta do oscilador circadiano a estímulos luminosos em diferentes momentos do dia. Por fim, recorremos a simulações computacionais de um modelo matemático de oscilador, para integrar os dados anteriores. Verificamos, em campo, que os tuco-tucos se expõem, diariamente, a pulsos de luz irregularmente distribuídos nas horas claras do dia levantando alguns questionamentos sobre sua capacidade como sincronizador dos ritmos em campo. Contudo, a CRF nos indicou que o sistema circadiano dos tuco-tucos responde a estímulos luminosos de forma semelhante aos animais não-subterrâneos. Nós verificamos 3 hipóteses: ou a informação da exposição à luz em campo é suficiente para sincronizar o oscilador circadiano, apesar da aparente irregularidade; ou a CRF do tuco-tuco possui alguma característica que facilita a sincronização pelo regime observado de exposição à luz; ou seu sistema circadiano se baseia em outra pista temporal do ambiente para se manter sincronizado. Nossas simulações computacionais indicaram que a primeira hipótese é a mais provável, visto que os padrões de exposição à luz simulados, como aqueles observados em campo, com o mínimo de informação temporal, ainda assim são suficientes para sincronizar os osciladores. Em conjunto, nossos dados indicam que o ciclo claro-escuro tem um papel importante na sincronização dos ritmos circadianos dos tuco-tucos na natureza.

Abstract

Daily rhythms are found in the biological variables of many organisms, in parallel to the environmental day and night. Most of those rhythms are not mere reactions to the cyclic stimulus of the environment. They are actually circadian rhythms, endogenously generated by an internal timer, the circadian oscillator, which sustains a non-24-hour rhythm under constant conditions, but is synchronized to a 24-hour period when exposed to a cyclic environment. In mammals, this oscillator is located in the brain, and can be synchronized by the daily light-dark cycle (LD cycle) of day and night. Subterranean animals remain most of the time in an underground habitat, where environmental conditions vary less markedly than aboveground. Therefore, there are doubts whether these animals maintain circadian rhythms and whether their circadian oscillators rely on the LD cycle for environmental synchronization. We attempted to answer those questions in subterranean rodents of the species *Ctenomys cf. knighti* (tuco-tucos). In the field, we performed direct visual observations to assess their temporal pattern of light-exposure. In the lab, we build the Phase Response Curve (PRC), which consists in an indirect measurement of the circadian oscillator responses to light stimuli applied at different times of the day. Finally, computer simulations of an oscillator model were used to integrate these previous data. We verified that tuco-tucos expose themselves to light pulses that are irregularly distributed through day-light hours, raising some questions about its validity as an environmental synchronizer. However, the PRC results indicated that the tuco-tucos circadian system responds to light stimuli in a way similar to non-subterranean animals. We then verified three hypothesis: either the light-exposure temporal information was enough for the synchronization of the circadian system, despite its apparent irregularity; or the tuco-tuco's PRC present some feature that facilitates the synchronization by the observed light-exposure regimen; or the tuco-tuco's circadian system rely on another environmental temporal cue to maintain its synchronization. Our computer simulations support the first hypothesis, given that the simulated regimens, despite being little informative in the temporal sense, were still sufficient to synchronize the simulated oscillators. Together, our data indicate that the light-dark cycle plays an important role in the synchronization of the tuco-tucos' circadian rhythms in nature.

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO 2. TRABALHO DE CAMPO: EXPOSIÇÃO NATURAL DOS TUCO-TUCOS À LUZ	8
2.1. Introdução.....	8
2.1.1. Definições iniciais	8
2.1.2. Exposição à luz na natureza	8
2.1.3. Roedores subterrâneos	11
2.1.4. Exposição à luz nos tuco-tucos.....	13
2.2. Material e Métodos	14
2.2.1. Observações visuais do comportamento	15
2.2.2. Variáveis ambientais	16
2.2.3. Análise de dados	16
2.3. Resultados.....	17
2.4. Discussão.....	20
CAPÍTULO 3. TRABALHO DE LABORATÓRIO PARTE 1: CURVA DE RESPOSTA DE FASE	24
3.1. Introdução.....	24
3.1.1. Ritmos de atividade-reposo medidos em laboratório	24
3.1.2. Mecanismos de sincronização: arrastamento x mascaramento	26
3.1.3. Mecanismos do arrastamento fótico	29
3.1.4. Curva de Resposta de Fase do tuco-tuco	32
3.2. Material e Métodos.....	33
3.2.1. Animais - Captura e Manutenção	33
3.2.2. Tratamentos da CRF	35
3.2.3. Cálculo da hora circadiana na qual o pulso foi recebido (abscissa da CRF)	36
3.2.4. Cálculo do deslocamento de fase (ordenada da CRF)	38
3.2.5. Análise de dados.....	38
3.3. Resultados.....	39
3.4. Conclusões	43
CAPÍTULO 4. TRABALHO DE LABORATÓRIO PARTE 2: ARRASTAMENTO.....	45
4.1. Introdução.....	45
4.1.1. Significado da CRF	45
4.2. Material e Métodos.....	47
4.3. Resultados.....	49
4.3.1. Valor do τ e previsão da relação de fase	49
4.3.2. Relação de fase experimental	50
4.4. Discussão.....	53

4.4.1. A relação entre τ e CRF.....	53
4.4.2. Arrastamento em campo.....	54
CAPÍTULO 5. SIMULAÇÕES COMPUTACIONAIS	55
5.1. Introdução.....	55
5.1.1. Modelamento do ritmo de atividade-reposo	56
5.1.2. Simulações do arrastamento em campo.....	57
5.1.3. A amplitude da CRF	58
5.1.4. Modelo de oscilador	59
5.2. Simulações preliminares – Espaço de Parâmetros e Curvas de Resposta de Fase ..	62
5.3. Estudo 1 – Pulsos em distribuição aleatória	65
5.3.1. Metodologia	65
5.3.2. Resultados	68
5.4. Estudo 2 – Verificando o papel da CRF tipo 0	73
5.4.1. Metodologia	74
5.4.2. Resultados	75
5.5. Conclusões	77
CAPÍTULO 6. DISCUSSÃO FINAL.....	79
6.1. Arrastamento fótico em campo	79
6.2. O paradoxo da exposição à luz em um roedor subterrâneo noturno	80
6.3. Arrastamento paramétrico x não-paramétrico.....	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
APÊNDICE 1. ARMADILHA.....	90
APÊNDICE 2. LUXÍMETROS TESTADOS	91
APÊNDICE 3. CURVA DE RESPOSTA DE τ	93
A3.1. Introdução.....	93
A3.2. Metodologia.....	93
A3.3. Resultados.....	93
A3.4. Discussão.....	94
A3.5. Referências Bibliográficas	95

Capítulo 1. Introdução geral

Quando as variáveis fisiológicas e comportamentais de um ser vivo são medidas continuamente por vários dias, são encontradas modificações diárias na expressão dessas variáveis, em paralelo às mudanças observadas entre o dia e a noite do ambiente. Um dos exemplos mais claros é a alternância diária entre o sono e a vigília. Porém, alguns tipos particulares de ambiente, como o subterrâneo, não apresentam grandes variações nas suas características físicas ao longo do dia, em comparação às mudanças diárias marcadas que acontecem na superfície. Por isso, muito se questiona se os animais que habitam o subterrâneo mantêm as modificações diárias em sua fisiologia e, em caso positivo, como estes animais poderiam se referenciar temporalmente em um ambiente que varia tão pouco, na escala diária. Com o presente trabalho, tentamos responder essas questões para o roedor subterrâneo tuco-tuco (*Ctenomys cf. knighti*, Rodentia, Ctenomyidae), com foco no seu ritmo diário de atividade-reposo e nas variações diárias da iluminação ambiental.

Este primeiro capítulo tem como objetivo introduzir alguns conceitos básicos sobre os ritmos biológicos em geral e sua relação com as oscilações do ambiente. Os conceitos serão amplamente utilizados nos capítulos seguintes, nos quais apresentaremos e discutiremos os resultados obtidos com os tuco-tucos.

Segundo a teoria da evolução por seleção natural, as várias características estruturais e fisiológicas de uma espécie, incluindo o comportamento, podem ser selecionadas em determinada direção ao longo das gerações, de acordo com características do ambiente em que a espécie vive. Pode-se pensar, por exemplo, nos mecanismos de balanço hídrico em seres vivos que habitam ambientes áridos e semi-áridos (Schmidt-Nielsen, 1964), ou nos mecanismos relacionados ao anti-congelamento em peixes que vivem nas águas árticas (Scholander *et al.*, 1957).

No entanto, as características físicas não variam somente de um ambiente para outro, mas também se modificam dentro do mesmo ambiente ao longo do tempo, de forma cíclica. Uma variável ambiental, por exemplo, a temperatura do ar, pode ser bastante semelhante se observada todos os dias no mesmo horário, mas certamente

apresentará diferenças se comparada em horários distintos, como o meio-dia e a meia noite. Assim sendo, uma análise contínua ao longo do tempo pode evidenciar **ciclos** em diferentes aspectos bióticos e abióticos de um ambiente, como temperatura, umidade relativa do ar, nível de iluminação, presença de determinadas espécies, disponibilidade de alimento, etc. E estes ciclos podem ter períodos em diferentes escalas de tempo: ciclos diários, anuais, marés, etc. Não é de se admirar, então, que além dos ajustes frente a características físicas do ambiente, existam também variações temporais rítmicas na expressão das variáveis fisiológicas e comportamentais de um organismo, acompanhando o cenário cíclico ao seu redor. Os **ritmos biológicos** são caracterizados pela repetição temporal de um evento biológico em intervalos regulares. Um exemplo pode ser a concentração plasmática de um hormônio que varia ritmicamente, em um organismo, aumentando e diminuindo sistematicamente a cada 24 horas. Isso caracteriza um ritmo diário na concentração do hormônio.

Para facilitar a descrição e discussão de fenômenos periódicos, tanto biológicos quanto ambientais, faz-se necessário definir alguns conceitos básicos: período, fase, e amplitude (Fig. 1.1). **Período** é o intervalo de tempo que a variável leva para completar um ciclo completo. **Fase** é um determinado momento dentro de um ritmo biológico ou um ciclo ambiental; pode ser o momento de um evento pontual, como a fase de pôr-do-sol, ou um intervalo de tempo, como a fase de sono do ciclo sono-vigília. Por fim, a **amplitude** é definida como a diferença entre o valor mínimo e o máximo da variável periódica. Por exemplo, se a temperatura ambiental oscila entre 20°C à noite e 36°C de dia, a amplitude é de 16°C.

Figura 1.1 — Propriedades básicas de fenômenos periódicos: período, amplitude e fase. O esquema representa uma variável qualquer, que oscila no tempo de forma regular.

Ritmos biológicos diários, anuais, lunares, ritmos de maré, entre outros, estão fortemente associados a ciclos ambientais que ocorrem com o mesmo período. Contudo, há ritmos cujos períodos não correspondem a nenhum ciclo conhecido do ambiente, como, por exemplo, o ritmo de batimentos cardíacos de um ser humano (período de 0,75 a 1 segundo), o ritmo de disparos de um neurônio (0,1 segundo) ou o ciclo estral das fêmeas de ratos (4 a 5 dias). Todos esses diferentes tipos de ritmos biológicos, que possuem ou não correspondência temporal no ambiente, são estudados pela disciplina Cronobiologia.

Justamente pela coincidência temporal existente entre alguns ritmos biológicos e ciclos ambientais, seria intuitivo encarar estes ritmos como fenômenos passivos, decorrentes de reações fisiológicas e comportamentais diretas dos organismos ao ambiente cíclico. Segundo esta concepção, um animal noturno entra em atividade *porque* percebe alguma pista ambiental que indica a chegada da noite; na mesma linha de raciocínio, um animal hibernante reduz seu metabolismo em resposta às baixas temperaturas do inverno. O que se observa, entretanto, para muitos ritmos biológicos, é sua persistência a despeito da remoção de pistas ambientais cíclicas. A maioria dos ritmos diários testados até hoje se mantém mesmo quando medidos em condições constantes de laboratório, onde os ciclos ambientais são eliminados; ou seja, estes ritmos diários são fenômenos endógenos, gerados internamente. Além disso, quando um organismo é mantido em condições constantes, seus ritmos diários persistentes passam a apresentar período próprio, diferente de 24 horas (Fig. 1.2), cujo valor depende da espécie estudada (Pittendrigh & Daan, 1976a). Em razão disso, esses ritmos são conhecidos como **ritmos circadianos** (do Latin: *circa* = “ao redor de”, *dies* = dia). A condição em que um ritmo circadiano expressa seu período próprio, independente das variáveis ambientais, é denominada **livre-curso**. O período endógeno de um ritmo circadiano, expresso em condições de livre-curso é, por convenção, representado pela letra grega τ (tau). O valor de τ determina certas propriedades dos ritmos de um indivíduo, como será explicado no capítulo 3.

Considerando que as variáveis biológicas podem também apresentar respostas diretas a estímulos do ambiente, um organismo que não tivesse um sistema circadiano funcional poderia ainda assim expressar ritmos biológicos apenas por reação direta aos ciclos ambientais. São raros os exemplos de animais que se encontram em condições

ambientais constantes de fato, como os castores (*Castor canadensis*) que permanecem em suas tocas construídas abaixo do gelo, durante todo o inverno (Bovet & Oertli, 1974). Assim sendo, qual seria a relevância de se ter um mecanismo de temporização endógeno, ao invés de um sistema que se baseasse somente em reações diretas ao ambiente cíclico? A endogenicidade dos ritmos biológicos confere ao organismo a capacidade de se preparar fisiologicamente frente a desafios ambientais previsíveis. Temos a indicação de que a endogenicidade, em oposição a uma mera reatividade, permite que o organismo possa se antecipar aos eventos ambientais cíclicos e “não seja surpreendido a cada dia pelo nascer do sol” (Enright, 1970).

Figura 1.2 — Representação de um ritmo biológico hipotético sob ambiente cíclico e ambiente constante. A expressão da variável biológica (Var) aumenta e diminui ao longo do tempo (t). Acima do gráfico, as marcações brancas representam momentos de claridade e as marcações pretas representam momentos de escuridão, que caracterizam inicialmente um ciclo claro-escuro e posteriormente uma condição constante, não cíclica. As linhas tracejadas verticais delimitam períodos de 24 horas. Nota-se que, em condições constantes, o período da variável biológica deixa de ser 24 horas e os picos se atrasam cada dia mais em relação às linhas verticais.

Tanto a endogenicidade dos ritmos como sua persistência com período diferente de 24 horas são evidências de que existe um mecanismo interno, fisiológico, capaz de gerar e sustentar os ritmos circadianos, em condições constantes. Porém, quando um organismo é submetido aos ciclos diários do ambiente, seus ritmos circadianos sofrem um ajuste do período para 24 horas. Este fato indica que o

mecanismo que sustenta o ritmo é capaz de perceber referências temporais do ambiente e se sincronizar com o mesmo.

Foi formulado, então, um modelo de **sistema circadiano** para explicar a manifestação dos ritmos tanto em condições de livre-curso, como sob ciclos ambientais diários (Fig. 1.3). Segundo este modelo, existe um **oscilador circadiano central**, que percebe os ciclos ambientais por meio de vias aferentes e transmite sua ritmicidade para órgãos efetores por meio de vias eferentes. Quando o organismo é exposto a um ciclo ambiental diário (Fig. 1.3A), seus receptores percebem e transmitem a informação temporal cíclica do ambiente para o oscilador que, por influência dessa informação, assume uma ritmicidade com período de 24 horas. Por sua vez, o oscilador envia estímulos pelas vias eferentes até órgãos efetores, que passam a expressar um ritmo com a mesma periodicidade diária. Neste estado, o ritmo está sincronizado com o ciclo ambiental. Já em condições constantes (Fig. 1.3B), os receptores não enviam informações cíclicas para o oscilador central, o qual, por essa razão, passa a expressar seu período próprio τ , diferente de 24 horas. Consequentemente, o ritmo final observado nos órgãos efetores também apresenta um período diferente de 24 horas, igual ao do oscilador central, e, portanto, está em livre-curso.

Figura 1.3 – Modelo do sistema circadiano em condições de sincronização (A) e livre-curso (B). R: receptor de condições ambientais. af: vias aferentes. ef: vias eferentes. Mais detalhes no texto.

A identificação anatômica dos elementos apresentados no modelo da Figura 1.3 tem sido realizada nos diversos grupos de seres vivos (DeCoursey, 2004). Nos mamíferos, em particular, boa parte do sistema já foi identificada. Dentre os ciclos que

atuam como agentes sincronizadores, o ciclo de claridade e escuridão do dia e da noite, **ciclo claro-escuro (CE)**, é um agente sincronizador para muitas das espécies estudadas, mesmo considerando espécies com olhos atrofiados (Goldman *et al.*, 1997). Para este ciclo, os receptores identificados estão unicamente nas retinas (Foster & Kreitzman, 2005). O oscilador central é um conjunto de neurônios organizados em dois agrupamentos no hipotálamo, os **Núcleos Supraquiasmáticos (NSQs)**, que recebem estímulos nervosos das retinas através do trato retino-hipotalâmico (DeCoursey, 2004). As eferências que partem dos NSQs para os órgãos efetores podem ter natureza nervosa (Bartness *et al.*, 2001) ou humoral (LeSauter & Silver, 1998). Além disso, os NSQs controlam o ritmo de secreção de melatonina pela glândula pineal e o ritmo de temperatura, ambos capazes de atingir diferentes sistemas fisiológicos (Armstrong, 1989; Buhr *et al.*, 2010). Por fim, quase todos os órgãos podem ser considerados órgãos efetores, já que foram observados ritmos circadianos na maioria das variáveis biológicas estudadas (Szabó *et al.*, 1978).

Hoje em dia, sabe-se que o sistema circadiano é muito mais complexo. Além do ciclo claro-escuro, a cada espécie está associado um conjunto próprio de outros ciclos ambientais (ciclos de temperatura, disponibilidade de alimento, som, etc), que agem sinergicamente no processo de sincronização dos ritmos circadianos (Stephan, 2002; Refinetti, 2010). Existem também osciladores periféricos (Yamazaki *et al.*, 2000), e uma maior complexidade nas relações entre os componentes do sistema (Reebs & Mrosovsky, 1989; Armstrong, 1989). Não obstante, algumas propriedades emergentes do sistema podem ser entendidas utilizando-se apenas o modelo simplificado da figura 1.3 e, por essa razão, todas as discussões aqui apresentadas serão baseadas nesse modelo básico.

Ainda que existam outros agentes sincronizadores espécie-específicos, o fato de o ciclo claro-escuro ser uma referência temporal bastante difundida entre diferentes espécies tem implicações funcionais evidentes. Esse ciclo apresenta uma forte regularidade, que não é encontrada em outros ciclos ambientais, como nos de temperatura e de umidade relativa do ar. Em razão de sua importância, e graças à praticidade de se construir regimes claro-escuro artificiais em laboratório com o apagar e acender de lâmpadas, o ciclo CE tem sido um dos mais investigados na Cronobiologia. Uma breve consulta aos protocolos dos trabalhos clássicos revelará o

uso de ciclos CE com diferentes períodos e diferentes proporções entre a duração das horas de claro e de escuro (ver, por exemplo, Pittendrigh & Minis, 1964).

Apesar de todos os avanços trazidos pelas diversas abordagens experimentais de laboratório, há hoje em dia uma preocupação crescente com o real significado desses experimentos para a sincronização dos ritmos de seres vivos pelo ciclo claro-escuro, em seu contexto natural. Animais que habitam tocas e cavernas podem passar grandes parcelas do dia reclusas em seus abrigos, isoladas do ciclo de iluminação externo. Sua sincronização em campo só pode ser entendida a partir do conhecimento prévio do padrão de exposição à luz na natureza. Animais subterrâneos são especialmente interessantes para a investigação destas questões, porque passam a maior parte do tempo abaixo do solo, onde ficam no escuro, supostamente alheios às variações de iluminação na superfície.

Em razão disso, o presente trabalho buscou entender como ocorre a sincronização do ritmo de atividade-reposo pelo ciclo ambiental de claro-escuro em roedores subterrâneos da espécie *Ctenomys cf. knighti* (tuco-tuco), no ambiente de campo. Para tanto, utilizamos três abordagens experimentais: fizemos observações visuais em campo para verificar o padrão diário de exposição dos animais à luz (capítulo 2); realizamos experimentos em laboratório com o objetivo de mensurar a sensibilidade diária do sistema circadiano destes animais subterrâneos à luz (capítulo 3), apresentando considerações teóricas sobre estas medidas no capítulo seguinte (capítulo 4); utilizamos simulações computacionais de osciladores forçados para elucidar a dinâmica da sincronização dos tuco-tucos, integrando os dados obtidos em campo e laboratório (capítulo 5).

Capítulo 2. Trabalho de campo:

Exposição natural dos tuco-tucos à luz

2.1 Introdução

Neste capítulo descreveremos a parte de campo do trabalho, na qual registramos a exposição à luz em campo dos tuco-tucos. Esta etapa foi um esforço conjunto com Barbara Tomotani. Os dados apresentados aqui serão explorados e analisados na sua tese, em aspectos não tratados nesta dissertação.

Na introdução, traçaremos um panorama geral da exposição à luz reportada para diferentes mamíferos e levantaremos os aspectos cronobiológicos de outras espécies de roedores subterrâneos.

2.1.1 Definições iniciais

Os estudos cronobiológicos de laboratório utilizam ciclos diários de iluminação artificial, com diferentes proporções entre horas de claridade e escuridão. Para padronizar a descrição dos protocolos, foi criada a sigla **CE X:Y**, que representa ciclos com X horas de claro alternadas com Y horas de escuro. Muitos trabalhos também usam condições experimentais em que as luzes ficam permanentemente apagadas ou permanentemente acesas. O primeiro caso, denominado **escuro constante** é representado pela sigla **EE** e o segundo caso, **claro constante**, é representado pela sigla **CC**.

2.1.2 Exposição à luz na natureza

Quando saímos das condições controladas do laboratório para o contexto do campo, o processo de sincronização ao ciclo claro-escuro se torna mais complexo. Se desconsiderarmos as transições graduais entre claro e escuro do ciclo CE natural, protocolos de laboratório do tipo CE 12:12 (Figura 2.1A) parecem ser uma boa

representação do que ocorre em latitudes próximas ao equador ou durante os equinócios (Figura 2.1B). Porém, mesmo nesses casos, a real informação luminosa percebida por um ser-vivo não é o ciclo claro-escuro completo, como medido por um luxímetro posicionado a céu aberto. Animais que passam parte do dia em abrigos escuros não percebem todas as horas de luz do ambiente externo, sendo sua exposição à luz modulada pelo comportamento de saída e reclusão ao longo do dia.

Figura 2.1 – Representação esquemática de diferentes tipos de exposição à luz. As fases de exposição estão marcadas em amarelo. A: exposição à luz de um animal de laboratório, sob regime CE 12:12. B: um regime hipotético de iluminação medido a céu aberto. C: exposição de um animal noturno que descansa em um local escuro durante o dia e se expõe no final da fase de claro, como os morcegos (DeCoursey & DeCoursey, 1964) e escorpiões (Fleissner & Fleissner, 1998). D: exposição de uma animal diurno que sai da sua toca no meio da fase de claridade e não se expõe às transições entre claro e escuro, como é o caso do esquilo terrestre (Hut *et al.*, 1999).

Os primeiros animais a serem estudados quanto à exposição natural à luz foram os morcegos, que são noturnos e passam o dia em repouso no escuro, dentro de cavernas ou construções abandonadas. Twente (1955) acompanhou três espécies de morcego (*Myotis velifer*, *Corynorhinus rafinesquei* e *Antrozous bunker*) em campo e observou um comportamento bastante curioso. Ao anoitecer, os animais começavam a migrar para porções mais iluminadas da caverna e, após alguns minutos, passavam a voar brevemente para o ambiente externo, voltando à caverna logo em seguida. Em um determinado momento, todos os morcegos saíam definitivamente, de forma sincronizada, para realizar suas atividades noturnas no ambiente externo. O comportamento de saída gradual e voos breves foi interpretado como uma amostragem do ambiente, mais especificamente do nível de iluminação, que ia

decrecendo até atingir um limiar sinalizador do momento certo de saída da caverna. Por isso esse comportamento recebeu o nome de *light-sampling*.

O mesmo comportamento também foi demonstrado em morcegos no laboratório. DeCoursey e DeCoursey (1964) construíram uma caverna artificial, constituída de um local de repouso absolutamente à prova de luz, conectado a um túnel que levava a uma sala em CE 12:12, onde o alimento era disponibilizado. Todos os dias, pouco antes da mudança do claro para o escuro, os animais iniciavam sua atividade espontaneamente e faziam voos breves em direção à sala, mas só saíam definitivamente da caverna artificial quando as luzes se apagavam. É uma forte evidência de que o despertar e o início do *light-sampling* no final do dia são eventos antecipatórios, independentes de estímulos ambientais, provavelmente ditados por um mecanismo endógeno de temporização. Além disso, o pouco de informação luminosa percebida no *light-sampling* (Fig. 2.1C) era suficiente para sincronizar o oscilador com o ciclo claro-escuro.

Nessa mesma linha de trabalhos ecológicos, estudos em campo com escorpiões (Fleissner & Fleissner, 1998), que também são animais noturnos e passam o dia reclusos em tocas escuras, mostraram um comportamento semelhante ao dos morcegos: migração gradual em direção à saída da toca ao anoitecer e partida definitiva após algum tempo de espera. Os padrões temporais de exposição à luz de morcegos e escorpiões (Fig. 2.1C) estão de acordo com experimentos de laboratório com outras espécies, que demonstraram sincronização por ciclos CE, mesmo com exposição restrita a poucos minutos de luz por dia (DeCoursey, 1972).

Os roedores, grupo de mamíferos mais estudado em laboratório, nos diversos aspectos da cronobiologia, também foram investigados quanto ao seu padrão temporal de exposição à luz. A maioria dos experimentos com roedores sobre este tema foi realizada em laboratório, em “tocas” simuladas e à prova de luz, conectadas a uma gaiola em ciclo CE, o “ambiente externo”. Essa condição, classificada como semi-natural, foi usada por Pratt e Goldman (1986), que buscaram entender o efeito da presença das tocas sobre a sincronização do ritmo de atividade-reposo pelo ciclo-claro-escuro em Hamsters sírios (*Mesocricetus auratus*). Refinetti (2004) fez experimentos semelhantes com camundongos (*Mus musculus*) e roedores diurnos da espécie *Arvicanthis niloticus*. A exposição à luz regulada pelo comportamento,

consequência da presença da toca, não resultou em grandes modificações na sincronização dessas três espécies. A toca não teve efeitos significativos sobre a duração da fase de atividade, a posição temporal da atividade em relação ao ciclo claro-escuro, ou a proporção de atividade diurna x noturna.

DeCoursey (1986) mostrou o exemplo extremo do esquilo-voador noturno, um animal que se expõe muito brevemente à luz do ciclo claro-escuro, mas nem por isso deixa de se sincronizar. Os esquilos foram mantidos em laboratório, em gaiolas com roda-de-atividade, submetidas a um ciclo CE 12:12. Semelhante à condição construída por Pratt e Goldman (1986), as gaiolas estavam conectadas a caixas-ninho à prova de luz, que permaneciam em escuro constante (EE) independentemente do regime de claro-escuro da gaiola. Os esquilos saíam da caixa-ninho e corriam diariamente nas rodas-de-atividade, somente durante as horas de escuro, e passavam a maior parte das horas de claro dentro das caixas-ninho. Porém, em alguns dias, despertavam antes do apagar das luzes e eram expostos ao final da fase de claro no tubo de saída da caixa-ninho. Portanto, os animais permaneciam virtualmente em escuro constante, a não ser por essas breves exposições à luz a cada 3 ou 4 dias. O padrão de exposição à luz era, apesar de esporádico, suficiente para sincronizar o ritmo de atividade-reposo com o ciclo claro-escuro do “ambiente externo”.

O primeiro estudo a verificar o padrão de exposição à luz em roedores com uma abordagem mais ecológica, fora do laboratório, foi o de Hut e col. (1999), no qual esquilos terrestres diurnos da espécie *Spermophilus citellus* foram acompanhados em arenas semi-naturais cercadas, com luxímetros telemétricos capazes de registrar os momentos de exposição à luz. Diferentemente dos animais noturnos apresentados até agora, o esquilo terrestre permanece bastante tempo fora das tocas durante o dia, sendo que sua exposição à luz abarca boa parte da fase de claro do ciclo CE natural (Fig. 2.1D).

2.1.3 Roedores Subterrâneos

Dentro do contexto destes estudos do ritmo de atividade-reposo e sincronização pelo ciclo claro-escuro em campo, os roedores que vivem em ambientes subterrâneos são sistemas muito interessantes e ainda pouco explorados. Como o

ambiente subterrâneo é isento de informações luminosas e tem ciclos ambientais menos marcados, haveria a possibilidade de que os roedores subterrâneos pudessem ter perdido sua ritmicidade ou sua capacidade de serem sincronizados pelo ciclo claro-escuro.

Os mais estudados são os **ratos-toupeira** da África e Eurásia. A maioria das espécies é social e, como padrão geral, os estudos de laboratório demonstram grande variabilidade intra e interindividual nos ritmos diários de atividade-reposou, apresentando alguns indivíduos com ritmos marcados e sincronizáveis, outros com ritmos que não persistem em EE, e outros ainda arrítmicos (exemplos: Goldman *et al.* 1997; de Vries *et al.* 2008). Logo, o sistema circadiano dos ratos-topeira parece ter funcionalidade reduzida, mas faltam estudos de campo para confirmar o quanto isso se reflete nos ritmos em ambiente natural.

A América do Norte é habitada por roedores subterrâneos da família Geomyidae, conhecidos como **pocket gophers**. Os indivíduos da espécie *Geomys bursarius* foram registrados como arrítmicos em laboratório (Vaughan *et al.* 1961), embora Benedix (1994) tenha encontrado um padrão rítmico em campo, assim como Gettinger (1984) com indivíduos da espécie *Thomomys bottae*.

Na América do Sul, há poucos trabalhos cronobiológicos com roedores subterrâneos. Para os **coruros** (*Spalacopus cyanus*) do Chile, foi registrado o ritmo de atividade-reposou em campo e laboratório. Esses animais apresentam ritmo marcadamente noturno em laboratório (Begall *et al.* 2002) e são diurnos em campo, como sugerido por Rezende e col. (2003) e confirmado por Urrejola e col. (2005).

Nossa espécie de estudo se insere no grupo dos **tuco-tucos**, o outro grupo de roedores subterrâneos sul-americanos. Os tuco-tucos compõem um único gênero, *Ctenomys* (RODENTIA, Ctenomyidae), com cerca de 60 espécies de morfologia muito similar, em sua maioria solitárias, que habitam o subterrâneo de ambientes bastante diferentes, no que se refere à cobertura vegetal, altitude e clima (Lacey *et al.*, 2000). Estes animais possuem olhos relativamente grandes e funcionais quando comparados com outros roedores subterrâneos (Stein, 2000), o que poderia sugerir também uma maior integridade do sistema circadiano em relação aos ratos-toupeira do Velho Mundo.

Apesar disso, em um estudo de laboratório com *Ctenomys talarum*, Luna e col. (2000) mostraram uma minoria de indivíduos rítmicos e aparente ineficácia do ciclo CE como sincronizador dos ritmos. Em seus experimentos, porém, os indivíduos foram mantidos por apenas 24 horas no aparelho de medida e não foram indicados os tratamentos prévios aos experimentos. Com a mesma espécie em campo, Cutrera e col. (2006) encontraram alguns indivíduos com ritmo pouco marcado e maior atividade durante o dia (horas de claridade).

O trabalho do nosso grupo de pesquisa com a espécie *C. cf knighti* (Valentinuzzi *et al.*, 2009) foi a primeira caracterização cronobiológica sistemática de um ritmo circadiano de tuco-tuco, feita por acompanhamento contínuo do ritmo de atividade-reposo em roda-de-atividade, por vários dias, sob ciclo claro-escuro (CE), escuro constante e claro constante. Ao contrário do estudo com *C. talarum*, nossos resultados mostraram ritmos marcados, de natureza endógena, e sincronização indubitável pelo ciclo CE. Também foi observada a concentração da atividade durante as horas de escuro do ciclo CE, sugerindo que os indivíduos dessa espécie são noturnos.

Apesar de todos esses trabalhos, que foram feitos principalmente em laboratório, pouco se avançou no sentido de entender a sincronização pelo ciclo CE em campo dos roedores subterrâneos. O caso do coruro, que é noturno em laboratório e diurno na natureza, revela quão falha pode ser a extrapolação de uma situação controlada para a situação natural. O máximo a que se chegou até hoje foram hipóteses especulativas, como a de Rado e col. (1991) em seu trabalho com o rato-toupeira cego. Segundo este trabalho, o pouco de luz que os animais vêem, nas saídas esporádicas para remover terra do túneis, deveria ser suficiente para sincronizar o oscilador circadiano.

2.1.4 Exposição à luz nos tuco-tucos

Neste capítulo, apresentaremos a primeira etapa do nosso trabalho sobre a sincronização em campo pelo ciclo claro-escuro de roedores subterrâneos da espécie *Ctenomys cf. knighti*, que consistiu em registrar o padrão temporal de exposição à luz em campo dos tuco-tucos.

Inicialmente, planejávamos liberar os animais em uma área cercada, portando um luxímetro *logger*, que registraria os momentos de exposição à luz e as intensidades luminosas às quais os animais se expusessem, ao longo do dia. Posteriormente, recapturaríamos cada animal, com seu aparelho, e recuperaríamos os dados gravados. A área cercada seria somente um controle para garantir que os animais não se dispersassem do local de liberação, até o momento da recaptura. Entretanto, tivemos diversos problemas com os aparelhos testados até hoje.

Nossa idéia inicial consistia em um aparelho que fornecesse, simultaneamente, um registro temporal de exposição à luz e de ocorrência de atividade locomotora, semelhante ao que faz o aparelho Actiwatch da empresa Mini Mitter (Bend, OR, Estados Unidos), que é comumente utilizado em pesquisas de cronobiologia humana, em particular com trabalhadores de turnos rotatórios. Infelizmente, o tamanho e o peso do Actiwatch não são adequados para um animal com as dimensões do tuco-tuco. Decidimos, então, contratar uma empresa para desenvolver um aparelho menor e mais leve, que pudesse ser anexado a um colar e preso ao redor do pescoço dos tuco-tucos. Testamos, durante dois anos, um protótipo da empresa Insight (Ribeirão Preto, SP, Brasil) e, posteriormente, mudamos para a empresa Ecotone (Gdynia, Polônia). As características dos protótipos testados e um panorama dos problemas que tivemos com eles estão descritos no Apêndice 2.

Em razão de todas as dificuldades com o registro automático, recorremos a um método alternativo: o registro do padrão temporal de exposição à luz foi conseguido por meio de observações visuais dos animais, dentro da área cercada. Uma vez que os animais são noturnos em laboratório (Valentinuzzi *et al.*, 2009), imaginamos inicialmente que deveriam sair pouco das tocas durante as horas de claro, não necessariamente todos os dias e preferencialmente no início da manhã ou final da tarde.

2.2 Material e Métodos

O estudo de campo foi realizado no *Centro Regional de Investigaciones Científicas y Transferencia Tecnológica* (CRILAR), localizado no povoado de Anillaco

(26° 48' S; 66° 56' W; 1445mts), La Rioja, Argentina. O clima da região é seco, caracterizado por chuvas esporádicas concentradas no verão e na primavera (precipitação anual média de 357,6 mm, medida entre 1999 e 2003 pela estação meteorológica do CRILAR) e amplitude térmica anual próxima de 15° (medida em 2008 e 2010 pela estação meteorológica do CRILAR). Tuco-tucos são encontrados tanto dentro do povoado como em áreas vizinhas menos impactadas, e em geral constroem seus túneis próximos a arbustos ou dentro de plantações. Os três tuco-tucos usados nesta etapa foram capturados com armadilhas construídas a partir de tubos de PVC (descritas no Apêndice 1), e foram mantidos em laboratório até o momento do estudo.

No próprio centro de pesquisas há uma região sem construções, naturalmente colonizada por tuco-tucos, dentro da qual selecionamos uma área de 10m x 5m para confecção de uma arena, a ser usada como ambiente semi-natural. O perímetro da arena foi cercado com tela de arame, de extensão vertical 1,8m, posicionada 1m acima e 0,8m abaixo do nível do solo. O mesmo material também foi usado para construir um teto e fechar a arena por cima. Buscamos, com isso, evitar a fuga de tuco-tucos por baixo da terra e a entrada de predadores, como raposas e gaviões.

Utilizamos as normas da American Society of Mammalogists como base para os procedimentos experimentais e manutenção dos tuco-tucos (Sikes *et al.*, 2011). A captura dos animais foi autorizada pela *Dirección General de Ambiente y Desarrollo Sustentable, Secretaría de Ambiente, Ministerio de Producción y Desarrollo Local*, La Rioja (Disposição Nº 052/08).

2.2.1 Observações visuais do comportamento

Liberamos os animais dentro da arena, individualmente, e fizemos observação visual contínua do comportamento. Registramos todos os momentos em que saíam de seus túneis subterrâneos durante as horas em que havia iluminação natural (não fizemos observações noturnas).

Três sequências de observações foram feitas em três ocasiões diferentes, de acordo com a Tabela 2.1, cada uma com um indivíduo. As sequências foram nomeadas 1ª observação, 2ª observação e 3ª observação. Mais informações sobre os indivíduos podem ser encontradas na Tabela 3.1, na sessão Material e Métodos do Capítulo 3.

Tabela 2.1 – Descrição das observações em campo.

	Data de início	Total de dias	Horários de observação	Animal observado
1ª observação	01/03/2010	11	06:30 - 20:30	# 13
2ª observação	27/07/2010	11	07:50 - 19:10	# 68
3ª observação	01/03/2011	10	06:30 - 20:30	# 65

2.2.2 Variáveis ambientais

Paralelamente ao registro dos padrões temporais de exposição à luz, variáveis ambientais e comportamentais também foram acompanhadas durante as observações na arena, porém esses aspectos foram abordados e discutidos em um trabalho paralelo do grupo, já submetido para publicação (Tomotani *et. al*, submetido). Será apresentado aqui somente o dado de intensidade luminosa, medida com um luxímetro de campo (TM-201, Tenmars Electronics CO., Taiwan), por 3 a 4 dias durante cada uma das três sequências de observações. Para tomar a medida, o luxímetro foi posicionado dentro da arena, próximo ao nível do solo, com a parte fotossensível voltada para cima.

2.2.3 Análise de dados

Montamos uma planilha com registro discreto (sim/não) da emergência do tuco-tuco à superfície (com consequente exposição à luz) em intervalos de 1 minuto. A partir destes dados, construímos gráficos demonstrativos, que apresentam os dias no eixo das ordenadas e os horários no eixo das abscissas. Na linha horizontal correspondente a cada dia, são marcados os horários em que houve exposição à luz. Este tipo de representação permite acompanhar como as fases dos episódios de exposição à luz se modificam ao longo dos dias.

Adicionalmente, também foram construídos histogramas integrando os dados de todos os dias de cada observação, para visualização do perfil da exposição à luz ao longo das horas observadas. As horas de observação foram divididas em intervalos de

15 minutos, e para cada intervalo foram somados os episódios de exposição de todos os dias. Esta representação evidencia as fases do dia em que se concentram os episódios de exposição à luz. Com base nesse histogramas calculamos os horários em que acontecem os 60% centrais dos episódios de exposição à luz, para cada observação.

Também calculamos o tempo total de exposição por dia, o número de episódios individuais de exposição a cada dia e a duração do episódio mais longo de cada dia. Por último, registramos os horários dos episódios inicial, central e final para cada dia de cada observação e calculamos sua variação, por desvio padrão.

2.3 Resultados

Diferentemente do esperado para animais noturnos, os tuco-tucos saíram bastante dos túneis durante as horas de claridade do dia, como demonstrado nos gráficos da figura 2.2 (gráficos superiores). Para os três indivíduos, a exposição à luz consistiu em vários episódios de exposição por dia, em horários variados entre dias consecutivos. Apesar das diferenças entre dias, as exposições se concentraram em fases específicas do dia, não se distribuindo igualmente por toda a fase de claro, como demonstrado nos histogramas (Fig 2.2, gráficos inferiores).

A tabela 2.2 apresenta algumas medidas quantitativas da exposição à luz, demonstrada nos gráficos da figura 2.2. Foram desconsiderados os dias sem exposição à luz da 3ª observação. O tempo total de exposição por dia variou bastante entre as três observações, sendo maior no inverno do que nos dois verões. O desvio padrão dessa medida demonstra também que houve bastante variabilidade entre os dias de cada observação. Ou seja, como pode ser observado nos actogramas da figura 2.2, para um mesmo animal, houve dias de bastante exposição e dias de pouca exposição, por exemplo, o 1º e o 2º dias da primeira observação.

Figura 2.2 – Padrão temporal de exposição à luz em arena semi-natural de 3 tuco-tucos, medido por observação visual contínua do comportamento. Cada observação foi realizada com um único indivíduo. Gráfico superior de cada observação: representação de todos os episódios de exposição à luz de cada dia. Os episódios estão representados por marcas brancas no dia e horário em que ocorreram. Fora desses momentos, os animais permaneceram supostamente no escuro. Gráfico inferior de cada observação: histogramas construídos a partir da soma dos dados de todos os dias de observação evidenciando a fase de concentração dos episódios de exposição. As linhas verticais pretas delimitam as horas em que houve observação, e as setas acima dos gráficos indicam os horários de nascer e pôr-do-sol (disponíveis em <<http://www.usno.navy.mil>>, Acesso em: 24 ago. 2011). Os códigos de identificação dos animais observados estão escritos sobre os gráficos, à direita.

Na tabela 2.2, também está indicado o horário de concentração dos 60% centrais das exposições de cada observação. Nota-se que as exposições da segunda observação aconteceram principalmente à tarde, enquanto que nas outras duas observações as exposições se concentraram principalmente em horários mais matutinos.

Tabela 2.2 – Quantificação da exposição à luz. DP = desvio padrão.

	Tempo total de exposição por dia, em minutos (média $\pm$ DP)	Número de episódios de exposição por dia (média $\pm$ DP)	Duração do episódio diário mais longo, em minutos (média $\pm$ DP)	Horário em que se concentram os 60% centrais de exposição
1ª observação	96,8 $\pm$ 52,0	6,3 $\pm$ 1,6	39,6 $\pm$ 16,4	8:45 - 13:00
2ª observação	125,0 $\pm$ 62,7	6,6 $\pm$ 1,7	60,0 $\pm$ 36,6	12:15 - 15:45
3ª observação	60,6 $\pm$ 36,6	4,7 $\pm$ 1,6	23,3 $\pm$ 12,8	8:30 - 10:00

A variação dos horários de exposição à luz a cada dia está apresentada na tabela 2.3. Para quantificar esta variação, nos baseamos nos horários de três episódios de referência para cada dia: o primeiro episódio, o episódio central e o último episódio de exposição à luz. Em todas as observações, houve mais de uma hora de variação em pelo menos um dos episódios de referência. Sendo essa medida o desvio padrão, significa que o horário variou mais de uma hora ao redor do horário médio, tanto para mais cedo quanto para mais tarde. Na prática então, o desvio de 2 horas e meia (157 minutos) no horário do último episódio diário da terceira observação, significa que o horário dessa exposição variou entre 2 horas e meia antes e 2 horas e meia depois do horário médio, perfazendo um intervalo total de 5 horas de variação.

Com base na variação desses três episódios de referência, calculamos uma variação média do horário de exposição à luz, para cada observação. Tomando como base este valor representativo, concluímos que os horários de exposição à luz da primeira observação foram os mais variados, oscilando dentro de um intervalo de aproximadamente 4 horas: 127 minutos acima da média mais 127 minutos abaixo da média. As outras duas observações apresentaram uma variação diária nos horários de exposição à luz, ao redor de 2 horas e 40 minutos.

Tabela 2.3 – Variação dos horários de exposição. Valores em minutos. DP = desvio padrão

	DP do horário do primeiro episódio diário de exposição	DP do horário do episódio diário central de exposição	DP do horário do último episódio diário de exposição	DP médio do horário diário de exposição
1ª observação	76	143	161	127
2ª observação	80	72	101	84
3ª observação	41	42	157	80

Na figura 2.3 estão apresentados os dados de intensidade luminosa medidos durante a 2ª e 3ª observações. Em razão da grande variação ao longo do dia, os valores de intensidade luminosa estão representados em escala logarítmica. É possível notar a diferença na duração da fase de claridade: a intensidade luminosa começa aumentar mais tarde e a diminuir mais cedo no inverno (2ª observação, agosto) que no verão (3ª observação, março). O gráfico apresenta os valores médios de intensidade para cada horário, calculados com base nas medidas de 4 dias. Encontramos grande variação entre dias com céu aberto (máximo de 140.000 lux) e dias com muitas nuvens (máximo de 8.500 lux).

2.4 Discussão

Na literatura, o padrão temporal de exposição à luz no ambiente natural foi medido em poucos animais, tendo sido registrados padrões qualitativamente diferentes para cada um deles (Terman *et al.*, 1991; e exemplos já mencionados na introdução do capítulo), inclusive para seres humanos (Savides *et al.*, 1986). Considerando que o ciclo claro-escuro do ambiente é aproximadamente o mesmo para todos os organismos de uma mesma latitude, o que determina as diferenças no padrão de claro-escuro observado é o isolamento luminoso dos abrigos e o comportamento de reclusão e saída durante as 24 horas do dia (Roenneberg & Foster, 1997). No caso dos tuco-tucos, por exemplo, que habitam túneis escuros, a exposição à luz depende

de o animal estar ativo e sair voluntariamente para a superfície, nos horários em que há luz. Nesse caso, então, o funcionamento do sistema circadiano não é mais entendido simplesmente pelo esquema unidirecional da figura 1.3. Adiciona-se ao modelo uma retroalimentação do ritmo comportamental de atividade-reposo sobre a percepção do ciclo CE.

Figura 2.3 – Perfil da intensidade luminosa ao longo do dia, medida dentro da arena, no nível do solo. Os valores apresentados são as médias das intensidades medidas por quatro dias durante as observações. As medidas da 1ª observação, não mostradas, são semelhantes às da 3ª observação. Eixo das ordenadas em escala logarítmica.

Entretanto, a exposição à luz parece não ser uma mera consequência da saída das tocas para forrageamento e, no caso dos tuco-tucos, para manutenção dos túneis. Aparentemente, pode estar embutido neste comportamento um componente voluntário de “busca por luz” (*light-seeking*), desvinculado do contexto “abrigo x ambiente externo”. Experimentos de laboratório em que os animais podem controlar a condição de iluminação à qual se expõem, sem precisar mudar de ambiente, mostram que há preferência por deixar as luzes acesas em algum momento do dia (para revisão, ver Refinetti, 1997). Neste nosso trabalho, no entanto, não exploraremos este aspecto, que continua especulativo.

Quanto à exposição à luz do tuco-tuco, nossas hipóteses iniciais se mostraram contrárias aos dados obtidos. Esperávamos que se expusessem por pouco tempo à luz, por serem animais noturnos. Relatos da população local, que haviam presenciado tuco-tucos fora dos túneis de manhã e à tarde, já indicavam que os animais poderiam sair das tocas durante as horas de claridade. Imaginávamos, porém, que fossem eventos isolados, superpostos a uma exposição mais robusta no início ou fim do dia, que corresponderiam ao fim ou início da fase noturna de atividade. Porém, observamos uma exposição diurna consistente, não concentrada nos crepúsculos e, em um dos casos, posicionada no meio da fase de claridade (3ª observação). Maiores discussões sobre o significado desse componente diurno de atividade poderão ser encontradas no artigo de Tomotani e col. (submetido).

A exposição à luz em horários fora dos crepúsculos não parece ser um artefato da condição semi-natural da arena, visto que, durante as observações, avistamos tuco-tucos livres, vizinhos à arena, que se expunham à luz em horários semelhantes aos animais estudados em reclusão.

Também esperávamos que, independentemente da frequência de exposições, elas acontecessem em horários regulares, constituindo uma informação temporal estável, com potencial para sincronizar o sistema circadiano com as 24 horas do ambiente. No entanto, em um dos casos, encontramos uma variação de mais de 4 horas entre horários de exposição de dias consecutivos.

Temos em mente que o método utilizado nos forneceu uma medida aproximada da exposição à luz, porque não há garantia de que os túneis são de fato isolados de informações luminosas. As aberturas dos túneis e outras potenciais frestas não identificadas podem permitir a entrada de luz em determinadas porções do sistema de túneis e, em razão disso, poderiam acontecer eventos subterrâneos de exposição à luz que não seriam perceptíveis ao nosso método de observação acima da terra. Acreditamos, contudo, que pelo menos a maior parte da exposição à luz tenha sido contemplada. Estudos futuros com os luxímetros de registro automatizado devem confirmar a possibilidade de exposições subterrâneas à luz.

Assumindo que nossos dados são uma medida representativa da exposição total à luz durante o dia, questionamos como o sistema circadiano do tuco-tuco pode manter a sincronização em campo, estando submetido a um agente sincronizador cuja

fase muda a cada dia. Pensamos em algumas alternativas que poderiam explicar esta questão:

1. O oscilador circadiano do tuco-tuco apresenta características no padrão de resposta à luz, que permitem sincronização a partir da informação luminosa irregular percebida em campo;
2. A aparente irregularidade no regime temporal de exposição à luz não constitui uma informação verdadeiramente errática e pode sim sincronizar o oscilador circadiano do tuco-tuco, mesmo que este não possua características específicas na resposta à luz;
3. O oscilador circadiano do tuco-tuco se baseia em outra pista ambiental, não fótica, para sincronizar seus ritmos em campo.

Essas hipóteses serão abordadas nos capítulos seguintes da dissertação.

Capítulo 3. Trabalho de laboratório parte 1:

Curva de Resposta de Fase

3.1 Introdução

Uma vez verificado o regime temporal de iluminação ao qual se expõem os tuco-tucos em campo, prosseguimos, em laboratório, à investigação de como o sistema circadiano desses roedores responde à luz, para que a dinâmica da sincronização em campo possa ser entendida. Para isso, levamos tuco-tucos para o laboratório e construímos uma Curva de Resposta de Fase (DeCoursey, 1960; Daan & Pittendrigh, 1976; Johnson, 1999), a qual consiste na medida da sensibilidade do seu oscilador circadiano à luz, em diferentes momentos do dia. A curva é uma ferramenta importante, que fornece informações sobre os mecanismos de sincronização e nos permite prever a dinâmica do oscilador circadiano sob diferentes ciclos claro-escuro. O objetivo deste capítulo é descrever a construção da Curva de Resposta de Fase para o tuco-tuco e, em razão disso, faz-se necessário definir alguns conceitos centrais quanto aos mecanismos subjacentes à sincronização dos ritmos circadianos pelo ciclo claro-escuro.

3.1.1 Ritmos de atividade-reposo medidos em laboratório

O nível de atividade é uma variável biológica que se modifica diariamente de forma marcada, em muitos animais. Somado a isso, o fato de ser facilmente medido com aparelhos simples de laboratório fez com que o ritmo diário de atividade-reposo fosse um dos ritmos mais estudados nos trabalhos cronobiológicos. Nos estudos com roedores, mede-se normalmente a atividade locomotora, por meio de rodas-de-atividade, que os animais usam espontaneamente.

A quantificação da atividade é feita pela contagem do número de revoluções do animal na roda: define-se um intervalo de tempo (1 minuto, ou 10 minutos, ou 30 minutos, etc.) e conta-se quantas vezes a roda foi girada dentro de cada repetição

desse intervalo ao longo dos dias de medida. Obtém-se, para cada dia, um registro dos momentos em que o animal ficou ativo e aqueles em que não houve atividade. Em geral, a atividade e o repouso se organizam em duas fases distintas que ocupam, aproximadamente, a metade do dia, resultando em um ritmo diário marcado de atividade-repouso.

Para auxiliar na visualização do ritmo, foi criada uma representação gráfica denominada **actograma** (Fig. 3.1). Os dados de cada dia são recortados e colados um abaixo do outro, em sequência (Fig. 1.3, gráfico preto). Além disso, o gráfico é comumente duplicado (Fig. 3.1, gráfico cinza), para permitir acompanhamento de ritmos com período diferente de 24 horas. Esta representação facilita a visualização da evolução da fase do ritmo longo dos dias, que é essencial para entender o padrão em livre-curso.

Figura 3.1 — Actograma. Dias consecutivos de medida do ritmo de atividade-repouso foram empilhados um abaixo do outro (gráfico preto à esquerda). Dessa forma, tem-se no eixo das ordenadas os dias e no eixo das abscissas o horário do dia. A fase de atividade do ritmo é representada a cada dia pela barra horizontal preta. O gráfico foi duplicado e colado à direita (gráfico cinza) para acompanhar o padrão do ritmo em livre-curso (dias 6 a 11).

3.1.2 Mecanismos de sincronização: arrastamento x mascaramento

A sincronização dos ritmos biológicos com estímulos cíclicos do ambiente pode se dar por meio de dois mecanismos. O primeiro, já apresentado na figura 1.3A, envolve interferências de um ciclo ambiental sobre o oscilador central, que secundariamente se refletem na expressão final do ritmo. Este mecanismo recebe o nome de **arrastamento**. Um ciclo ambiental capaz de **arrastar** o oscilador circadiano de uma espécie é denominado **agente arrastador** ou **Zeitgeber** (segundo a terminologia original alemã; Aschoff, 1954). Alternativamente, estímulos ambientais cíclicos podem modular diretamente a amplitude de uma variável biológica, sem modificar o estado do oscilador central (Fig. 3.2). Esse outro tipo de ação é denominado **mascaramento**. Sob um ciclo ambiental mascarador, a variável biológica é ora inibida e ora estimulada, gerando um ritmo exógeno, por reação direta ao ambiente.

Figura 3.2 – Mecanismos de sincronização dos ritmos biológicos. Por um lado, ciclos arrastadores (*Zeitgeber*) promovem o arrastamento do oscilador circadiano que gera a ritmicidade do sistema. Por outro, estímulos ambientais cíclicos podem ter efeitos diretos sobre a expressão final dos ritmos biológicos, de forma independente do oscilador circadiano.

Dessa forma, entendemos que a expressão básica do ritmo é definida pelo oscilador central, que por sua vez é sincronizado por agentes arrastadores. Em adição, eventos ambientais mascaradores podem agir sobre esta expressão basal, modulando-a e modificando o ritmo final observado. Portanto, no ambiente natural, diferentes agentes arrastadores e mascaradores modificam simultaneamente os ritmos biológicos dos organismos.

Em casos extremos, como já descrito acima, agentes mascaradores cíclicos, em regime 12:12, podem inclusive induzir ritmos nas variáveis biológicas, aumentando ou

diminuindo a expressão da variável ao longo do tempo, sem agir sobre o oscilador central. Pode-se diferenciar a ação de um agente mascarador cíclico da ação de um *Zeitgeber* a partir do protocolo demonstrado nos actogramas da figura 3.3.

Na figura 3.3A o animal está inicialmente em condições constantes, dos dias 1 a 11, e seu ritmo se apresenta em livre-curso, expressando um τ maior que 24 horas. Entre os dias 12 e 20, aplica-se um ciclo ambiental, por exemplo, o ciclo claro-escuro, com a fase de claridade correspondendo aos momentos do dia englobados pelo retângulo desenhado no gráfico. Sob este regime, o período do ritmo é ajustado para 24 horas, e, portanto, a fase de atividade passa a ocorrer todos os dias no mesmo horário. A partir do dia 21, o animal é novamente posto em condições constantes e seu ritmo volta a se apresentar em livre-curso.

Sabemos que o ciclo ambiental é um *Zeitgeber*, porque, quando o ritmo volta à condição de livre-curso, a fase de atividade está posicionada no momento correspondente à fase que estava quando submetido ao ciclo. Ou seja, o ciclo ambiental modificou a fase do oscilador central.

Já na figura 3.3.B, o processo é um pouco diferente. Até o dia 20, último dia do ciclo ambiental, o ritmo se comporta de forma muito parecida com o da figura 3.3 A. Porém, quando o ciclo ambiental é removido, nota-se que a fase de atividade se posiciona em um horário diferente do que vinha apresentando durante a sincronização pelo ciclo ambiental. Se traçarmos uma linha pelos inícios de atividade (tracejado cinza) extrapolarmos até o dia 1, veremos que o ritmo está acompanhando o mesmo padrão que vinha seguindo antes da aplicação do ciclo ambiental. Isso é um indício de que este é um ciclo mascarador, que não age sobre a fase do oscilador central.

Experimentos com diversas espécies demonstraram que a luz pode interferir no sistema circadiano das duas formas. Se, por um lado, ciclos claro-escuro diários arrastam o oscilador central, e sincronizam seu período com as 24 horas do ambiente, por outro lado, estímulos luminosos podem induzir ou inibir pontualmente a expressão de variáveis biológicas, modificando a expressão final do ritmo.

Podemos pensar, por exemplo, no ritmo de sono e vigília de um ser humano. Nosso oscilador central sinaliza que devemos estar acordados durante o dia e dormir à noite. O ciclo claro-escuro tem o papel de arrastar o oscilador, garantindo que nosso sono e nossa vigília se mantenham temporalmente alocados nas fases certas do dia.

Por outro lado, uma pessoa dormindo pode ser acordada com o acender das luzes do quarto, o que caracteriza um efeito mascarador de um estímulo luminoso pontual sobre a expressão do sono.

Nosso interesse está na interferência da luz sobre o oscilador central dos tuco-tucos e suas implicações para o processo de arrastamento, por isso, serão descritos com mais detalhes os mecanismos de arrastamento por ciclos claro-escuro. Os mecanismos de mascaramento não serão abordados aqui.

Fig. 3.3 — Actogramas ilustrando as diferenças na ação de ciclos arrastadores (*Zeitgeber*) e ciclos mascaradores sobre a fase de um ritmo biológico. Os retângulos desenhados sobre os dias 12 a 20 indicam a presença do estímulo ambiental. A: Ritmo em livre-curso é sincronizado por um *Zeitgeber*. Sabemos que o ciclo é um agente arrastador, porque o ritmo, ao voltar para condições constantes, segue a fase de sincronização, indicando que a fase de seu oscilador circadiano foi modificada pelo ciclo ambiental. B: Ritmo em livre-curso é sincronizado por um ciclo ambiental, mas, quando o ciclo é removido, a fase do ritmo, ditada pelo oscilador circadiano, segue o padrão anterior à sincronização (linhas pontilhadas), indicando que a fase do oscilador não foi modificada pelo ciclo; este é, portanto, um ciclo mascarador.

3.1.3 Mecanismos do arrastamento fótico

Na tentativa de entender a ação do ciclo claro-escuro como *Zeitgeber*, foram criados protocolos com diferentes tipos de ciclos claro-escuro. Dentre eles, destacam-se os ciclos diários com pouco tempo de claridade por dia, por exemplo, ciclos com 1 hora (CE 1:23) ou 15 minutos (CE 15min:23h45min) de iluminação que, ainda assim, são capazes de arrastar o oscilador circadiano. Esse tipo de ciclo, constituído por **pulsos periódicos** de luz foi usado com frequência nos trabalhos clássicos da Cronobiologia (Elliot, 1976; Pittendrigh & Daan, 1976a).

O arrastamento por esse tipo de ciclo levou às primeiras hipóteses sobre os mecanismos envolvidos no processo de arrastamento. Imaginemos um ritmo que, em EE, expressa um período intrínseco τ de 22 horas e, sob um ciclo CE 1:23, tem seu período sincronizado para 24 horas (Figura 3.4). Em livre-curso, o período de 22 horas faz com que a fase do ritmo comece 2 horas mais cedo, a cada dia. Na situação de sincronização, o estímulo luminoso diário atua no sistema circadiano compensando essas 2 horas de diferença que existem entre τ e as 24 horas do *Zeitgeber*. Isso indica que o estímulo luminoso, através das vias aferentes, tem a propriedade de promover **deslocamentos de fase** no oscilador.

Figura 3.4 – Sincronização de um ritmo de atividade-reposo pelo ciclo claro-escuro CE 1:23. Inicialmente em livre-curso, o ritmo assume período de 24 horas quando submetido ao ciclo de iluminação. Áreas em cinza indicam fases de escuro e o retângulo branco a partir do dia 10 delimita a fase de claro diária do ciclo claro-escuro.

Essa hipótese foi testada posteriormente em experimentos com organismos mantidos em EE, que receberam pulsos de luz isolados, em diferentes momentos do dia. Nessas condições, os estímulos isolados de fato promoveram deslocamentos na fase do ritmo de atividade-reposo e, portanto, na fase do oscilador.

Figura 3.5 – Deslocamentos de fase do oscilador circadiano, provocados por estímulos luminosos. A: Actogramas do ritmo de atividade-reposo de um animal noturno hipotético, demonstrando três diferentes tipos de resposta de fase, decorrentes de estímulos luminosos em diferentes momentos do ritmo de atividade-reposo. B: Curva de Resposta de Fase (CRF) representando o perfil de resposta do oscilador à luz, ao longo do dia. A região em laranja corresponde a atrasos de fase, a região em azul corresponde a adiantamentos e em verde está a **zona morta**, que apresenta deslocamentos pequenos ou nulos.

Além disso, foi constatado que pulsos de luz aplicados em diferentes horários resultaram em diferentes deslocamentos na fase do oscilador. Na figura 3.5A, está representado o ritmo fictício de atividade-reposo de um organismo noturno

submetido ao referido protocolo. Em cada actograma, o ritmo apresenta uma resposta diferente ao estímulo luminoso, que depende do momento em que o estímulo é aplicado. Para o animal noturno hipotético, um estímulo no início da fase de atividade promove **atrasos** de fase, ou seja, a fase do ritmo muda para “mais tarde” em relação à tendência que vinha seguindo antes do pulso. Quando o estímulo é ministrado no final da fase de atividade, ocorrem **adiantamentos**, ou seja, a fase do ritmo é deslocada para “mais cedo” que o previsto pela tendência anterior ao pulso. O estímulo na fase inativa não modifica a fase do ritmo, o que caracteriza ausência de deslocamento de fase.

Se o experimento em escuro constante for repetido com estímulos luminosos percorrendo todos os momentos do dia, pode-se traçar um perfil da resposta do oscilador à luz, ao longo do dia. Essas respostas em função do horário do estímulo são representadas em um gráfico denominado **Curva de Reposta de Fase (CRF)**. O ritmo de atividade-reposo é o mais comumente usado no protocolo da CRF em roedores, porque em geral possui uma precisão não encontrada nos outros ritmos, o que é imprescindível para verificação e cálculo dos deslocamentos de fase.

Na figura 3.5B está representada uma CRF esquemática, com a fase dos estímulos no eixo das abscissas e os deslocamentos de fase resultantes no eixo das ordenadas. A escala de tempo do eixo das abscissas é uma escala normalizada em relação à fase e ao período do ritmo, cuja construção será mais explorada na sessão Material e Métodos. Para animais noturnos, como nesse exemplo, a fase ativa é chamada **noite subjetiva** e se inicia na hora circadiana 12, enquanto a fase inativa é denominada **dia subjetivo** e se inicia na hora circadiana 0.

O eixo das ordenadas apresenta a magnitude (número de horas) e direção dos deslocamentos de fase. Uma vez que a fase é representada pela letra grega ϕ (phi), a notação $\Delta\phi$ é usada para simbolizar deslocamentos de fase. Por convenção, adiantamentos de fase são representados como valores positivos, atrasos como valores negativos e a ausência de deslocamentos é posta no gráfico como 0. Segundo a curva esquemática o início da noite subjetiva, ou início da atividade desse animal noturno, é caracterizado por respostas de atrasos de fase do oscilador (valores negativos). Conforme se percorre o tempo circadiano em direção a horários mais tardios da noite subjetiva, observa-se diminuição dos atrasos e transição gradual para

adiantamentos de fase (valores positivos). Os adiantamentos continuam até o final da noite e início do dia subjetivo. O restante do dia subjetivo, que é a fase de repouso de um animal noturno, ou atividade de um animal diurno, caracteriza-se por deslocamentos pequenos ou nulos e é, por essa razão, denominado **zona morta**.

3.1.4 Curva de Resposta de Fase do tuco-tuco

Em geral, o formato da CRF de todas as espécies estudadas até hoje segue o mesmo padrão qualitativo da curva esquemática apresentada na figura 3.5B (Johnson, 1999), seja a espécie diurna ou noturna. Entretanto, cada espécie pode apresentar especificidades na magnitude dos deslocamentos e na proporção entre fases que respondem com adiantamento e fases que respondem com atraso (Daan & Pittendrigh, 1976).

Na literatura, há poucos registros de CRFs para espécies selvagens, e nenhum para roedores subterrâneos. Considerando que os ratos-toupeira do velho mundo apresentam grande irregularidade tanto nos ritmos de atividade-repouso quanto na sincronização com o ciclo CE, é possível que um estudo transversal, com vários indivíduos, seja difícil de realizar e não revele uma CRF com regiões de atraso e adiantamento bem definidas. Em contrapartida, a espécie que estudamos apresenta ritmos precisos e sincronização marcada pelo ciclo CE (Valentinuzzi *et al.*, 2009), motivo pelo qual esperamos encontrar uma CRF definida.

Em seguida, será descrito o experimento realizado para acessar a CRF do tuco-tuco. Sabendo de antemão que o formato da curva nos mostra como o oscilador responde a estímulos luminosos, o experimento nos ajudaria a responder um dos questionamentos levantados no capítulo anterior: os tuco-tucos possuem alguma especificidade na resposta do seu oscilador à luz, que possa facilitar a sincronização (arrastamento) pelo regime irregular de exposição à luz observado em campo?

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Animais - Captura e Manutenção.

Os experimentos de laboratório foram realizados no *Centro Regional de Investigaciones Científicas y Transferencia Tecnológica* (CRILAR), localizado no povoado de Anillaco (26° 48'S; 66° 56'O; 1445 m), La Rioja, Argentina.

A captura dos animais foi feita em Anillaco e proximidades, utilizando as armadilhas descritas no Apêndice 1. Depois de capturados, os espécimes foram mantidos no biotério, em gaiolas individuais de acrílico (53 x 29 x 27cm) com rodas de atividade (diâmetro 23 cm, largura 10 cm, 1 cm entre barras), e foram alimentados diariamente em horários variados, para evitar arrastamento do oscilador circadiano por um ciclo de disponibilidade de alimento (Stephan, 2002). Como comida, foram oferecidos pedaços de cenoura e batata doce, alface, ração para coelho, aveia e/ou sementes de girassol. Não disponibilizamos água em bebedouros, porque os animais deste gênero extraem dos alimentos toda a água que necessitam (Buffenstein, 2000).

A tabela 3.1 apresenta os dados individuais de cada espécime usado nos trabalhos de campo e laboratório e indica os experimentos dos quais participaram. Nesta etapa de laboratório utilizamos 24 indivíduos, sendo 12 fêmeas, 11 machos e 1 cujo sexo não foi definido. Em média, os animais apresentaram peso de 140,4g (com desvio padrão de 33.4g) na data de captura e sua idade exata não pôde ser determinada, mas todos já tinham pelagem com coloração característica de animais adultos, durante os experimentos.

Logo após a chegada ao laboratório, os animais começaram a utilizar as rodas de atividade espontaneamente, em poucas horas ou dias. Registramos continuamente a atividade em roda durante todo o experimento, para visualização do ritmo diário de atividade-reposo de cada indivíduo. Cada roda permaneceu acoplada a uma chave que fechava um circuito elétrico sempre que uma revolução era completada. O circuito foi conectado a um sistema de coleta de dados ArChron (Simonetta System, Universidad Nacional de Quilmes, Buenos Aires, Argentina), ligado a um computador, que registrou, automaticamente, o número de revoluções na roda de cada indivíduo, a cada intervalo de 5 minutos.

Tabela 3.1 – Informações sobre os animais que participaram dos experimentos de campo e laboratório

Código de identificação	Informações gerais			Experimentos											
	Data de captura (dd/mm/aa)	Peso(g)*	Sexo	Campo			Lab 1ª etapa		Lab 2ª etapa		Lab 3ª etapa		Lab 4ª etapa		
				1ª obs.	2ª obs.	3ª obs.	CE 1:23	Pulso	CE 1:23	Pulso	CE 1:23	Pulso	CE 1:23	Pulso	
# 07	17/09/07	-	♂	-	-	-	X	X	X	X	X	X	X	X	
# 13	18/10/07	170,00	♂	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
# 18	29/06/08	173,55	♂	-	-	-	X	X	-	-	-	-	-	-	
# 19	02/07/08	145,00	♂	-	-	-	X	X	X	X	X	X	X	X	
# 24	16/07/08	128,65	♂	-	-	-	X	X	-	-	-	-	-	-	
# 40	17/02/09	-	♀	-	-	-	X	X	X	-	-	-	-	-	
# 50	02/12/09	170,00	♂	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	
# 51	06/02/09	146,41	♀	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	
# 52	08/12/09	62,00	♂	-	-	-	X	X	-	-	-	-	-	-	
# 57	19/02/10	99,30	♀	-	-	-	X	X	X	X	X	X	X	X	
# 60	06/03/10	116,00	♀	-	-	-	X	X	X	X	X	X	X	X	
# 64	04/04/10	124,89	♂	-	-	-	X	X	X	X	X	X	X	X	
# 65	04/04/10	126,33	♂	-	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
# 66	04/04/10	150,00	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	
# 67	06/04/10	131,00	♂	-	-	-	X	X	X	X	X	X	X	X	
# 68	06/04/10	132,60	♂	-	X	-	X	X	-	-	-	-	-	-	
# 69	20/04/10	220,00	♀	-	-	-	-	X	X	X	X	X	X	X	
# 72	09/06/10	142,80	♂	-	-	-	-	-	X	X	X	X	X	X	
# 75	16/06/10	-	♂	-	-	-	-	-	X	X	X	X	X	X	
# 76	09/07/10	-	♀	-	-	-	-	-	X	X	X	X	X	X	
# 77	12/07/10	-	♀	-	-	-	-	-	X	X	X	X	X	X	
# 80	06/08/10	-	♀	-	-	-	-	-	-	X	X	X	X	X	
# 81	08/08/10	159,78	♀	-	-	-	-	-	X	X	X	X	X	X	
# 82	11/08/10	128,47	♀	-	-	-	-	-	X	X	X	X	-	-	
# 83	16/08/10	-	♀	-	-	-	-	-	-	X	X	X	-	-	
Total de indivíduos (n)				1	1	1	14	14	15	16	16	16	14	14	

Um condicionador de ar (Conqueror Split, 5800FC) foi usado para controlar as condições térmicas do biotério, evitando assim a presença de ciclos diários de temperatura, a qual foi mantida em $24 \pm 1^\circ\text{C}$. O biotério também permaneceu completamente isolado das condições externas de iluminação, de modo que as informações luminosas percebidas pelos animais eram originárias de fontes de luz artificiais: 3 lâmpadas incandescentes vermelhas conectadas a um *dimmer* (Teclastar Milano, 200W) e 2 lâmpadas fluorescentes brancas posicionadas sobre as gaiolas. Todos os animais foram submetidos, simultaneamente, aos mesmos tratamentos de iluminação. Para facilitar a limpeza e a alimentação, as lâmpadas vermelhas permaneceram ligadas em baixa intensidade ($< 1 \text{ lux}$) durante todo o experimento. Em sobreposição a essa luz tênue de fundo, as lâmpadas fluorescentes brancas foram usadas para definir as condições experimentais de “claro” (lâmpadas fluorescentes acesas, aproximadamente 1000 lux) e “escuro” (lâmpadas fluorescentes apagadas).

3.2.2 Tratamentos da CRF

A Curva de Resposta de Fase pode ser obtida a partir de diferentes protocolos (Aschoff, 1965), mas a metodologia mais aceita é aquela descrita na introdução deste capítulo (Fig. 3.5), que consiste em deixar o animal inicialmente em escuro constante (EE), ministrar um pulso de luz em um horário pré-determinado, e voltar o animal para EE; o deslocamento de fase é obtido comparando-se a fase do ritmo em EE antes do pulso com a fase em EE após o pulso. Cada repetição deste protocolo (EE, pulso, EE) fornece 1 ponto para a CRF.

Em razão do longo tempo demandado pelo experimento, a CRF é, em geral, construída a partir de estudos transversais, ou seja, com vários indivíduos, cada 1 recebendo o estímulo luminoso em um momento diferente do seu tempo circadiano, até que o máximo de fases tenha sido contemplada. Nosso número relativamente baixo de tuco-tucos não permitiu que todas as fases do tempo circadiano fossem cobertas em uma única rodada do experimento (EE, pulso, EE) e, por isso, o grupo de animais foi submetido a três repetições deste protocolo. A tabela 3.1 indica quantos e quais indivíduos participaram de cada etapa da CRF.

Tabela 3.2 – Descrição das 3 repetições do protocolo para a Curva de Resposta de Fase.

	Duração das etapas (dias)			Horário de início do pulso
	CE 1:23	EE pré-pulso	EE pós-pulso	
1ª repetição	42	31	37	1:00
2ª repetição	28	28	29	14:00
3ª repetição	27	28	28	13:00

Como tratamento prévio a cada uma das três repetições do protocolo, os animais foram inicialmente submetidos a um ciclo claro-escuro diário com 1 hora de claro e 23 horas de escuro (CE 1:23), para que os osciladores de todos os indivíduos estivessem em um mesmo estado inicial, antes de se iniciar o EE pré-pulso. Em cada rodada, o pulso de luz da CRF foi aplicado simultaneamente em todos os animais e consistiu em deixar as lâmpadas fluorescentes acesas por 1 hora. Na tabela 3.2 estão indicados o horário do pulso e a duração das 4 etapas em cada repetição do protocolo (CE 1:23 → EE → pulso → EE). Como referência para o horário do pulso, utilizamos o acender das luzes, ou seja, o início do estímulo luminoso. Após a 3ª repetição, os animais voltaram para um regime CE 1:23 por mais 29 dias.

3.2.3 Cálculo da hora circadiana na qual o pulso foi recebido (abscissa da CRF)

Os ritmos circadianos em livre-curso têm sempre um período diferente de 24 horas. Ou seja, nessas condições, os eventos “diários” do ritmo não se repetem sempre no mesmo horário do nosso relógio, mas sim um pouco mais cedo ou um pouco mais tarde a cada dia, se o período for menor ou maior de 24 horas, respectivamente. Para um animal com τ de 25 horas, por exemplo, o início da atividade acontece 1 hora mais tarde a cada dia.

O pulso de luz da Curva de Resposta de Fase foi ministrado quando os animais estavam em livre-curso. Como cada indivíduo possui um valor de τ diferente em EE, aconteceu uma defasagem inter-individual dos ritmos ao longo dos dias. Dessa forma, por mais que o pulso tenha sido aplicado simultaneamente para todos os animais,

cada um recebeu o estímulo em alguma fase diferente do seu ritmo de atividade-reposo: alguns no início da atividade, outros no fim da atividade, outros no meio da fase inativa, etc.

Para integrar os dados de todos os animais e construir o gráfico da CRF, precisamos saber exatamente o horário “relativo” em que cada animal recebeu o pulso ministrado. Esse horário “relativo” foi determinado com base em uma escala de tempo normalizada a partir do período e da fase do ritmo de atividade-reposo, denominada **tempo circadiano**. O cálculo da fase do tempo circadiano em que cada indivíduo recebeu o pulso se baseia em duas premissas:

1. Cada indivíduo, independentemente do valor do período em livre-curso (τ), tem seu período constituído de 24 partes iguais: 24 **horas circadianas**. Portanto, se dividirmos o valor de τ de cada indivíduo por 24, obtemos a duração de 1 **hora circadiana** para cada animal.
2. O início da atividade de animais noturnos, como o tuco-tuco, é considerado o início da noite subjetiva, porque em um regime claro-escuro CE 12:12, animais noturnos iniciam sua atividade quando as luzes se apagam (Johnson, 1999). Por definição, o início da noite subjetiva é a **hora circadiana 12** (HC 12). Portanto, os animais que estavam no início da atividade no momento do pulso de luz, receberam o estímulo na hora circadiana 12.

Com base nas premissas, para descobrir em que fase do tempo circadiano os animais em livre-curso receberam o pulso de luz, calculamos o intervalo de tempo entre o horário do início de atividade (HC 12) e o horário do pulso, convertemos este valor para uma medida em horas circadianas e somamos à HC 12. A hora circadiana do pulso, determinada a partir deste cálculo, é o valor colocado no eixo x da CRF.

3.2.4 Cálculo do deslocamento de fase (ordenada da CRF)

Para comparar o ritmo de atividade-reposo pré-pulso de luz com o ritmo pós-pulso, foram usados como fase de referência os inícios de atividade de cada dia. Com os ritmos representados em actogramas, linhas de tendência foram ajustadas visualmente através dos inícios de atividade de vários dias antes do pulso e vários dias depois do pulso (Figura 3.6). Os deslocamentos foram calculados comparando-se as duas linhas de tendência. Mais precisamente, o deslocamento de fase ($\Delta\phi$) corresponde à diferença entre os horários em que as duas linhas, correspondentes aos inícios de atividade, atingem o dia do pulso de luz.

Após o pulso, normalmente acontecem ciclos transientes por alguns dias, até que o ritmo assuma um novo período estável (Johnson, 1999). Por essa razão, a linha de tendência dos inícios de atividade pós-pulso foi traçada desconsiderando-se os primeiros dias de dados em EE pós-pulso. Foram incluídos apenas os dias em que o ritmo já havia assumido um novo estado estável.

3.2.5 Análise de dados.

Os deslocamentos de fase, em função do horário circadiano de cada pulso, foram dispostos no gráfico da Curva de Resposta de Fase. Para melhor visualização, construímos também um gráfico com as médias e os desvios padrões dos deslocamentos de fase a cada intervalo de 3 horas circadianas.

Todos os actogramas, bem como as análises de período e os cálculos de deslocamento de fase foram feitos no programa El Temps (A. Díez-Noguera, Universitat de Barcelona, 1999). Os demais gráficos foram construídos no programa Microsoft Excel (2007).

Para calcular o valor do período em livre-curso, foi utilizada a ferramenta do programa El Temps que permite ajustar visualmente uma regressão linear através dos inícios de atividade de dias consecutivos, em um ritmo exposto no actograma. Com base na inclinação da linha ajustada, o programa retorna um valor em minutos, correspondente ao período do ritmo.

3.3 Resultados

A figura 3.6 apresenta o ritmo de atividade-reposo, em roda de atividade, de um animal representativo (#77), submetido às condições experimentais do protocolo da Curva de Resposta de Fase. Inicialmente, dos dias 1 a 27, o animal foi mantido sob um ciclo claro-escuro CE 1:23. Nota-se que o início e o fim da atividade se ajustaram gradualmente ao ciclo, ao longo de transientes que se estenderam até o dia 14. A partir de então, o bloco de atividade estabilizou em um horário fixo, até o final do ciclo CE (dia 27). A recorrência da atividade, sempre no mesmo horário a cada dia, caracteriza um período de 24 horas. Podemos verificar, dessa forma, que o oscilador circadiano foi arrastado pelo ciclo claro-escuro, como já era esperado segundo o trabalho anterior do grupo (Valentinuzzi *et al.*, 2009). O arrastamento de todos os animais como tratamento prévio ao experimento foi importante para garantir que quaisquer diferenças de resposta entre indivíduos não fossem decorrentes de estados diferentes do oscilador circadiano, decorrentes de “pós-efeito” da sincronização anterior (Pittendrigh & Daan, 1976a).

Figura 3.6 – Actograma do ritmo de atividade-reposo de um tuco-tuco representativo, submetido ao protocolo da Curva de Resposta de Fase. Dias 1 a 27: CE 1:23 – ciclo claro-escuro diário com 1 hora de claro e 23 horas de escuro. O retângulo desenhado sobre os dias delimita a fase e claro do ciclo CE, que acontece às 9 horas. A partir do dia 28: EE – escuro constante. $\Delta\phi$ – deslocamento de fase. Círculo – momento do pulso de luz (1h, 1000 lux). Tracejados grosso e fino – tendências dos inícios de atividade antes e depois do pulso, respectivamente. O código de identificação do animal está indicado acima do gráfico, à direita.

O mesmo indivíduo foi transferido para o regime de escuro constante (Fig. 3.6, EE) e seu ritmo de atividade-reposo passou a assumir um período maior que 24 horas. Isso é evidente pelo deslocamento diário do bloco de atividade que se

apresenta mais tarde a cada dia. O ritmo, portanto, entrou na condição de livre-curso, expressando o período intrínseco (τ) do oscilador circadiano endógeno.

No dia 52, o estímulo luminoso (círculo) foi ministrado às 14:00 do horário do laboratório e, já no dia seguinte ao estímulo, tanto o início quanto o final da atividade se deslocaram para horários anteriores àqueles esperados pelo padrão que o ritmo vinha seguindo nos dias precedentes, o que caracteriza um deslocamento de fase.

Na figura 3.7 estão representados outros três exemplos de tuco-tucos submetidos ao mesmo protocolo, focando nos dias em EE. Nota-se que, em cada caso, o pulso de luz ministrado no dia 29 foi recebido pelo animal em uma fase diferente dentro do seu ritmo de atividade-reposo. Como esperado, cada situação resultou em um deslocamento de fase diferente. No actograma da esquerda, o animal recebeu o pulso no final da atividade, e a fase do seu ritmo se deslocou para “mais cedo”, ou seja, houve um adiantamento de fase. No actograma do meio, o pulso coincidiu com o início da atividade e deslocou a fase do ritmo para “mais tarde”, o que representa um atraso de fase. Por sua vez, no actograma da direita as luzes se acenderam em um horário logo anterior ao início da atividade e não houve deslocamentos de fase.

Os outros animais que participaram das etapas da Curva de Resposta de Fase receberam pulsos de luz em diferentes momentos do seu ritmo de atividade-reposo e apresentaram diferentes deslocamentos de fase. As figuras 3.8 e 3.9 apresentam em forma de actogramas os dados de todos os tuco-tucos testados. Com base nesses dados construímos a Curva de Resposta de Fase (CRF) do tuco-tuco (Figura 3.10). Os pontos referentes aos ritmos da figura 3.7 estão apontados no gráfico, com setas. Pontos pretos na CRF são dados de deslocamentos de fase que foram facilmente calculados, graças à estabilidade dos ritmos dos tuco-tucos testados (Figura 3.8 e Figuras 3.6 e 3.7). Em contrapartida, muitos tuco-tucos apresentaram instabilidade de fase, ou período, durante os momentos de livre-curso em pelo menos uma das etapas do experimento, o que dificultou o cálculo do deslocamento de fase (Figura 3.9, superior). Os dados destes animais estão representados em cinza na CRF (Figura 3.10). Outros oito dados não foram contabilizados devido à impossibilidade de cálculo de deslocamentos de fase, dada a tamanha instabilidade dos ritmos ou ambiguidade da resposta (Figura 3.9, inferior).

Figura 3.7 – Actogramas mostrando os três tipos diferentes de deslocamentos de fase no ritmo de atividade-reposo de tuco-tucos, causados por pulsos de luz em diferentes horários circadianos. O valor absoluto dos deslocamentos está indicado acima dos gráficos, à esquerda. Outras especificações como na figura 3.6.

Dados considerados

Figura 3.8 – Actogramas dos dados usados para construção da CRF. Eixos, não representados, são os mesmos que os da figura 3.7. Outras especificações como na figura 3.6.

Dados duvidosos

Dados desconsiderados

Figura 3.9 – Actogramas dos ritmos que apresentaram instabilidade nas fases de referência. Acima: dados considerados para construção da CRF. Abaixo: dados que não foram considerados para a construção da CRF. Eixos, não representados, são os mesmos que os da figura 3.7. Outras especificações como na figura 3.6.

As características gerais da curva são as mesmas de todas as espécies estudadas até hoje. Pulsos de luz ministrados no início da noite subjetiva (HC 12) até aproximadamente o meio da noite subjetiva (HC 20) resultam em atrasos de fase. Pulsos ministrados do meio da noite subjetiva até o começo do dia subjetivo (HC 20 a 4) resultam em adiantamentos de fase. Por fim, pulsos ministrados no restante do dia subjetivo (HC 4 a 12) provocam deslocamentos de fase pequenos ou nulos. Como esperado, a posição da curva em relação à fase de atividade é condizente com a de um animal noturno. A soma das médias dos adiantamentos (entre HC 21 e HC 6) é maior

que a soma das médias dos atrasos (entre HC 12 e HC 21), indicando uma maior predominância da região de adiantamentos na curva.

Curva de Resposta de Fase do tuco-tuco

Figura 3.10 – Curva de Resposta de fase do tuco-tuco. Acima dos gráficos está uma representação do ritmo de atividade-reposo no momento do pulso. A = atividade, R = repouso. Esquerda: dados confiáveis (círculos pretos) e duvidosos (círculos cinza) dos deslocamentos de fase. Setas cinza destacam os dados referentes aos ritmos da figura 3.7. Direita: média e desvio dos deslocamentos a cada 3 horas circadianas. h = horas. hc = horas circadianas.

3.4 Conclusões

Nossos dados indicam que os tuco-tucos possuem um oscilador circadiano que responde a estímulos luminosos com deslocamentos de fase qualitativamente semelhantes aos deslocamentos obtidos com outras espécies não subterrâneas, publicados na literatura (Daan & Pittendrigh, 1976; Johnson, 1999). A magnitude e o sentido da resposta são dependentes da fase em que o estímulo acontece, o que é essencial para que um oscilador circadiano possa ser arrastado por ciclos CE. Nesse sentido, as características apresentadas pela CRF dos tuco-tucos estão de acordo com

o fato de eles serem arrastados pelo ciclo CE 12:12 (Valentinuzzi *et al.*, 2009) e pelo ciclo CE 1:23 (capítulo 4).

Vale destacar que a posição relativa dos atrasos e adiantamentos ao longo do tempo circadiano é uma característica bastante conservada entre espécies de diversos grupos e parece ser uma “necessidade analítica”, intrínseca ao funcionamento de qualquer oscilador circadiano (Pittendrigh & Daan, 1976b).

No próximo capítulo, exploraremos melhor o significado da Curva de Resposta de Fase e seu papel na determinação do arrastamento do oscilador circadiano por ciclos claro-escuro.

Capítulo 4. Trabalho de laboratório parte 2:

Arrastamento

4.1 Introdução

No capítulo anterior demonstramos que tuco-tucos mantidos em laboratório apresentam deslocamentos de fase do ritmo de atividade-reposo em resposta a estímulos luminosos. A magnitude e a direção desses deslocamentos são variáveis e dependem da fase do ritmo de atividade-reposo em que o estímulo luminoso é aplicado. Acessamos os deslocamentos em diferentes fases e os representamos na Curva de Reposta de Fase (CRF).

Neste capítulo explicaremos com mais detalhes as implicações da CRF para o processo de arrastamento e verificaremos se é possível prever padrões de arrastamento com base na CRF.

4.1.1 Significado da CRF

Quando um organismo tem seus ritmos biológicos sincronizados por um ciclo ambiental, as fases do ritmo são alocadas em determinadas fases do ciclo. Por exemplo, um roedor noturno sob ciclo claro-escuro CE 12:12 apresenta a fase de atividade do ritmo de atividade-reposo posicionada na fase de escuro do ciclo claro-escuro (Figura 4.1, gráfico superior). Ou, mais especificamente, a fase de início da atividade diária normalmente acontece na fase de início do escuro. Essa medida da posição de uma fase do ritmo em relação a uma fase do ciclo ambiental é definida como a **relação de fase** entre os dois eventos.

A relação de fase entre a atividade e o ciclo de iluminação pode ser diferente entre indivíduos de uma mesma população. Por exemplo, alguns indivíduos noturnos podem começar a atividade um pouco mais tarde ou um pouco mais cedo que o início da fase de escuro do ciclo CE (Fig. 3.5, gráficos do meio e inferior). Essas diferenças são explicadas por particularidades de cada indivíduo no processo de arrastamento do

oscilador circadiano, que depende tanto do período em livre-curso (τ), quanto da variação temporal de sensibilidade do oscilador à luz, indicada pela CRF.

Figura 4.1 – Diferentes relações de fase entre o ciclo claro-escuro e o ritmo diário de atividade-repouso de um animal noturno hipotético. A atividade diária pode se iniciar logo que as luzes se apagam (gráfico superior), ou depois (gráfico do meio), ou antes (gráfico inferior) desse momento. Acima dos gráficos, barras brancas e pretas delimitam as fases de escuro e claro, respectivamente. Linhas verticais tracejadas indicam a fase de início do escuro.

Podemos entender isso pensando em indivíduos com τ 's diferentes sob um ciclo CE simplificado, como o ciclo de pulsos de luz periódicos CE 1:23. Na figura 3.4 do capítulo anterior, por exemplo, o ritmo de um indivíduo em EE expressa seu τ de 22 horas, mas quando submetido ao ciclo CE 1:23, é sincronizado e passa a assumir um período de 24 horas. Como os pulsos periódicos modificam o período do ritmo? Interpretamos que, a cada dia, o pulso de luz atrasa em 2 horas o ritmo, compensando diariamente a diferença entre τ de 22 horas e as 24 horas do ciclo CE.

Pensemos agora em um indivíduo cujo ritmo expressa um τ diferente em EE, por exemplo, 23,5 horas. No arrastamento pelo ciclo CE 1:23, seu período também é de 24 horas, assim como o indivíduo do exemplo anterior. Porém, os pulsos diários de

luz devem agir de forma diferente, atrasando o ritmo em apenas 30 minutos a cada dia, para compensar a diferença entre τ e as 24 horas do ciclo CE.

Segundo o perfil de resposta do oscilador à luz ao longo do dia (Curva de Resposta de Fase), esses diferentes deslocamentos (2 horas ou 30 minutos) são alcançados quando a luz atinge diferentes horários do tempo circadiano (Fig. 3.5B), ou seja, diferentes fases do ritmo de atividade-reposo.

Por consequência, em uma situação de arrastamento estável, o ritmo de atividade-reposo se posiciona em uma relação de fase com o ciclo CE 1:23, tal que o estímulo luminoso diário acaba acontecendo no momento exato do tempo circadiano em que a luz promove o deslocamento necessário para compensar a diferença entre o valor de τ e as 24 horas. Dessa forma, quando indivíduos com diferentes valores de τ têm seus osciladores arrastados, cada um assumirá uma relação de fase diferente com o ciclo ambiental.

Segundo essa teoria, então, a relação de fase, entre o ritmo de atividade-reposo e o ciclo CE, depende do período em livre-curso e da CRF. Logo, seria possível prever o valor da relação de fase com base nessas duas propriedades do sistema circadiano. Para testar a validade desta previsão nos tuco-tucos, medimos a relação de fase experimental entre o ritmo de atividade-reposo e o ciclo CE 1:23, e comparamos com a relação de fase prevista segundo a CRF e o τ obtidos.

4.2 Material e Métodos

O período de livre-curso (τ) dos tuco-tucos estudados foi calculado com base nos dados das três etapas de escuro constante (EE) pré-pulso do protocolo da CRF (Capítulo 3). Para os indivíduos que participaram de mais de uma etapa da CRF, consideramos o valor médio entre as etapas como seu τ representativo.

Para acessar a relação de fase experimental, utilizamos os dados dos ritmos sob CE 1:23. Ao todo foram 4 repetições deste ciclo, considerando as três réplicas do protocolo da Curva de Resposta de Fase mais o ciclo claro-escuro administrado no final do experimento (Material e Métodos do capítulo 3).

Com base nos últimos 5 dias em CE 1:23 de cada animal e em cada repetição do protocolo, definimos duas fases de referência – os horários de início e fim da atividade diária – e comparamos com o horário do pulso periódico do ciclo CE. Os horários de início e fim da atividade não foram medidos a partir de actogramas, como fizemos com as fases de referência do capítulo 3.

Ao invés disso, retomamos os dados brutos de medida da atividade (número de revoluções na roda / 5 minutos) e construímos gráficos “forma de curva” (*waveform*), representando o nível de atividade em função do horário do dia. A partir dessa curva, construída com base na média dos 5 dias, foi traçada uma linha horizontal correspondente ao nível médio da atividade diária. Consideramos como o início da fase de atividade o momento após o repouso em que o nível de atividade ultrapassou pela primeira vez essa linha correspondente à média, e se manteve sustentado acima dela. O mesmo procedimento, porém com a lógica inversa, foi usado para determinar o fim da atividade: o momento em que o nível da atividade diminuiu para valores abaixo da linha média, após permanecer por várias horas acima desta. Nos casos ambíguos, a análise visual dos ritmos em actogramas foi usada para ajudar a decidir os horários de início e fim da atividade.

Para indivíduos que participaram de mais de uma repetição do ciclo CE 1:23, medimos todos os horários de início e fim de atividade e calculamos o horário médio entre as repetições.

Todos os actogramas, bem como as análises de período e os cálculos de relação de fase foram feitos no programa El Temps (A. Díez-Noguera, Universitat de Barcelona, 1999). Os demais gráficos foram construídos no programa Microsoft Excel (2007).

Para calcular o valor do período em livre-curso, foi utilizada a ferramenta do programa El Temps que permite ajustar visualmente uma regressão linear através dos inícios de atividade de dias consecutivos, em um ritmo exposto no actograma. Com base na inclinação da linha ajustada, o programa retorna um valor em minutos, correspondente ao período do ritmo.

4.3 Resultados

4.3.1 Valor do τ e previsão da relação de fase

Juntando-se os τ 's medidos nas três etapas da CRF, calculados com base no ritmo em EE pré-pulso (ex: para o animal #77, tracejado grosso na figura 3.6), chegamos à distribuição de períodos apresentada na figura 4.2. A maioria dos τ se concentra na faixa de períodos entre 24 horas e 24 horas e 30 minutos, sendo o período médio igual a 24 horas e 15 minutos.

Figura 4.2 – Distribuição dos valores de período em livre-curso (τ) dos tuco-tucos, medidos durante o experimento da CRF. Para cada indivíduo foi usado o valor médio, calculado entre as três etapas do experimento.

A maioria dos períodos em livre-curso é maior que 24 horas e, portanto, para que os ritmos atinjam um arrastamento estável ao ciclo de período 24 horas, devem sofrer adiantamentos diários que compensem a diferença entre o período do ciclo ($T=24h$) e o período do ritmo (τ). De acordo com a CRF do tuco-tuco, os horários do tempo circadiano nos quais pulsos de luz provocam adiantamentos de fase estão localizados entre a HC 20 e a HC 04, intervalo que corresponde ao meio/fim da fase de atividade (Fig. 3.10). Podemos prever, então, que um tuco-tuco submetido a um ciclo CE 1:23, após passar por transientes, chegaria no arrastamento estável do seu oscilador circadiano, quando o estímulo luminoso diário coincidissem com a fase entre o meio e o fim da atividade, promovendo uma resposta que compensa a diferença entre T e τ .

4.3.2 Relação de fase experimental

Resta por fim averiguar se a relação de fase prevista segundo o τ e a CRF condizem com os dados experimentais. Para tanto calculamos a relação de fase entre o ritmo de atividade-reposo e o ciclo de iluminação de todos os animais que atingiram arrastamento estável sob os regimes CE 1:23.

Figura 4.3 – Arrastamento dos tuco-tucos pelo ciclo CE 1:23. Actogramas do ritmo de atividade-reposo apresentam o arrastamento gradual ao longo dos dias, sob o ciclo de iluminação. Barras brancas verticais indicam o horário da fase de claridade do ciclo. Acima de cada actograma está indicado o código de identificação do animal correspondente. Abaixo de cada actograma, setas de duas cabeças indicam a fase de início e a fase de fim da atividade, com base nos últimos 5 dias de dados, no arrastamento estável.

Alguns actogramas representativos do arrastamento estão apresentados na figura 4.3. Nos primeiros dias sob este ciclo CE, os ritmos apresentam ciclos “transientes”, ou seja, a fase de atividade se desloca por diferentes horários do dia, até que o ritmo assume um período de 24 horas e a atividade atinge uma posição estável em relação ao ciclo CE. Abaixo de cada actograma, a setas de duas cabeças delimitam a posição da fase de atividade em relação ao ciclo CE, após estabilização do arrastamento.

Figura 4.4 – Relação de Fase entre o ritmo de atividade-reposo dos tuco-tucos e o ciclo CE 1:23, tomando-se como referência as fases de início e fim da atividade e do pulso de luz. Posição média da atividade de cada um dos tuco-tucos, averiguada a partir dos últimos 5 dias de arrastamento nas quatro rodadas de ciclo CE. As cabeças das setas delimitam o início e o fim da fase de atividade. Barras brancas verticais indicam o horário da fase de claridade. Ao lado de cada seta está indicado o código de identificação do animal correspondente. A última medida é a média de todos os indivíduos.

O mesmo procedimento foi utilizado para verificar a posição da atividade no arrastamento estável, em todos os outros tuco-tucos testados. A figura 4.4 resume os dados de todos os indivíduos, sob ciclo CE 1:23. Quando arrastados, alguns apresentam a atividade mais cedo e outros mais tarde, mas, em média, o

arrastamento se estabelece com o final da atividade posicionado no início do pulso de luz diário.

Em termos quantitativos, o estímulo luminoso está posicionado 9,6 horas antes (ou 14,4 horas depois) da média dos inícios da atividade, o que, em uma situação de livre-curso, corresponderia à hora circadiana 2,4. Esse momento do tempo circadiano está dentro da faixa de horários prevista, de acordo com o τ e a CRF. Segundo a CRF, estímulos luminosos nesta fase provocam pequenos adiantamentos de fase (Fig. 3.10), que compensariam o valor de τ maior que 24 horas. Portanto concluímos que, na média do grupo de tuco-tucos, a relação de fase experimental está de acordo com a previsão.

Do ponto de vista individual também podemos fazer algumas previsões. Se a relação de fase depende do valor de τ e da CRF, podemos prever, por exemplo, que indivíduos com τ 's próximos devem apresentar relações de fase semelhantes com o ciclo CE. Além disso, se olharmos para a CRF (Fig. 3.10), a região de atrasos corresponde ao fim da fase inativa e início da fase de atividade. Conforme percorremos a curva para a “esquerda”, em direção à zona morta e além, os atrasos diminuem e começam os adiantamentos cada vez maiores. Podemos prever então que, quanto maior o valor de tau do indivíduo, maiores os adiantamentos de fase necessários para compensar a diferença entre τ e T e, para isso, o estímulo luminoso deve estar posicionado mais próximo ao final da atividade.

Na figura 4.5 estão apresentados os mesmos dados da figura 4.4, porém organizados em função τ . Círculos pretos marcam os horários de início da atividade e círculos brancos marcam os horários de fim da atividade. Notamos que o fim da atividade apresenta uma tendência a se aproximar do pulso de luz, quanto maior o τ do indivíduo. Isso está de acordo com a CRF, visto que τ 's menores exigem atrasos ou adiantamentos pequenos (meio/fim da fase inativa) para atingir o arrastamento estável, ao passo que τ 's maiores precisam de adiantamentos grandes (início da fase inativa) para atingir o arrastamento estável.

As fases de início de atividade são menos regulares e não parecem depender tão claramente do valor de τ .

Então, pelo menos quanto à marcação dos finais de atividade, a relação de fase dos indivíduos está de acordo com as previsões segundo o τ e a CRF.

Figura 4.5 – Dependência entre τ e a relação de fase da atividade com o ciclo CE. O gráfico apresenta os momentos de início de atividade (círculos pretos) e fim da atividade (círculos brancos) em relação à fase de claridade do ciclo CE (barras brancas verticais), em função do valor do período em livre-curso (eixo das ordenadas).

4.4 Discussão

4.4.1 A relação entre τ e CRF

No que diz respeito ao valor do período em livre-curso, um trabalho anterior do grupo também reportou um τ médio maior que 24 horas, com o mesmo valor encontrado aqui, nos ritmos de 8 tuco-tucos mantidos em escuro-constante (Valentinuzzi *et al.*, 2009).

No estudo de Daan e Pittendrigh (1976) com quatro espécies de roedores noturnos, foi apontada uma correlação compensatória entre o valor de τ e o formato da CRF. Tanto entre espécies, como dentro de uma mesma espécie, animais com τ mais longo tendem a apresentar maiores adiantamentos de fase e menores atrasos de fase, ao passo que animais com τ 's mais curtos tendem a apresentar maiores atrasos de fase e menores adiantamentos de fase. Assim, quanto mais o período se distancia

em uma direção, mais os deslocamentos de fase causados pela luz tendem para a direção oposta. Os resultados que obtivemos com o tuco-tuco estão de acordo com essa tendência, visto que, em comparação com as quatro espécies estudadas por Daan e Pittendrigh (1976), os tuco-tucos possuem um τ longo e sua CRF é caracterizada por adiantamentos mais pronunciados que atrasos.

Os dados do presente capítulo indicam que essas duas propriedades, o τ e o padrão temporal de resposta à luz determinam a relação de fase do sistema circadiano com o ciclo claro-escuro nos tuco-tucos, pelo menos para um ciclo CE 1:23.

4.4.2 Arrastamento em campo

O ciclo CE 1:23 é apenas uma representação simplificada do ciclo CE natural. Poucos organismos se expõem a regimes de iluminação semelhantes a esse, na natureza, como é o caso de morcegos e escorpiões (ver Capítulo 2). O padrão temporal de exposição do tuco-tuco à luz é mais complexa, com mais horas de luz por dia, distribuídas por diferentes horários.

No capítulo 2 levantamos a questão sobre como os tuco-tucos poderiam manter a sincronização em campo apesar da sua exposição errática à luz. A primeira hipótese se baseia nas características da CRF. A dinâmica de reposta à luz, representada pelo formato da CRF, poderia ter alguma característica importante que facilitasse a sincronização frente à informação luminosa pouco regular em campo. Não há estudos na literatura da sincronização por regimes de iluminação como esses que registramos no tuco-tuco, para que possamos nortear a busca por especificidades no formato da CRF. Na verdade, poucos trabalhos exploraram como modificações na CRF podem influenciar no padrão de arrastamento, a exemplo de Pittendrigh e Daan (1976b), que utilizaram CRF virtuais de diferentes formatos e verificaram quais aspectos eram relevantes para o arrastamento em diferentes regimes CE. No capítulo seguinte, a questão do formato da CRF será retomada nas simulações computacionais que realizamos com um modelo matemático de oscilador.

Capítulo 5. Simulações computacionais

5.1 Introdução

No capítulo 2, descrevemos o padrão temporal de exposição à luz em campo do tuco-tuco, que consiste em episódios breves de exposição, distribuídos por diferentes horários da fase de claridade do ciclo claro-escuro natural. A cada dia, os horários dos episódios de exposição à luz podem mudar, mas sempre estão concentrados em uma faixa limitada de horários do dia. Na literatura encontramos que ciclos CE artificiais de laboratório, com poucas horas ou minutos de claro por dia, aqui chamados de ciclos de pulsos periódicos (capítulo 4) são suficientes para arrastar os osciladores circadianos de vários organismos (Pittendrigh & Minis, 1964; DeCoursey, 1972; Pittendrigh e Daan, 1976a). Isso é um indício de que um episódio diário de exposição à luz em campo, sempre no mesmo horário, pode funcionar como *Zeitgeber*. Porém, não há registros de estudos com episódios de exposição à luz em horários irregulares, que variam a cada dia.

Com o intuito de entender a dinâmica esperada para osciladores circadianos sob regimes temporais irregulares de exposição à luz, utilizamos o software Neurodynamix (Friesen & Friesen, 2009), um programa “user-friendly” desenvolvido para uso de cronobiólogos, que simula osciladores circadianos sujeitos a *Zeitgeber*. A simulação se baseia em um modelo matemático de oscilador, sincronizável por forçadores externos. Com base nos dados de campo e laboratório, tínhamos como objetivo inicial responder a três perguntas, relacionadas com as hipóteses levantadas no final do capítulo 2:

- I - Um regime temporal de exposição à luz semelhante àquele observado no tuco-tuco, em campo, arrastaria um oscilador circadiano?

II - Que características da resposta do oscilador a estímulos luminosos, Curva de Resposta de Fase, poderiam conferir um arrastamento mais estável sob este padrão temporal de exposição à luz?

III - A CRF do tuco-tuco possui características que favorecem a estabilidade do arrastamento fótico em campo?

5.1.1 Modelamento do ritmo de atividade-reposo

As variáveis do oscilador simulado, assim como a maioria das variáveis biológicas de um ser vivo, são representadas em forma de “onda” (Fig. 5.1A), com aumentos e diminuições periódicas de suas magnitudes, ao longo do tempo.

Figura 5.1 – Tradução do ritmo contínuo do oscilador para um ritmo discreto de atividade-reposo, segundo o modelo matemático do oscilador. A: expressão de uma variável que representa o estado do oscilador central, ao longo do tempo. B: Ritmo de atividade-reposo gerado a partir da variável do oscilador central. O modelo considera como atividade (B), todas as fases em que a variável do oscilador central (A) ultrapassa o valor de referência, representado pela linha horizontal vermelha. Círculos brancos apontam os momentos em que a variável do oscilador cruza com a linha de referência, correspondentes às transições entre atividade e repouso.

O ritmo de atividade-reposo que estudamos no tuco-tuco, no entanto, não se aproxima desse formato de onda. A atividade e o repouso são praticamente uma variável discreta, no formato sim/não. Por isso, o modelo que utilizamos no software Neurodynamix gera um ritmo no formato discreto a partir do formato de onda que observamos na figura 5.1A. O modelo estabelece um valor de referência para a variável do oscilador e considera como “atividade” todas as fases em que a variável estiver acima deste valor (Fig. 5.1B). Complementarmente, as fases em que a variável está abaixo do valor de referência constituem a fase de “repouso” do ritmo.

Esta proposta bastante intuitiva do modelo pode não estar tão distante do mecanismo biológico pelo qual o ritmo de atividade-reposo é gerado a partir do oscilador circadiano central. Em um estudo com camundongos, Houben e col. (2009) acompanharam uma variável fisiológica do oscilador circadiano central (a atividade elétrica geral da população neuronal que compõe os Núcleos Supraquiasmáticos) juntamente com o ritmo de atividade, e encontraram uma coincidência temporal das fases do início e o fim da atividade do animal com as fases de referência da variável do oscilador biológico.

5.1.2 Simulações do arrastamento em campo

As simulações foram introduzidas no projeto em um momento quando ainda não havíamos terminado de coletar os dados de laboratório e de campo, logo, não tínhamos referências para orientar o tipo de oscilador e regime luminoso a serem simulados. Em decorrência disso, os protocolos iniciais foram idealizados como um estudo mais amplo, sem focar diretamente nos dados apresentados nos capítulos anteriores. Pelos relatos da população local e algumas observações pontuais, já tínhamos indícios de que os animais saíam das tocas em horários variados ao longo do dia. Quanto à Curva de Resposta de Fase do tuco-tuco, não tínhamos como prever as especificidades no seu formato. Com isso, decidimos simular osciladores com diferentes formatos de CRF e os submetemos a diferentes regimes luminosos.

Com base na incerteza dos horários de exposição à luz em campo, testamos regimes luminosos com exposições em horários aleatórios, porém sempre restritos à

fase de claro do ambiente. Exploramos uma gradação, partindo de regimes com exposições em horários mais concentrados no tempo até regimes com exposição mais dispersa ao longo das 12 horas de claro. Buscamos assim cobrir uma ampla gama de possibilidades e prever quais tipos de respostas à luz (CRF) e quais tipos de regimes de exposição levariam a um arrastamento estável do oscilador. Conforme obtivéssemos os dados de campo e de laboratório, poderíamos compará-los com as previsões matemáticas, para entender se o oscilador dos tuco-tucos é arrastado pelo padrão temporal de iluminação percebido em campo.

5.1.3 A amplitude da CRF

No capítulo 3 foi descrito o formato geral das Curvas de Respostas de Fase das espécies já estudadas até hoje (Fig. 3.5), que também é observado na CRF do tuco-tuco (Fig. 3.10). Há sempre uma região de atrasos de fase, seguida de uma região de adiantamentos de fase e uma zona morta.

No presente capítulo, simulamos dois osciladores diferentes, cujas CRFs apresentam este mesmo formato qualitativo, mas que diferem na magnitude dos deslocamentos de fase. Um dos osciladores responde com pequenos deslocamentos de fase a estímulos luminosos e o outro, com grandes deslocamentos de fase. Essas diferenças na intensidade da resposta correspondem à amplitude da CRF. A amplitude da CRF foi uma primeira abordagem para responder a pergunta número 2 apontada no início deste capítulo, que havia ficado em aberto no capítulo anterior.

A magnitude dos deslocamentos de fase em resposta à luz é uma característica que varia mesmo nos sistemas biológicos: espécies diferentes submetidas a pulsos de luz de mesma intensidade luminosa podem apresentar CRFs com diferentes amplitudes (Daan & Pittendrigh, 1976). Em casos extremos, a magnitude da resposta pode ser tão grande, que ocorre uma descontinuidade entre a zona de atrasos e adiantamentos, no meio da noite subjetiva. A figura 5.2 (direita) ilustra uma curva desse tipo, que é, por convenção, denominada **CRF tipo 0** (Winfree, 1986). Em oposição a ela, a CRF que apresenta uma transição gradual entre atrasos de fase e adiantamentos de fase na noite subjetiva (Figs. 5.2, esquerda), é denominada **CRF tipo 1**.

Diferenças na amplitude da CRF também podem ser obtidas em uma única espécie, por manipulações nas características do estímulo luminoso. Quanto mais intenso ou duradouro o estímulo, maiores os deslocamentos de fase e, portanto, mais ampla a CRF (Pittendrigh, 1981).

Fig. 5.2 – Representação de CRFs hipotéticas do tipo 1 (esquerda) e do tipo 0 (direita). Atente para os grandes deslocamentos de fase da CRF tipo 0, que chegam ao extremo de 12 horas. Outra característica importante é a transição brusca entre atrasos (em laranja) e adiantamentos (azul) no meio da noite subjetiva. Para maiores detalhes sobre a CRF, ver capítulo 3.

5.1.4 Modelo de oscilador

Dentro do programa NeuroDynamix (Friesen & Friesen, 2009), as simulações computacionais foram realizadas na extensão CircadianDynamix, que permite acompanhar diferentes variáveis do oscilador matemático, tanto na forma de “onda”, quanto na forma de actogramas.

O programa utiliza um modelo de oscilador do tipo ciclo-limite (Glass & Mackey, 1988), desenvolvido por Pavlidis e Pittendrigh (Pavlidis, 1967; Pittendrigh *et al.*, 1991). Semelhante ao que se observa em osciladores circadianos biológicos, os osciladores ciclo-limite também respondem a estímulos com deslocamentos de fase. Após uma perturbação, sua amplitude é temporariamente modificada, e a fase pode apresentar atrasos, adiantamentos ou deslocamentos nulos.

O oscilador de Pavlidis/Pittendrigh é regido pelas duas equações:

$$dR/dt = R - cS - bS^2 + (d - L) + K$$

$$dS/dt = R - aS$$

As variáveis **R** e **S** expressam o estado do oscilador e se modificam periodicamente ao longo do tempo t , com aumentos e diminuições (Fig. 5.3); são, portanto, chamadas **variáveis de estado**. Em uma aproximação grosseira aos sistemas biológicos, essas variáveis seriam equivalentes a variáveis fisiológicas medidas diretamente no oscilador circadiano central.

O parâmetro **L** representa o nível simulado de “iluminação” a cada momento: quando estiver em zero, representa uma condição de escuro; se estiver em valores positivos, será equivalente a uma condição de claro (Fig. 5.3). O valor (amplitude) deste parâmetro é, portanto, equivalente à intensidade luminosa, de modo que diferentes ciclos de iluminação podem ser gerados por modificações periódicas no valor de L .

Figura 5.3 – Variáveis do modelo do oscilador de Pavlidis/Pittendrigh. R e S são variáveis de estado, que oscilam ao longo do tempo. A variável L representa o nível de iluminação. Na figura, acontece um “pulso de luz” no dia 3, representado pelo aumento pontual no valor de L . A amplitude da oscilação é levemente modificada após o pulso, mas logo volta ao estado inicial.

De forma análoga ao que se observa com ritmos circadianos, o oscilador usado nas simulações expressa seu período próprio quando mantido em “condições constantes”. Se exposto a estímulos periódicos, entra em arrastamento. Os estímulos causam deslocamentos de fase periódicos que compensam a diferença entre o período intrínseco do oscilador (τ) e o período dos estímulos (Fig 5.4). Esse oscilador, portanto, também apresenta uma Curva de Resposta de Fase.

Figura 5.4 – Livre-curso e arrastamento do oscilador simulado. A: Modificações no valor das variáveis de estado R e S do oscilador, em função do tempo. Gráfico superior: variável ambiental L mantida constantemente no valor zero, simulando uma situação de escuro constante. Gráfico inferior: oscilador submetido a “pulsos de luz” diários, representados por aumentos pontuais periódicos no valor da variável L; é equivalente a um ciclo CE 1:23. As cores usadas para representar as variáveis seguem a mesma regra da figura 5.3. B: actograma, representando o ritmo simulado de atividade-reposo ao longo dos dias, inicialmente em livre-curso e posteriormente sincronizado pelos pulsos de luz diários. Este ritmo é gerado a partir da oscilação contínua das variáveis de estado, conforme descrito na figura 5.1. A fase de atividade de cada dia está representada por uma barra horizontal preta. Os pulsos estão marcados em branco, no momento e dia em que ocorrem; o plano de fundo em cinza indica os momentos de “escuro”, quando o valor da variável L é zero. Retângulos pretos delimitam os dias observados nos dois gráficos de A.

Os parâmetros **a**, **b**, **c** e **d** das equações são entidades que definem a configuração do oscilador. Manipulando-se os valores desses quatro parâmetros, é possível gerar osciladores com diferentes propriedades. Na figura 5.5, por exemplo,

observam-se três configurações de oscilador, que diferem apenas no valor do parâmetro d . Cada uma delas possui período e amplitude próprios. Os parâmetros a , b , c e d podem ser modificados individualmente ou em conjunto, resultando em possibilidades infinitas de configurações.

Figura 5.5 – Três configurações de oscilador, geradas por modificações no valor do parâmetro d , mantendo os outros fixos ($a=0,85$; $b=0,3$; $c=0,8$). Cada configuração apresenta período e amplitude diferentes na oscilação das variáveis de estado ao longo do tempo. À direita de cada oscilação está indicado o valor do parâmetro d . Coloração das variáveis, como na figura 5.3.

Termos como dia, hora, luz, claro, escuro e atividade serão usados para se referir aos equivalentes destes elementos nas simulações, com o objetivo de facilitar a discussão dos resultados.

5.2 Simulações preliminares – Espaço de Parâmetros e Curvas de Resposta de Fase

Para escolher as configurações dos osciladores a serem usados nas simulações, construímos um **Espaço de Parâmetros**, que apresenta o período (no eixo das abscissas) e a amplitude (no eixo das ordenadas) de diferentes configurações de oscilador (Fig. 5.6). Esta representação gráfica nos permite avaliar o efeito de mudanças em cada parâmetro (a , b , c ou d) sobre o período e a amplitude do

oscilador, e prever quais parâmetros devem ser modificados para conseguir um oscilador com determinadas características desejadas.

Figura 5.6 – Espaço de parâmetros. Partindo de uma configuração de oscilador inicial ($a=0,85$; $b=0,3$; $c=0,8$; $d=1,0$), o valor de cada parâmetro foi modificado individualmente, com aumentos e diminuições, resultando em diferentes configurações de oscilador. No gráfico estão indicados a amplitude e o período de cada uma das configurações resultantes, evidenciando o efeito de cada parâmetro sobre as propriedades do oscilador.

Além disso, para auxiliar na escolha da configuração de oscilador a ser usada nas simulações, também construímos um “banco” de Curvas de Resposta de Fase, com as CRFs de todos os osciladores representados no Espaço de Parâmetros (Fig. 5.7). Foram utilizados pulsos com amplitude 1,1 e duração de 1 hora, administrados a cada 4 horas circadianas a partir da hora 0 (mais a hora circadiana 10). Para cada hora circadiana testada, foram aplicados três pulsos consecutivos (respeitando-se os tempos de transientes) e o deslocamento resultante registrado no gráfico foi a média dos três deslocamentos. Assim como na CRF construída para os tuco-tucos em laboratório (ver capítulo 3), os deslocamentos de fase ($\Delta\phi$) do oscilador matemático

são marcados no gráfico, em função do horário em que o pulso foi administrado. Linhas de tendência representativas foram desenhadas através dos pontos do gráfico, por ajuste visual livre.

Figura 5.7 – Banco de Curvas de Resposta de Fase. Foram construídas CRFs no programa Circadiandynamix para as diferentes configurações de oscilador representadas no Espaço de Parâmetros (Fig. 5.6). Acima dos gráficos está indicado o parâmetro manipulado e ao lado dos gráficos estão descritos os valores dos parâmetros correspondentes a cada CRFs, com destaque para os valores correspondentes à configuração inicial. $\Delta\phi$ = valor do deslocamento de fase. hc = hora circadiana. Para maiores detalhes sobre a CRF, ver capítulo 3.

Percebe-se que a relação de fase entre a “atividade” do oscilador matemático e sua CRF não é a mesma que a observada em osciladores circadianos biológicos, visto que aqui a transição de atrasos para adiantamentos acontece ao redor da HC 10 ou 12, que corresponde ao início da atividade. Nos osciladores biológicos, esse ponto da CRF está normalmente posicionado no meio da noite subjetiva (Fig. 3.5 e 5.2), ou seja, no

meio da fase de atividade para animais noturnos, como o tuco-tuco. Porém, as propriedades que nos interessam nas simulações – estabilidade da fase e valor do período da oscilação – não serão influenciadas por essa particularidade do modelo matemático.

5.3 Estudo 1 – Pulsos em distribuição aleatória

5.3.1 Metodologia

Osciladores - Como abordagem inicial, foi escolhida uma configuração de oscilador já estudada em outros trabalhos (Pittendrigh *et al.*, 1991; Oda *et al.*, 2000), aqui referida como **oscilador A**, cujos parâmetros tem os seguintes valores: $a=0,85$; $b=0,3$; $c=0,8$; $d=0,5$. Ela está entre as configurações apresentadas no Espaço de parâmetros (Fig. 5.6). Seu comportamento foi avaliado sob diferentes regimes de pulsos de luz.

Posteriormente, selecionamos uma segunda configuração de oscilador, que difere do oscilador A na amplitude da oscilação e na amplitude da Curva de Resposta de Fase, mas possui o mesmo período em livre-curso. Para gerar esta configuração, usando como guia o Espaço de Parâmetros, escolhemos modificar os valores dos parâmetros c e d simultaneamente. A nova configuração foi denominada **oscilador B** ($a=0,85$; $b=0,3$; **$c=1,2$** ; **$d=0,29$**), e sua resposta foi comparada à do oscilador A, sob os mesmos regimes de pulsos de luz.

Pulsos de luz – Mesmo antes de obter os dados de campo mostrados no capítulo 2, já tínhamos indícios de que os tuco-tucos se expunham à luz em momentos variados ao longo dia. Trabalhamos com a hipótese de que esse tipo de exposição à luz não teria uma regularidade temporal suficiente para sincronizar o sistema circadiano.

Por essa razão, o primeiro estudo teve como objetivo verificar a resposta dos osciladores escolhidos (A e B), a regimes de “exposição à luz” com “níveis” crescentes de aleatoriedade. Neste estudo, os osciladores foram expostos a pulsos de luz diários com apenas uma hora de duração, mas em horários variados a cada dia. Seria equivalente a um animal que se expõe diariamente a 1 hora de luz, mas em horários

aleatórios, que mudam dia a dia. Manipulamos, nesta etapa de estudo, a duração dos intervalos de tempo dentro dos quais os pulsos poderiam variar.

No capítulo 4, demonstramos que 1 hora de luz diária, se mantida no mesmo horário todos os dias, tem a propriedade de arrastar o oscilador circadiano do tuco-tuco, na forma de um ciclo CE 1:23; osciladores ciclo-limite exibem a mesma dinâmica. Entretanto, imaginamos que se este pulso de luz se deslocasse a cada dia, podendo acontecer em qualquer horário dentro das 12 horas da fotofase, a informação temporal não deveria ser suficiente para resultar em arrastamento do oscilador para um período de 24 horas.

Partindo, então, de um ciclo claro-escuro com uma hora de luz diária sempre no mesmo horário (CE 1:23), geramos diferentes regimes de luz, aumentando a dispersão dos horários dos pulsos ao longo da fase de claro. Neste primeiro estudo, os pulsos de luz se distribuem de forma aleatória e uniforme (Stratonovich, 1967), ou seja, tem igual probabilidade de ocorrer em qualquer horário dentro de um **faixa de fases** pré-determinada. Para gerar pulsos cada vez mais dispersos na fase de claro, a faixa de fases foi aumentada de 2 em 2 horas, até o limite extremo, com duração de 12 horas (Fig. 5.8), que cobriria toda a fase de claro de um ciclo CE 12:12. Posteriormente, em razão dos resultados destes testes, foram incluídos também regimes de pulsos com uma faixa de fases de duração 14, 16, 18 e 24 horas.

A amplitude do estímulo usado (variável L) foi de 1,1, a mesma utilizada para construir as CRFs das simulações preliminares. Esse regime de exposição é uma simplificação do que aconteceria em campo, porque usamos o mesmo valor de intensidade do estímulo em todos os pulsos de luz, independente do horário do pulso. Isso é diferente da condição natural, em que a intensidade luminosa do ambiente muda continuamente ao longo dia (Fig. 2.3). A distribuição uniforme dos horários dos pulsos (episódios de exposição à luz) ao longo da faixa de fases também é uma simplificação, visto que os animais tendem concentrar suas exposições à luz em horários específicos dentro das horas de exposição (histogramas da Fig. 2.2).

Escolha das fases aleatórias dos pulsos - As fases aleatórias dos pulsos foram geradas a partir do programa Microsoft Excel (2007). Para gerar as fases com distribuição uniforme, foi usada a função ALEATÓRIOENTRE, que retorna um número qualquer, dentro de um intervalo escolhido pelo usuário, sendo que todos os números

do intervalo têm a mesma probabilidade de serem retornados. Repetindo-se o processo 70 vezes geramos séries de 70 números aleatórios com distribuição uniforme dentro dos intervalos descritos acima.

Figura 5.8 – Regimes de pulsos de luz aplicados sobre os osciladores A e B, ao longo de 70 dias. Cada regime está representado por um actograma (não duplicado) mostrando onde estão os pulsos de cada dia. Abaixo dos actogramas, estão histogramas representando a distribuição dos pulsos do total dos 70 dias, ao longo das 24 horas. Acima de cada gráfico está indicada a duração da faixa de fases dos pulsos, em horas. Todos os gráficos estão desenhados seguindo os mesmos eixos do gráfico “24h”. Q = quantidade de pulsos, normalizada pelo

Avaliação do arrastamento - O arrastamento dos dois osciladores, sob os diferentes regimes de pulsos, foi avaliado qualitativamente, por análise visual de actogramas construídos no programa El Temps (A. Díez-Noguera, Universitat de Barcelona, 1999). Para quantificar este arrastamento, foi utilizado inicialmente um teste de período, o periodograma chi-quadrado, desenvolvido por Sokolove e Bushell (1978). O teste foi feito no programa ClockLab (Actimetrics, Wilmette, IL, Estados Unidos). Foram considerados arrastados os ritmos cujos periodogramas acusaram o período de 24 horas como o de maior significância. Complementarmente, para julgar a estabilidade do arrastamento pré-comprovado, quantificamos a variação da fase do

oscilador ao longo dos dias. Para tanto, obtivemos os horários de pico da oscilação a cada dia, a partir do programa ClockLab, e calculamos o desvio padrão dessa fase de referência entre todos os dias. A fase de pico da oscilação recebe um nome próprio: **acrofase**. Consideramos que quanto maior o desvio das acrofases, menos estável o arrastamento.

5.3.2 Resultados

Na figura 5.9 abaixo, estão expostas as Curvas de Resposta de Fase dos osciladores A e B, escolhidos para as simulações. As duas curvas diferem na amplitude, o que significa que cada oscilador responde ao estímulo com deslocamentos de magnitude diferente. O oscilador A possui uma curva de menor amplitude, ou seja, que apresenta deslocamentos de fase menores, e há continuidade entre atrasos e adiantamentos, o que representa uma CRF tipo 1. Já o oscilador B responde com deslocamentos maiores, chegando ao extremo de 12 horas, e sua CRF apresenta uma mudança brusca de atrasos para adiantamentos ao redor da hora circadiana 12, caracterizando uma CRF tipo 0.

Figura 5.9 – Curvas de Resposta de Fase das configurações A e B do oscilador simulado. As curvas representam os deslocamentos de fase ($\Delta\phi$), provocados por um estímulo “luminoso”, em função do horário do estímulo. Para maiores detalhes sobre a CRF, ver capítulo 3.

Os ritmos dos osciladores A e B sob condições constantes e sob o ciclo CE 1:23 estão representados na figura 5.10. Este é um controle de que os osciladores escolhidos podem ser arrastados por ciclos com período de 24 horas. Também

podemos observar que, apesar de possuírem τ 's muito semelhantes, cada oscilador assume uma relação de fase diferente com o ciclo CE. Isso é previsto pelas diferenças no formato das suas CRFs, visto que, para cada oscilador, o deslocamento de fase necessário para compensar a diferença entre τ e o período de 24 horas está localizado em uma fase diferente do tempo circadiano (como discutido no capítulo 4).

Figura 5.10 – Dinâmica dos osciladores A (esquerda) e B (direita) sob escuro constante (EE) e ciclos claro-escuro (CE 1:23). Acima de cada actograma está escrito o período do ritmo, em horas, acusado pelo teste do periodograma. Marcações em preto representam a fase de “atividade” do oscilador. Pontos brancos simbolizam os pulsos de luz diários. Todos os momentos em que não há pulsos de luz são fases de escuro, representadas pelo fundo cinza dos actogramas.

Quando inserimos a aleatoriedade no ciclo CE, modificando a cada dia o horário do pulso de luz diário, observam-se algumas diferenças e algumas semelhanças no comportamento dos dois osciladores. A figura 5.11 apresenta actogramas dos ritmos dos osciladores, sob diferentes regimes de pulsos de luz em horários variados. No primeiro regime, em que os pulsos diários acontecem em horários aleatórios restritos a uma faixa de 2 horas, quase não há modificação nos ritmos, em relação ao ciclo CE 1:23. O ritmo do oscilador A apresenta grande estabilidade de fase nesse primeiro regime aleatório, com sua atividade sempre no mesmo horário, ao passo que o oscilador B já demonstra alguma variação nos horários de início e fim da atividade, dia após dia.

Figura 5.11 — Ritmo dos osciladores A (gráficos superiores) e B (gráficos superiores) sob regimes de pulsos de luz diários, distribuídos em horários aleatórios. A duração, em horas, da faixa de fases de cada regime de pulsos está indicada acima dos actogramas superiores. O eixo das abscissas é o mesmo para todos os gráficos e está indicado sob um dos actogramas. Outras especificações como na figura 5.10.

Com o aumento na dispersão dos pulsos, resultante do aumento na duração da faixa de fases, esperávamos que o arrastamento se tornasse cada vez mais instável, até finalmente se perder. Acreditávamos que, em algum regime anterior ao regime na faixa de fases com duração de 12 horas, os osciladores deixariam de “interpretar” os pulsos como um ciclo CE de 24 horas e, portanto, o período do ritmo deixaria de estar sincronizado com o “ambiente externo”. Esperávamos, também, que cada oscilador teria a perda do arrastamento em um regime diferente, indicando qual dos dois tipos de CRF proporcionaria maior estabilidade do arrastamento sob regimes de iluminação irregulares.

Entretanto, contrariando nossas expectativas, os actogramas mostram que o padrão geral dos ritmos nunca se afasta consideravelmente daquele observado sob o ciclo CE 1:23. Mesmo no regime limite, com pulsos espalhados em uma faixa de 12

horas, a atividade continua concentrada em uma fase específica do dia e o período geral do ritmo ainda parece ser de 24 horas. A análise por periodograma confirmou período significativo de 24 horas no ritmo dos dois osciladores, em todos os regimes de pulsos de luz testados aqui.

Por outro lado, apesar do período ser condizente com o arrastamento, nota-se que o aumento na dispersão dos pulsos tem algum efeito sobre os ritmos. Ambos os osciladores demonstram perda gradual na regularidade da fase diária do ritmo, indicando que o arrastamento, ainda que mantido, tende a perder sua estabilidade. Na figura 5.12 temos a quantificação desse fenômeno. Conforme o intervalo de fases é aumentado, observa-se maior variabilidade na fase dos dois osciladores. Também é evidente que as fases do ritmo do oscilador B apresentam maior variabilidade que as do oscilador A, em qualquer dos regimes de pulsos dispersos.

Figura 5.12 – Efeito da dispersão dos pulsos sobre a estabilidade do ritmo. A instabilidade dos ritmos é medida pelo desvio padrão das acrofases ao longo dos dias de arrastamento. A dispersão dos pulsos é o valor da duração da faixa de fases dos pulsos aleatórios. O regime de pulsos com dispersão zero corresponde ao ciclo CE 1:23.

Para testar os limites do arrastamento por pulsos dispersos, em distribuição aleatória, submetemos o osciladores a mais quatro regimes cuja duração da faixa de pulsos ultrapassa 12 horas. Os ritmos sob estes regimes estão representados na figura

5.13. São raras as situações naturais comparáveis com os regimes de 18 horas e 24 horas, mas sua ação sobre os osciladores contribuem para o entendimento deste tipo particular de arrastamento.

Figura 5.13 – Dinâmica dos osciladores A (superior) e B (inferior) sob regimes de pulsos com faixa de fases de longa duração. A duração, em horas, da faixa de fases de cada regime de pulsos está indicada no topo dos actogramas superiores. Sobre cada gráfico está escrito também o valor do período do ritmo, em horas, acusado pelo periodograma. O eixo das abscissas é o mesmo para todos os gráficos e está indicado sob um dos actogramas. Outras especificações como na figura 5.10.

Começando com os actogramas da esquerda, o aspecto geral do ritmo sugere que ambos os osciladores ainda se mantêm arrastados sob o regime de pulsos com faixa de fases de 14 horas. Os valores de período do periodograma, indicados sobre os gráficos, confirmam essa impressão. Porém, quando a faixa de fases é aumentada para 16 ou 18 horas, o oscilador A perde o arrastamento. Sua atividade passa a acontecer mais tarde a cada dia, revelando que o período da oscilação passou a ser maior que 24 horas, como atestado pelo resultado do periodograma. Isso não significa que o

oscilador deixou de responder aos pulsos, ou que está em livre-curso, visto que o novo período assumido é diferente do τ (Fig. 5.10). Por sua vez, o oscilador B continua com período significativo de 24 horas, mesmo sob o regime de pulsos com faixa de fases de 16 e 18 horas.

Sob o regime com faixa de 24 horas, ou seja, com o pulso de luz ocorrendo indiscriminadamente em qualquer momento do dia, nenhum dos osciladores apresenta período de 24 horas, como era de se esperar. Mas é possível notar que cada oscilador responde de uma forma diferente aos pulsos. O oscilador A mantém um ritmo reconhecível, com período maior que 24 horas, e dentro desse padrão, a fase do ritmo é relativamente estável. Em oposição, o oscilador B apresenta atividade bastante dispersa ao longo dos dias, com período e fase variáveis, sem constituir um ritmo reconhecível no actograma.

Em conjunto, os dados indicam que o oscilador B apresenta, sob regime de pulsos aleatórios, maior variabilidade da sua fase (Fig. 5.12), mas pode ser arrastado por regimes com pulsos mais dispersos que o oscilador A (Fig. 5.13). Ao que parece, os grandes deslocamentos de fase da CRF tipo 0 deste oscilador o tornam e mais reativo aos pulsos de luz. Dessa forma, seu ritmo acompanha mais facilmente o período de 24 horas dos pulsos, mas, por outro lado, sua fase também se dispersa mais, por reagir mais diretamente às variações nos horários dos pulsos. Em conformidade, sob o regime de pulsos com faixa de 24 horas, que não carrega qualquer informação temporal sobre o dia/noite, o oscilador A parece “ignorar” parcialmente os pulsos, enquanto o oscilador B perde completamente sua ritmicidade (Fig. 5.13).

5.4 Estudo 2 – Verificando o papel da CRF tipo 0

Na etapa seguinte das simulações, buscamos confirmar o papel do formato da CRF no arrastamento. Temos indícios de que as diferenças entre as respostas dos osciladores A e B, descritas no estudo 1, são resultantes das diferenças na magnitude dos deslocamentos de fase que cada oscilador apresenta, em resposta a estímulos.

Entretanto, não podemos descartar a possibilidade de que as particularidades na resposta dos dois osciladores sejam decorrentes de alguma outra propriedade

ditada pelos parâmetros que definem as configurações de cada oscilador. Nesse caso, as diferenças entre o comportamento dos osciladores A e B seriam consequência de diferenças nos valores dos parâmetros c e d , que foram manipulados para gerar o oscilador B a partir do oscilador A. Com o objetivo de garantir que os resultados obtidos para o oscilador B têm fundamento nos seus grandes deslocamentos de fase, recorreremos a dois métodos alternativos para gerar Curvas de Resposta de Fase semelhantes à sua, ou seja, do tipo 0.

5.4.1 Metodologia

Na primeira abordagem, geramos uma terceira configuração de oscilador, sem modificar os parâmetros c e d . Partindo da configuração do oscilador A, mudamos os valores dos parâmetros a e b para obter, mais uma vez, um oscilador com o mesmo período, mas uma amplitude menor que a do oscilador A. Sabíamos de antemão que diminuições na amplitude do ritmo do oscilador são acompanhadas por aumentos da amplitude da CRF (Lakin-Thomas *et al.*, 1991; Oda *et al.*, 2000). Por isso buscamos uma configuração com amplitude baixa, que apresentasse grandes deslocamentos de fase. O oscilador resultante, nomeado **oscilador C**, possui CRF tipo 0 quando submetido aos mesmos “pulsos de luz” usados nas CRF do estudo anterior (1 hora, amplitude 1,1) e foi conseguido com os seguintes valores de parâmetros: **$a=0,3$; $b=0,091$** ; $c=0,8$; $d=0,5$. Este novo oscilador foi submetido aos regimes de pulsos 04, 08, 12, 14, 16 e 18, usados no estudo 1 (Fig. 5.8).

Outra forma de se conseguir uma CRF tipo 0 é manipulando as características do pulso de luz. Para uma mesma configuração do oscilador matemático, pulsos mais intensos (com maior amplitude), ou mais duradouros, resultam em CRFs mais amplas, semelhante ao que é observado nos sistemas biológicos. Com base nisso, acompanhamos a dinâmica do oscilador A sob pulsos de luz mais intensos que os testados anteriormente, com valor de amplitude igual a 10. Construímos a CRF do oscilador A para estes pulsos intensos e submetemos o oscilador aos mesmos regimes que o oscilador C, porém com pulsos na nova amplitude. A situação do oscilador A sob pulsos intensos será referida como **oscilador A'**. Para avaliar o arrastamento, utilizamos os mesmos métodos já descritos no estudo 1.

5.4.2 Resultados

As Curvas e Resposta de Fase do oscilador A sob pulsos intensos (A') e do oscilador C estão representadas na figura 5.14, em comparação com a CRF inicial do oscilador A. Ambas são CRFs do tipo 0, dada a descontinuidade entre atrasos e adiantamentos.

Figura 5.14 – Curvas de Resposta de Fase do estudo 2, comparadas com a CRF original do oscilador A. Especificações como na figura 5.9.

A dinâmica dos dois osciladores nos diferentes regimes está apresentado em alguns actogramas representativos, na figura 5.15. Como já era esperado, o ritmo dos dois osciladores parece apresentar um período de 24 horas, até sob o regime de pulsos com faixa de fases de duração 12 horas. Na faixa de pulsos de 18 horas, os ritmos se tornam bem mais difusos, mas ainda é possível observar a concentração da atividade em um horário do dia. Confirmando essas impressões, o teste do periodograma apontou o período de 24 horas como o período principal em todos os tratamentos. Portanto, pelo menos quanto à manutenção do período de 24 horas, os ritmos do oscilador A com pulsos fortes e do oscilador C se comportam como o ritmo do oscilador B (Figs. 5.11 e 5.13).

Também quantificamos a variabilidade da fase de atividade dos ritmos nos diferentes regimes (Fig. 5.16). Os dados para os osciladores A e B, já apresentados parcialmente no estudo 1, estão representados como linhas de tendência, para fins de comparação. A curva representativa da variabilidade da fase do oscilador A sob os pulsos originais do estudo 1 só vai até o regime de pulsos com faixa de fases de 14

horas, porque a partir desse ponto o arrastamento é perdido (Fig. 5.13). Nota-se que tanto o oscilador A sob pulsos fortes quanto o oscilador C sempre apresentam maior variação de fase que a linha representativa do oscilador A na condição inicial. Mais ainda, os ritmos de C e A' que se mantêm arrastados sob pulsos de faixa 16h e 18h, acompanham a tendência do oscilador B, ou seja, sob esses regimes, suas fases variam de forma semelhante às fases de B.

Figura 5.15 – Comportamento dos osciladores C e A' sob diferentes regimes de pulsos de luz. Todos os ritmos possuem períodos significativos de 24 horas. Outras especificações como nas figuras 5.10 e 5.11.

Concluimos que o comportamento de C e A' é bastante parecido com o de B, tanto em respeito à manutenção do arrastamento em regimes com pulsos muito dispersos (16h e 18h), quando em relação à dispersão das fases do ritmo ao longo dos dias. Isso é um forte indicativo de que os resultados atribuídos ao oscilador B na seção

anterior são, de fato, decorrentes da CRF tipo 0, e não de alguma outra propriedade inerente da sua configuração.

Figura 5.16 – Efeito da dispersão dos pulsos sobre a estabilidade do ritmo dos osciladores C e A'. O comportamento dos osciladores A e B sob pulsos na amplitude original 1,1 estão representados como linhas de tendência ajustadas visualmente. Por sua vez, o comportamento dos osciladores C e A' estão representados como pontos. Para outras especificações, ver figura 5.12.

Concluimos que o comportamento de C e A' é bastante parecido com o de B, tanto em respeito à manutenção do arrastamento em regimes com pulsos muito dispersos (16h e 18h), quando em relação à dispersão das fases do ritmo ao longo dos dias. Isso é um forte indicativo de que os resultados atribuídos ao oscilador B na seção anterior são, de fato, decorrentes da CRF tipo 0, e não de alguma outra propriedade inerente da sua configuração.

5.5 Conclusões

Intuitivamente, esperávamos que a irregularidade no horário de exposição à luz compromettesse a marcação temporal ditada pelo ciclo de iluminação. Supúnhamos que, em casos extremos, o regime de pulsos de luz deixaria de representar o ciclo CE

do ambiente externo, e não mais arrastaria o oscilador circadiano para um período de 24 horas. Nesse sentido, as simulações computacionais foram a ferramenta que encontramos para entender melhor a dinâmica de osciladores sob diferentes regimes de pulsos de luz diários.

Os resultados apresentados no presente capítulo apontam que, mesmo com grande variação nos horários dos pulsos diários, os regimes de iluminação ainda carregam uma informação temporal suficiente para arrastar os osciladores. Encontramos período de 24 horas nos ritmos, inclusive no caso extremo em que os horários dos pulsos foram espalhados com igual probabilidade por um intervalo equivalente a toda a fase de claro de um ciclo CE 12:12.

Também observamos que o arrastamento sob esses regimes de pulsos é mantido tanto para osciladores que apresentam respostas fracas à luz (CRF tipo 1), quanto para os que apresentam respostas fortes (CRF tipo 0). A diferença está na maior instabilidade da fase no ritmo dos osciladores com CRF tipo 0.

Portanto, pelo que as simulações indicam, um regime de exposição à luz em horários variáveis e aleatórios ainda é suficiente para arrastar osciladores circadianos, contanto que se limitem a uma faixa de horários do dia. Em condições naturais, há mudanças sazonais na duração da fase de claro do ciclo CE, aumentando a faixa de fases possíveis para a exposição à luz. Entretanto, nossos dados de campo indicam que o regime de exposição à luz do tuco-tuco nunca se espalha por toda a fase de claro e, mesmo dentro da faixa de horários de exposição, ela não se distribui uniformemente, permanecendo concentrada em alguns horários. Além disso, as mudanças na intensidade luminosa e no espectro da iluminação natural ao longo do dia podem contribuir como pistas temporais adicionais. Assim sendo, temos fortes indicações de que o regime de exposição à luz em campo dos tuco-tucos é suficientemente periódico para arrastar seu oscilador circadiano.

Capítulo 6. Discussão final

6.1 Arrastamento fótico em campo

Com os estudos apresentados nesta dissertação, tentamos entender como funciona o processo de sincronização fótica do oscilador circadiano do roedor subterrâneo, tuco-tuco, na natureza. Para isso, realizamos diferentes estudos em campo, em laboratório e com simulações computacionais, na tentativa de explorar os vários aspectos da sincronização.

No estudo de campo observamos o padrão temporal de exposição à luz, que, para um animal noturno e subterrâneo, se mostrou mais prolongado e irregular do que esperávamos, indicando que talvez a informação luminosa não fosse a pista ambiental principal para o arrastamento do oscilador circadiano do tuco-tuco.

Porém, alguns estudos de laboratório anteriores e os dados dos capítulos 3 e 4 desta dissertação demonstram que o sistema circadiano dos tuco-tucos apresenta sensibilidade a estímulos luminosos similares aos de espécies de superfície. Seus osciladores respondem com deslocamentos de fase diferentes em cada hora do tempo circadiano (como representado na CRF) e podem ser arrastados tanto por ciclos CE 12:12 (Valentinuzzi *et al.*, 2009), quanto por CE 1:23. Essas respostas à luz indicam que a informação luminosa temporal tem um papel importante de sinalização do dia e da noite para o sistema circadiano do tuco-tuco.

Dessa forma, para que os animais mantenham uma sincronização estável em campo, consideramos três possibilidades: ou o padrão temporal de exposição à luz é suficientemente informativo e capaz de manter a sincronização, apesar da aparente irregularidade dos horários dos pulsos; ou os tuco-tucos possuem características na CRF que facilitam o arrastamento por padrões temporais irregulares de exposição à luz; ou a sincronização em campo se baseia em uma pista temporal não fótica do ambiente.

As simulações computacionais nos indicaram que a primeira hipótese provavelmente é verdadeira. Simulamos padrões temporais de exposição à luz com

diferentes graus de irregularidade e submetemos dois osciladores a esses regimes de pulsos luminosos. Mesmo nos casos extremos, com pulsos diários espalhados aleatoriamente por toda a fase de claridade (faixa de 12 horas), os dois osciladores ainda mantiveram um período de 24 horas, indicando que foram arrastados pelo regime de pulsos.

Os padrões de exposição à luz que simulamos foram construídos com o mínimo de informação temporal possível: os pulsos de luz tinham a mesma intensidade em qualquer horário do dia, eram espalhados com igual probabilidade pelas 12 horas da fase de claridade e se restringiam a 1 episódio diário de exposição. Na natureza o regime luminoso é mais complexo, com exposições concentradas em horários específicos e com variação da intensidade luminosa do ambiente ao longo do dia. Além disso, pode acontecer mais de episódios de exposição por dia, em diferentes horários. Todos estes elementos adicionam informação temporal ao regime de iluminação percebido pelo tuco-tuco em campo. Portanto, se nossos padrões simulados de exposição à luz são agentes arrastadores eficazes, provavelmente a informação luminosa temporal percebida pelos tuco-tucos em campo também deve funcionar como um Zeitgeber, de forma ainda mais eficaz. Além disso, na natureza, outros ciclos ambientais arrastadores, como o ciclo de temperatura (Refinetti, 2010), podem atuar em conjunto com a informação luminosa e reforçar o arrastamento.

Assim, temos fortes indicações de que os tuco-tucos possuem um sistema circadiano funcional, que é sincronizado por ciclos claro-escuro tanto em laboratório quanto em campo, apesar da irregularidade no regime de exposição à luz em campo. Entretanto, como não pudemos acessar a atividade noturna nem a atividade subterrânea, não temos registro completo do ritmo de atividade-reposo destes animais. Ainda estamos procurando um método para acessar a atividade geral em campo.

6.2 O paradoxo da exposição à luz em um roedor subterrâneo noturno

Para animais diurnos, a fase de atividade se posiciona na fase de claro do ciclo CE, e coincide com horários circadianos em que o oscilador apresenta respostas fracas

à luz, o dia subjetivo. Por outro lado, animais noturnos têm sua atividade posicionada na fase de escuro do ciclo CE, e na noite subjetiva, que apresenta deslocamentos de fase mais pronunciados.

Uma das questões que os dados da presente dissertação nos trazem é qual a fase de atividade do tuco-tuco. O estudo anterior do grupo (Valentinuzzi *et al.*, 2009) com tuco-tucos mantidos em laboratório sob CE 12:12, mostrou que a fase de atividade é concentrada na fase de escuro do ciclo de iluminação. Havíamos concluído, portanto, que os tuco-tucos eram noturnos. A CRF apresentada neste capítulo mostra que, em laboratório, a fase do tempo circadiano correspondente à atividade, que nós nomeamos de antemão “noite subjetiva”, corresponde de fato à fase de maiores deslocamentos de fase. Portanto, a CRF nos dá a certeza de que a atividade é um bom marcador da fase “noturna” do oscilador, em laboratório.

Porém, no capítulo 2, encontramos grande quantidade de episódios de exposição à luz, durante o dia, na natureza. Inicialmente, isso nos pareceu um paradoxo, considerando que os tuco-tucos são animais noturnos e que sua exposição à luz acontece somente se o animal sair para a superfície durante as horas em que há claridade. Parecia, de início, contraditório que um animal noturno pudesse expressar tanta atividade durante o dia.

Para entender melhor este paradoxo, buscamos primeiramente pensar no que seria esperado para o comportamento em campo de um animal noturno. Pensemos inicialmente no esquilo voador estudado por Patricia DeCoursey, um modelo noturno bastante “didático”. Esse roedor descansa no interior de troncos de árvores durante o dia, no escuro, e à noite sai para forragear. Em condições semi-naturais, os esquilos se expõem muito pouco à luz e quase somente durante os crepúsculos (DeCoursey & Menon, 1991). Se um desses animais fosse introduzido em um ambiente com ciclo CE invertido (com 12 horas de defasagem), seria esperado que inicialmente saísse da toca durante o claro, pois estaria ainda expressando a fase determinada pelo regime CE anterior. A fase de atividade deste animal noturno está intrinsecamente fixada na noite subjetiva, que é o momento em que o relógio circadiano apresenta os maiores deslocamentos de fase em resposta à luz, como demonstrado na Curva de Resposta de Fase. Consequentemente, com o tempo, a luz percebida fora da toca durante a atividade (noite subjetiva) deslocaria seu relógio circadiano de acordo com o novo ciclo

CE; assim, a noite subjetiva, juntamente com a atividade, seria realocada para a nova fase noturna do ambiente. Dessa forma, devido aos grandes deslocamentos de fase resultantes de exposição à luz na noite subjetiva, a atividade diurna nunca seria estável.

No caso dos tuco-tucos, a situação parece ser diferente. Se seu sistema circadiano funcionasse como o do esquilo voador, qualquer atividade diurna, e conseqüente exposição à luz, resultaria em deslocamentos de fase que realocariam a atividade para a noite. Ou seja, não poderia haver um componente diurno de atividade, como mostram nossos dados de campo.

Em trabalho paralelo de nosso grupo, descrito em (Tomotani *et al.*, submetido), os tuco-tucos observados na arena foram transferidos, no final das observações, para o laboratório, onde tiveram seus ritmos registrados sob condições constantes de iluminação. Nessas condições, os tuco-tucos expressaram atividade durante as horas correspondentes à noite externa, apesar do componente diurno de atividade observado. Mais discussões a respeito dos possíveis mecanismos por trás dessa “dissociação” entre a fase da atividade e a fase do oscilador estão apresentadas no artigo (Tomotani *et al.*, submetido).

Com base nesses resultados e nas nossas simulações computacionais, temos indicações que a fase de atividade definida pelo oscilador é noturna. Porém, a expressão da atividade fora da toca pode se desacoplar da fase definida pelo oscilador, permitindo a grande quantidade de eventos diurnos de exposição à luz. Por outro lado, o padrão de exposição à luz resultante não compromete o arrastamento do oscilador circadiano, e resulta na noite subjetiva sincronizada com a noite do ambiente externo.

6.3 Arrastamento paramétrico x não-paramétrico

Colin S. Pittendrigh e Jürgen Aschoff construíram duas teorias diferentes para explicar o arrastamento de osciladores circadianos por ciclos claro-escuro (Daan, 2000). Segundo a proposta de Pittendrigh, estímulos luminosos agem pontualmente, promovendo deslocamentos de fase no oscilador circadiano e, dessa forma, causam diariamente um atraso ou um adiantamento que compensa a diferença entre o

período endógeno τ e o período de 24 horas do ciclo ambiental. Este fenômeno recebe o nome de **arrastamento não-paramétrico**. Por outro lado, Aschoff propõe que a luz atua continuamente, modificando a velocidade angular do oscilador; assim, sob um ciclo claro-escuro, o ritmo é acelerado e desacelerado e o efeito integrado ao longo do dia resulta em uma velocidade média de 1 repetição a cada 24 horas. Esta teoria é conhecida como **arrastamento paramétrico**. De forma geral, a teoria de Pittendrigh tem maior validade no arrastamento de organismos que se expõem pouco à luz, e a teoria de Aschoff é mais aplicável para organismos que estão expostos a muitas horas de luz por dia. Ainda assim, pelo que se entende hoje em dia, o ciclo claro-escuro atua pelas duas modalidades sobre o oscilador de todas as espécies, ou seja, as duas teorias se complementam (Daan, 2000).

Para citar alguns animais em que o arrastamento não-paramétrico parece atuar com maior importância, podemos resgatar os exemplos descritos no capítulo 2. O morcego (DeCoursey & DeCoursey, 1964) e o escorpião (Fleissner & Fleissner, 1998) são ambos noturnos e se expõem a pouco tempo de luz por dia, no início da noite (Fig. 2.1). Seu arrastamento é, portanto, entendido de forma similar ao arrastamento por um ciclo CE 1:23, por exemplo. Os dois animais possuem τ menor que 24 horas e, portanto, interpretamos que o estímulo luminoso diário provoca atrasos diários no oscilador, compensando a diferença entre τ e 24 horas. O fato de o pulso acontecer no início da noite é condizente com o formato da CRF, que apresenta atrasos de fase justamente neste momento. No estudo com o esquilo voador, que apresenta basicamente o mesmo tipo de arrastamento, DeCoursey (1986) conseguiu inclusive demonstrar os atrasos de fase decorrentes da exposição à luz.

Já o esquilo terrestre se expõe à luz na parte central do dia, permanecendo dentro das tocas durante os crepúsculos (Hut *et al.*, 1999; Fig. 2.1). Segundo o formato geral das CRF, estímulos percebidos durante a maior parte do dia subjetivo não resultam em grandes deslocamentos de fase (Fig. 3.5B); apenas no início e final do dia subjetivo o oscilador é mais responsivo. Por outro lado, a noite-subjetiva é uma fase de grandes respostas, mas que não recebe luz quando o ritmo está sincronizado, por estar posicionada na fase de escuro. Portanto, em um ciclo claro-escuro natural, em que a noite subjetiva acontece inteiramente no escuro, apenas o início e o final do dia subjetivo são os momentos em que o oscilador recebe a informação luminosa. Em

decorrência disso, formulou-se a idéia de que apenas a luz percebida nas transições do claro para o escuro e vice-versa seriam relevantes (Pittendrigh & Minis, 1964). Entretanto, Hut e col. (1999) demonstraram que os esquilos terrestres diurnos em seu ambiente não saem das tocas durante as transições, mas somente na faixa central do dia, quando o oscilador não é responsivo à luz. Nesse caso, a sincronização se basearia em efeitos contínuos, paramétricos, da luz percebida no meio do dia.

A figura geral que se tira dos resultados apresentados é condizente com a colocação de Daan (2000) já mencionada acima, que ressalta a importância do efeito contínuo da luz, arrastamento paramétrico, para animais expostos a maiores parcelas do ciclo claro-escuro, como é o caso do esquilo-terrestre diurno; por sua vez, os efeitos fásicos do arrastamento não paramétrico seriam mais relevantes para animais com breves exposições à luz, como é o caso do esquilo-voador, do morcego e do escorpião, todos noturnos.

O tuco-tuco é um caso interessante, porque, apesar de apresentar uma atividade ao menos parcialmente diurna em campo, sua exposição à luz se dá por episódios breves. Então, provavelmente sofre maior influência dos efeitos não-paramétricos do ciclo claro-escuro. Verificamos que o arrastamento de seu oscilador circadiano consiste em uma série de ações não-paramétricas – deslocamentos de fase – da luz sobre o oscilador, como tentamos simular com o modelo matemático de oscilador. Em adição a esse efeito não-paramétrico, porém, pode haver também uma contribuição de mudanças no período, resultantes de efeitos paramétricos da luz. Alguns dados preliminares do efeito da luz sobre o período do oscilador (Apêndice 3) parecem indicar que respostas de período atuam conjuntamente com as respostas de fase, mas apenas no dia subjetivo.

Referências bibliográficas

- ARMSTRONG, S. M. Melatonin and circadian control in mammals. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 45, p. 932-938, 1989.
- ASCHOFF, J. Zeitgeber der tierischen Tagesperiodik. *Naturwissenschaften*, 41, p. 49-56, 1954.
- ASCHOFF, J. Response curves in circadian periodicity. In: _____.(Org). *Circadian Clocks*. Amsterdam: North-Holland, 1965. p. 95-111.
- BARTNESS, T. J.; SONG, C. K.; DEMAS, G. E. SCN Efferents to Peripheral Tissues: Implications for Biological Rhythms. *Journal of Biological Rhythms*, 16, p. 196-204, 2001.
- BEGALL, S.; DAAN, S.; BURDA, H.; OVERKAMP, G. J. F. Activity patterns in a subterranean social rodent, *Spalacopus cyanus* (Octodontidae). *Journal of Mammalogy*, 83, p. 153-158, 2002.
- BENEDIX, J. H. A predictable pattern of daily activity by the pocket gopher *Geomys bursarius*. *Animal Behaviour*, 48, p. 501-509, 1994.
- BOVET, J.; OERTLI, E. F. Free-running circadian activity rhythms in free-living beaver (*Castor canadensis*). *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 92, p. 1-10, 1974.
- BUFFENSTEIN, R. Ecophysiological responses of subterranean rodents to underground habitats. In: LACEY, E. A.; PATTON, J. L.; CAMERON, G. N. (Eds.). *Life underground: the biology of subterranean rodents*. Chicago: The University of Chicago Press, 2000. p. 62-110.
- BUHR, E. D.; YOO, S.; TAKAHASHI, J. S. Temperature as a universal resetting cue for mammalian circadian oscillators. *Science*, 330, p. 379-385, 2010.
- CUTRERA, A. P.; ANTINUCCI, C. D.; MORA, M. S.; VASSALLO, A. I. Home-range and activity patterns of the south american subterranean rodent *Ctenomys talarum*. *Journal of Mammalogy*, 87, p. 1183-1191, 2006.
- DAAN, S. Colin Pittendrigh, Jürgen Aschoff, and the natural entrainment of circadian systems. *Journal of Biological Rhythms*, 15, p. 195-207, 2000.
- DAAN, S.; PITTENDRIGH, C. S. A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents: II. The variability of phase response curves. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 106, p. 253-266, 1976.
- DE VRIES, J. L.; OOSTHUIZEN, M. K.; SICHILIMA, A. M.; BENNETT, N. C. Circadian rhythms of locomotor activity in Ansell's mole-rat: are mole-rat's clocks ticking? *Journal of Zoology*, 276, p. 343-349, 2008.
- DECOURSEY, G.; DECOURSEY, P. J. Adaptive aspects of activity rhythms in bats. *Biological Bulletin*, 126, p. 14-27, 1964.
- DECOURSEY, P. J. Daily light sensitivity rhythm in a rodent. *Science*, 131, p. 33-35, 1960.

DECOURSEY, P. J. LD ratios and the entrainment of circadian activity in a nocturnal and a diurnal rodent. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 78, p. 221-235, 1972.

DECOURSEY, P. J. Light-sampling behavior in photoentrainment of a rodent circadian rhythm. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 159, p. 161-169, 1986.

DECOURSEY, P. J. Functional organization of circadian systems in multicellular animals. In: DUNLAP, J. C.; LOROS, J. J.; DECOURSEY, P. J. (Eds.). *Chronobiology: biological timekeeping*. Sunderland: Sinauer Associates, 2004. p. 145-178.

DECOURSEY, P. J.; MENON, S. A. Circadian photo-entrainment in a nocturnal rodent: quantitative measurement of light-sampling activity. *Animal Behaviour*, 41, p. 781-785, 1991.

ELLIOTT, J. A. Circadian rhythms and photoperiodic time measurement in mammals. *Federation Proceedings*, 35, p. 2339-2346, 1976.

ENRIGHT, J. T. Ecological aspects of endogenous rhythmicity. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 1, p. 221-238, 1970.

FLEISSNER, G.; FLEISSNER, G. Natural photic Zeitgeber signals and underlying neuronal mechanisms in scorpions. In: TOUITOU, Y. (Ed.). *Biological clocks: mechanisms and applications*. Amsterdam: Elsevier Science, 1998. p. 171-180.

FOSTER, R. G.; KREITZMAN, L. *Rhythms of life*. New Haven: Yale University, 2005.

FRIESEN, W. O.; FRIESEN, J. A. *Neurodynamix II: concepts of neurophysiology illustrated by computer simulations*. New York: Oxford University Press, 2009.

GETTINGER, R. D. A field study of activity patterns of *Thomomys bottae*. *Journal of Mammalogy*, 65, p. 76-84, 1984.

GLASS, L.; MACKEY, M. C. *From clocks to chaos: the rhythms of life*. Princeton: Princeton University Press, 1988.

GOLDMAN, B. D.; GOLDMAN, S. L.; RICCIO, A. P.; TERKEL, J. Circadian patterns of locomotor activity and body temperature in blind mole-rats, *Spalax ehrenbergi*. *Journal of Biological Rhythms*, 12, p. 348-361, 1997.

HOUBEN, T.; DEBOER, T.; VAN OOSTERHOUT, F.; MEIJER, J. H. Correlation with behavioral activity and rest implies circadian regulation by SCN neuronal activity levels. *Journal of Biological Rhythms*, 24, p. 477-487, 2009.

HUT, R. A.; VAN ORT, B. E. H.; DAAN, S. Natural entrainment without dawn and dusk: the case of the european ground squirrel (*Spermophilus citellus*). *Journal of Biological Rhythms*, 14, p. 290-299, 1999.

JOHNSON, C. H. Forty years of PRCs: what have we learned? *Chronobiology International*, 16, p. 711-743, 1999.

- LACEY, E. A.; PATTON, J. L.; CAMERON, G. N. Introduction. In: _____. (Eds.). *Life underground: the biology of subterranean rodents*. Chicago: The University of Chicago Press, 2000. p. 1-14.
- LAKIN-THOMAS, P. L.; BRODY, S.; COTÉ, G. G. Amplitude model for the effects of mutations and temperature on period and phase resetting of the *Neurospora* circadian oscillator. *Journal of Biological Rhythms*, p. 281-197, 1991.
- LESAUTER, J.; SILVER, R. Output signals of the SCN. *Chronobiology International*, 15, p.535-550, 1998.
- LUNA, F.; ANTINUCCI, C. D.; BUSCH, C. Ritmos de actividad locomotora y uso de las cuevas en condiciones seminaturales en *Ctenomys talarum* (Rodentia, Octodontidae). *Revista chilena de historia natural*, 73, p. 39-46, 2000.
- ODA, G. A.; MENAKER, M.; FRIESEN, W. O. Modeling the dual pacemaker system of the tau mutant hamster. *Journal of Biological Rhythms*, 15, p. 246-264, 2000.
- PAVLIDIS, T. A mathematical model for the light affected system in the drosophila eclosion rhythm. *Bulletin of Mathematical Biology*, 29, p. 291-310, 1967.
- PITTENDRIGH, C. S. Circadian systems: entrainment. In: ASCHOFF, J. (Org.). *Handbook of behavioral neurobiology 4: Biological rhythms*. New York: Plenum, 1981. p. 95-124.
- PITTENDRIGH, C. S.; KYNER, W. T.; TAKAMURA, T. The amplitude of circadian oscillations: temperature dependence, latitudinal clines, and the photoperiodic time measurement. *Journal of Biological Rhythms*, 6, 299-313, 1991.
- PITTENDRIGH, C. S.; DAAN, S. A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents: I. The stability and lability of spontaneous frequency. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 106, p. 223-252, 1976a.
- PITTENDRIGH, C. S.; DAAN, S. A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents: IV. Entrainment: Pacemaker as clock. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 106, p. 291-331, 1976b.
- PITTENDRIGH, C. S.; MINIS, D. H. The entrainment of circadian oscillation by light and their role as photoperiodic clocks. *American Naturalist*, 98, 262-294, 1964.
- PRATT, B. L.; GOLDMAN, B. D. Activity rhythms and photoperiodism of Syrian hamsters in a simulated burrow system. *Physiology & Behavior*, 36, p. 83-89, 1986.
- RADO, R.; SHANAS, U.; TERKEL, J. Entrainment of locomotor in the blind mole rat by brief light pulses. *Mammalia*, 55, p. 479, 1991. *Abstract*.
- REEBS, S. G.; MROSOVSKY, N. Effects of induced wheel running on the circadian activity rhythms of syrian hamsters: entrainment and phase response curve. *Journal of Biological Rhythms*, 4, p. 39-48, 1989.
- REFINETTI, R. Circadian rhythm of self-exposure to light in the golden hamster. *Behavioural Processes*, 40, p. 107-111, 1997.

- REFINETTI, R. Daily activity patterns of a nocturnal and a diurnal rodent in a seminatural environment. *Physiology & Behavior*, 82, p. 285-294, 2004.
- REFINETTI, R. Entrainment of circadian rhythm by ambient temperature cycles in mice. *Journal of Biological Rhythms*, 25, p. 247-256, 2010.
- REZENDE, E.L.; CORTÉS, A.; BACIGALUPE, L. D.; NESPOLO, R. F.; BOZINOVIC, F. Ambient temperature limits above-ground activity of the subterranean rodent *Spalacopus cyanus*. *Journal of Arid Environments*, 55, p. 63-74, 2003.
- ROENNEBERG, T.; FOSTER, R. G. Twilight times: light and the circadian system. *Photochemistry and Photobiology*, 66, p. 549-561, 1997.
- SAVIDES, T. J.; MESSIN, S.; SENGHER, C.; KRIPKE, D. F. Natural light exposure of young adults. *Physiology & Behavior*, 38, p. 571-574, 1986.
- SCHMIDT-NIELSEN, K. *Desert animals: physiological problems of heat and water*. New York: Oxford University press, 1964.
- SCHOLANDER, P. F.; VAN DAM, L.; KANWISHER, J. W.; HAMMEL, H. T.; GORDON, M. S. Supercooling and osmoregulation in arctic fish. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 1, p. 5-24, 1957.
- SIKES, R. S.; GANNON, W. L.; ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE OF THE AMERICAN SOCIETY OF MAMMALOGISTS. Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research. *Journal of Mammalogy*, 92, p. 235-253, 2011.
- SOKOLOVE, P. G.; BUSHELL, W. N. The chi square periodogram: its utility for analysis of circadian rhythms. *Journal of Theoretical Biology*, 72, p. 131-160, 1978.
- STEIN, B. R. Morphology of subterranean rodents. In: LACEY, E. A.; PATTON, J. L.; CAMERON, G. N. (Eds.). *Life underground: the biology of subterranean rodents*. Chicago: The University of Chicago Press, 2000. p. 19-61.
- STEPHAN, F. K. The "other" circadian system: food as a zeitgeber. *Journal of Biological Rhythms*, 17, p. 284-292, 2002.
- STRATONOVICH, R. L. Topics in the theory of random noise. New York: Gordon & Breach Science, 1967. Volume 2.
- SZABÓ, I.; KOVATS, T. G.; HALBERG, F. Circadian rhythm in murine reticuloendothelial function. *Chronobiologia*, 1978, 5, p. 137-143, 1978.
- TERMAN, M.; REMÉ, C. E.; WIRZ-JUSTICE, A. The visual input stage of the mammalian circadian pacemaking system: II. The effect of light and drugs on retinal function. *Journal of Biological Rhythms*, 6, p. 31-48, 1991.
- TOMOTANI, B. M.; FLÔRES, D. E. F. L.; TACHINARDI, P.; PALIZA, J. D.; ODA G. A.; VALENTINUZZI, V. S. Aftereffects of field entrainment provide new insights into the meaning of day-activity in a nocturnal subterranean rodent, the tuco-tuco (*Ctenomys cf. knighti*). Submetido.

TWENTE, J. W. Some aspects of habitat selection and other behavior of cavern-dwelling bats. *Ecology*, 36, p. 706-732, 1955.

URREJOLA, D.; LACEY, E. A.; WIECZOREK, J. R.; EBENSPERGER, L. A. Daily activity patterns of free-living cururos (*Spalacopus cyanus*). *Journal of Mammalogy*, 86, p. 302-308, 2005.

VALENTINUZZI, V. S.; ODA, G. A.; ARAÚJO, J. F.; RALPH, M. R. Circadian pattern of wheel-running activity of a south american subterranean rodent (*Ctenomys cf knightii*). *Chronobiology International*, 26, p. 14-27, 2009.

VAUGHAN, T. A.; HANSEN, R. M. Activity rhythm of the plains pocket gopher. *Journal of Mammalogy*, 42, p. 541-543, 1961.

WINFREE, A. T. *The timing of biological clocks*. New York: Scientific American Library, 1986.

YAMAZAKI, S.; NUMANO, R.; ABE, M.; HIDA, A.; TAKAHASHI, R.; UEDA, M.; BLOCK, G. D.; SAKAKI, Y.; MENAKER, M.; TEI, H. Resetting Central and Peripheral Circadian Oscillators in Transgenic Rats. *Science*, 288, p. 682-685, 2000.

Apêndice 1 – Armadilha

As armadilhas usadas para captura dos tuco-tucos têm um princípio de funcionamento semelhante àquele descrito para armadilhas de *pocket gophers* em Sargeant (1966). O mecanismo e as dimensões da armadilha estão descritos na figura (A1.1) abaixo.

Geralmente, após o forrageamento, os tuco-tucos fecham com terra as saídas que comunicam seus túneis subterrâneos com a superfície. Dessa forma, formam-se montículos de areia que nos permitem reconhecê-las posteriormente. O procedimento de captura consiste em abrir uma dessas saídas do sistema de túneis dos tuco-tucos e introduzir a armadilha com o lado da tampa de metal para dentro. A extremidade fechada pela tela de arame fica posicionada para fora do túnel, permitindo a entrada de luz e vento para dentro da armadilha e do túnel. Provavelmente levados pelo instinto de tapar a abertura por onde o vento e a luz entram, os animais ingressam na armadilha e disparam o mecanismo, que os encerra dentro do tubo, sem causar lesões.

Figura A1.1 – Representação esquemática da armadilha usada para captura dos tuco-tucos. A armadilha consiste em um tubo de PVC, com uma das extremidades fechada por uma tela de arame (direita) e a outra com uma porta de metal (esquerda), que se mantém fechada graças à tensão de uma mola. Quando a armadilha está acionada, a plataforma central (em preto) é suspensa por um palito de madeira (em laranja), que tenciona um fio de nylon (em verde), o qual, por sua vez, suspende a porta de metal (em cinza), pressionando a mola. Quando o animal entra na armadilha e pisa sobre a plataforma central, o palito de madeira é derrubado, e o fio de nylon liberado, levando ao fechamento da porta de metal pela mola.

Referência bibliográfica

SARGEANT, A. B. A live trap for pocket gophers. *Journal of Mammalogy*, 47, p. 729-731, 1966.

Apêndice 2 – Luxímetros testados

O primeiro protótipo testado (Fig. A2.1A) foi desenvolvido pela empresa Insight (Ribeirão Preto, SP, Brasil). As especificações deste luxímetro-actímetro estão descritas na tabela A2.1. Infelizmente, o aparelho não conseguiu alcançar o nível de funcionamento que permitisse testarmos no animal. Havia problemas de comunicação entre as medidas de atividade e intensidade luminosa, e nós necessitávamos que o aparelho fizesse as duas medidas independentemente. Os gráficos da figura A2.2 ilustram o problema encontrado. Movimentar o aparelho intensamente no escuro ou claro constante não resultava em atividade (Teste 1) e, por outro lado, havia marcação de atividade durante mudanças na intensidade luminosa com o protótipo parado (Teste 2). Portanto o aparelho não media atividade de fato, mas sim uma medida desconhecida, dependente das medidas de intensidade luminosa. Solicitamos outro protótipo que medisse somente atividade, sem o luxímetro embutido, e este novo aparelho não registrou qualquer movimento, confirmando sua ineficácia como actímetro. Além do problema maior relatado, o segundo problema que não foi superado foi o fato de o temporizador interno do aparelho apresentar dependência de temperatura, de modo que não poderíamos confiar nos intervalos de medida.

Figura A2.1 – Aparelhos desenvolvidos para medir intensidade luminosa em campo. A: aparelho da empresa Insight. B e C: primeiro e segundo aparelhos da empresa Ecotone, respectivamente.

Portanto, o aparelho não media atividade e não reproduzia informações temporais confiáveis de intensidade luminosa. Após dois anos, decidimos mudar para a empresa Ecotone (Gdynia, Polônia). Solicitamos um aparelho que medisse somente exposição à luz ao longo do tempo, sem medir atividade, para evitar possíveis problemas de comunicação entre dados.

Tabela A2.1 - Especificações dos luxímetros testados

	Dimensões (mm)	Peso (g)	Bateria	Intervalo de medidas (s)	Total de medidas com bateria cheia
Aperelho Insight	25,0 x 25,0 x 10,0	5,0	CR2016	aprox. 16	2250
1º aparelho Ecotone	22,0 x 12,0 x 3,0	3,5	Li-Pol	1 até 9999	1000000
2º aparelho Ecotone	165,0 x 6,0 x 0,3 (com colar)	3,5	Li-Pol	1 até 9999	1000000

O primeiro protótipo da empresa Ecotone (Fig. A2.1B e Tabela A2.1) já possuía aspecto mais anatômico que o da Insight e registrava muito bem as mudanças na intensidade luminosa, sem irregularidades no temporizador interno do aparelho. Entretanto, devido a problemas de estabilidade na conexão com a bateria, não conseguimos registros de longo prazo quando o aparelho foi testado nos tuco-tucos, que se movimentavam. Atualmente, estamos na fase de testes do segundo aparelho da empresa Ecotone (Fig. A2.1C e Tabela A2.1), que possui formato ainda mais anatômico e cuja conexão com a bateria será feita por meio de soldagem, um processo que garante maior qualidade e segurança da conexão.

Figura A2.2 – Comparação entre os resultados esperados e os resultados obtidos nos Testes do luxímetro-actímetro da empresa Insight. As linhas cinza marcam o nível de intensidade luminosa ao qual o aparelho está exposto, e os círculos pretos sobre o eixo x são marcações discretas de atividade (correspondentes a movimentação do aparelho). As letras acima dos gráficos denotam diferentes regimes aos quais o aparelho foi submetido. Teste 1 – A: claro sem movimento. B: claro com movimento. C: escuro sem movimento. D: escuro com movimento. Teste 2 – E: iluminação variando sem movimento. F: iluminação fixa com movimento. As intensidades luminosas variam conforme o esperado, mas a “atividade” não é marcada quando há movimento, mas sim quando há mudanças na intensidade luminosa.

Apêndice 3 - Curva de Resposta de τ

A3.1 Introdução

Além do deslocamento de fase, que é uma propriedade física do oscilador, os osciladores circadianos também apresentam mudanças de **período** após uma perturbação (Comas et al., 2006). Por essa razão, usamos os dados dos ritmos durante o experimento da Curva de Resposta de Fase para verificar também as mudanças de período após os pulsos de luz.

A3.2 Metodologia

Aproveitamos os dados obtidos durante a CRF para construir também uma Curva de Resposta de τ (CR τ).

Os períodos usados foram medidos a partir da inclinação da curva traçada sobre os inícios de atividade (ex: tracejados na figura 3.6). Subtraindo-se os valores de período pré-pulso (tracejado grosso) dos valores de período pós-pulso (tracejado fino) para todos os animais testados, obtivemos diferenças de período ($\Delta\tau$), que foram apresentadas em função do horário circadiano em que pulso foi recebido (Figura A3.1).

A3.3 Resultados

Nota-se uma fase do tempo circadiano em que o estímulo luminoso provoca unicamente aumentos de período (HC 12 a HC 18), seguida de uma fase com modificações de período nas duas direções (HC 18 a HC 3), uma possível zona de diminuições de período (HC 3 a HC 6) e uma zona morta (HC 6 e HC 12).

Curva de Resposta de τ

Figura A3.1 — Curva de Resposta de τ do tuco-tuco. Modificações do período em livre-curso (τ) decorrentes do estímulo luminoso estão representadas em função do horário circadiano do estímulo. Esquerda: dados de cada indivíduo e em cada repetição do protocolo. Direita: média e desvio das diferenças de período a cada 3 horas circadianas. hc = horas circadianas.

A3.4 Discussão

Apesar de não sempre destacadas, mudanças de período costumam acompanhar os deslocamentos de fase induzidos por pulsos de luz. Esse fato foi reconhecido em um dos primeiros trabalhos sobre a CRF, graças à dificuldade que a mudança de período traz para o cálculo do deslocamento de fase (DeCoursey, 1964). No entanto, as respostas de período não são previstas pelo modelo formal do arrastamento, e por muitas vezes foram tratadas como um artefato, ou estudadas dentro de um paradigma independente da teoria da CRF. Somente após alguns anos, os pesquisadores da área tiveram a iniciativa de integrar as respostas de fase e período e explorar como poderiam atuar em conjunto no processo de arrastamento do oscilador circadiano (Comas et al., 2006).

De forma geral, as CRT da literatura são de animais diurnos e os horários circadianos cujas respostas ao pulso de luz são atrasos de fase costumam apresentar aumentos de período; de forma complementar, adiantamentos de fase costumam ser acompanhados de diminuições no período. Assim, as mudanças de período atuam de forma convergente com as respostas de fase, facilitando o arrastamento (Comas et

al., 2006). Pittendrigh e Daan (1976^{a?}) já haviam observado essa tendência em roedores noturnos, mas não chegaram a construir uma CR τ . Porém, algumas espécies parecem não apresentar CR τ , como é o caso de *Octodon degus* (Kas e Edgar, 2000).

No tuco-tuco, Se compararmos a CRF e a CR τ , veremos que a região correspondente ao início da noite subjetiva, até mais ou menos o HC 18, apresenta tanto atrasos de fase como aumentos de período, de acordo com o esperado. Porém, pelo restante da noite subjetiva e início do dia subjetivo os deslocamentos de fase são majoritariamente adiantamentos, ao passo que as mudanças de período são dispersas e não tendem para aumentos ou diminuições, contradizendo as expectativas. A correlação é retomada entre HC 3 e HC 6, quando os adiantamentos de fase parecem coincidir com diminuições de período, e entre HC6 e HC 12, onde estão posicionadas as zonas mortas das duas curvas.

Portanto, o dia subjetivo é a região em que a resposta das duas curvas é mais convergente. Isso tem implicações funcionais em uma situação de arrastamento estável, porque, quando arrastado por um ciclo CE 12:12 ou mesmo um ciclo CE natural, o oscilador circadiano está posicionado de tal forma que apenas o dia subjetivo é iluminado. Assim sendo, é importante que as respostas de fase e período atuem juntas, principalmente durante essa fase do dia.

A3.5 Referências bibliográficas

COMAS, M.; BEERSMA, D. G. M.; SPOELSTRA, K.; DAAN, S. Phase and period responses of the circadian system of mice (*Mus musculus*) to light stimuli of different duration. *Journal of Biological Rhythms*, 21, p. 367-372, 2006.

DECOURSEY, P. J. Function of a light response rhythm in hamsters. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 63, 189-196, 1964.

KAS, M. J. H.; EDGAR, D. M. Photic phase response curve in *Octodon degus*: assessment as a function of activity phase preference. *American Journal of Physiology: regulatory, integrative and comparative physiology*, 278, p. R1385-R1389, 2000.

PITTENDRIGH, C. S.; DAAN, S. A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents: I. The stability and lability of spontaneous frequency. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 106, p. 223-252, 1976.