Patricia Tachinardi Andrade Silva

Ritmo circadiano de temperatura corporal no tuco-tuco (*Ctenomys* aff. *knighti*), um roedor subterrâneo sul-americano.

Circadian rhythm of body temperature in the tuco-tuco (*Ctenomys* aff. *knighti*), a South-American subterranean rodent.

São Paulo

2012

Patricia Tachinardi Andrade Silva

Ritmo circadiano de temperatura corporal no tuco-tuco (*Ctenomys* aff. *knighti*), um roedor subterrâneo sul-americano.

Circadian rhythm of body temperature in the tuco-tuco (*Ctenomys* aff. *knighti*), a South-American subterranean rodent.

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.

Orientadora: Gisele Akemi Oda

São Paulo

2012

Ficha Catalográfica

Tachinardi, Patricia

Ritmo circadiano de temperatura corporal no tuco-tuco (*Ctenomys* aff. *knighti*), um roedor subterrâneo sul-americano.

99 páginas

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

1. Osciladores circadianos
2. Termorregulação
3. Partição de ritmos

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

Comissão Julgadora:

_____ _____

Prof(a). Dr(a). Prof(a). Dr(a).

_____

Profa. Dra..Gisele Akemi Oda

Orientadora

"But the most beautiful thing about my burrow is the stillness. Of course, that is deceptive. At any moment it may be shattered and then all will be over. For the time being, however, the silence is still with me."

Franz Kafka
In: The burrow (Der Bau)

AGRADECIMENTOS

À minha família, por apoiar incondicionalmente todas as minhas decisões, mesmo quando estas não eram muito convencionais. Obrigada por me fornecerem todo o suporte necessário para que eu conseguisse alcançar meus objetivos.

Às minhas orientadoras, Profª. Gisele A. Oda e Drª. Verónica S. Valentinuzzi, por tudo o que me ensinaram durante esses anos, pela incrível dedicação que tiveram ao me orientar e por me ampararem nos momentos em que mais precisei. Obrigada, principalmente, por acreditarem em mim quando nem mesmo eu acreditava e por toda a paciência que tiveram comigo. É um privilégio ter não só uma, mas duas orientadoras como vocês!

Ao Prof. José Eduardo Bicudo pela orientação em todos os assuntos relacionados à termorregulação, e pela revisão de diversos textos produzidos durante o mestrado.

Aos meus colegas de laboratório e ótimos amigos, Barbara Tomotani e Danilo Flôres, que acompanharam toda a execução deste trabalho, ajudando com os experimentos e com a captura e manutenção dos animais. Obrigada pelas excelentes discussões, pelos "momentos descontração" e por todas as nossas aventuras durante as longas jornadas no meio do deserto! Agradeço também ao novo membro do laboratório, André Yamachi, pelo auxílio com a manutenção dos animais e pela companhia na última viagem realizada durante este projeto.

A José Paliza, pela excelente assistência na preparação de equipamentos e do biotério e na coleta e manutenção de animais, sem a qual a execução desse projeto não seria possível. A Eugénio Sanchez, pela ajuda na preparação do biotério.

Ao Prof. Martin Ralph, da Universidade de Toronto, por generosamente doar parte dos equipamentos utilizados neste projeto e as gaiolas nos quais os animais foram acondicionados e pelas várias discussões sobre cronobiologia, comportamento e tuco-tucos.

À Profª. Mirian Marques, por, junto com a Profª. Gisele, me apresentar à cronobiologia de um modo absolutamente cativante. Obrigada pelas excelentes discussões sobre ciência, pelo apoio na execução deste projeto e, claro, pelos puxões de orelha!

Aos pesquisadores, funcionários e "becários" do CRILAR, pela assistência em diversas questões práticas, pela hospitalidade e pelos *asados* argentinos. Em particular, agradeço à Lucía Krapovikas, pelo auxílio na captura e manutenção dos animais e ao Dr. Sebastián Fracchia, por fornecer alguns materiais utilizados nas cirurgias.

Às pesquisadoras da UNESP-Jaboticabal, Profª Kênia Bícego, por ter me recebido em seu laboratório e Carolina Scarpellini, por me ensinar pacientemente o procedimento de implantação dos sensores.

Ao veterinário Pablo Dominguez, que contribuiu com sugestões para o desenvolvimento do protocolo cirúrgico e com a doação de alguns fármacos utilizados durante a cirurgia.

Aos membros da banca da minha qualificação, Profª. Sílvia Cristina Ribeiro de Souza, Prof. Gilberto Xavier e Profª Mirian Marques, pelas valiosas críticas e sugestões.

A Cintia Yamashita, Ivan Salles Santos, Jéssica Camargo, Aline Matsumura, Simone Ota e Tatiana Kawamoto, pelas ótimas discussões sobre cronobiologia, fisiologia (animal e vegetal!), evolução, cirurgias e muitos outros assuntos biológicos. Agradeço também os conselhos e o apoio durante o mestrado!

Ao Prof. Diego Golombek da Universidade Nacional de Quilmes e aos membros de seu laboratório, especialmente o Dr. Juan Chiesa, por emprestarem alguns equipamentos e pela assistência no uso dos equipamentos de detecção de atividade.

Ao Prof. Antoni Díez-Noguera, da Universidade de Barcelona, por permitir a utilização de seu *software*, o ElTemps, e pelas dicas de como usá-lo. Ao Prof. Roelof Hut, da Universidade de Groningen, pela ideia do experimento com para avaliação do estresse dos animais, descrito no parte 2 do capítulo 5.

A Roseli Silva Santos e ao Prof. José Guilherme Chauí Berlinck, por me ajudarem, pacientemente, a resolver diversos problemas burocráticos. Também agradeço aos demais funcionários do Instituto de Biociências da USP.

Às pessoas que de uma forma ou de outra me ajudaram a manter a sanidade mental (ou pelo menos parte dela) durante o mestrado: Aline, Aninha, Bedim, Clarice, Daizo, Dani, Gabi, Jana, Leo, Li Koga, Fefê, Oscar, Mallu, Mina, Simone. Obrigada pelo apoio nos momentos mais difíceis.

Às agências de fomento que financiaram este trabalho: FAPESP (processo 2010/03565-0) e CNPq (processo 130127/2010-8) pelas bolsas de Mestrado; CONICET (PIP-11420090100252) e FAPESP (processos 2008/55035-5 e 10/50222-1) pelo financiamento de viagens e da compra de equipamentos e materiais de consumo.

Finalmente, agradeço a todos os tuco-tucos que participaram deste estudo, por contribuírem imensamente para a minha formação.

RESUMO

Em mamíferos, a temperatura corporal (Tc) varia ao longo do dia, de forma rítmica, bem como a atividade locomotora. Essa ritmicidade diária é gerada endogenamente, por osciladores circadianos. Em geral, os valores mais elevados de Tc concentram-se nos mesmos horários em que há atividade locomotora. No entanto, variações diárias de Tc são observadas mesmo em indivíduos imóveis, evidenciando que o ritmo de Tc não é uma mera consequência dos efeitos agudos da atividade locomotora. Este trabalho teve o objetivo de estudar o ritmo circadiano de Tc no roedor *Ctenomys* aff. *knighti* (tuco-tuco) e sua relação temporal com o ritmo de atividade locomotora. A caracterização do ritmo de Tc nesse animal é particularmente interessante, pois ele habita o ambiente subterrâneo, que impõe desafios tanto à expressão rítmica (pois os ciclos ambientais são ausentes ou têm baixa amplitude) quanto à termorregulação (devido à características como alta umidade e atmosfera hipóxica e estagnada). Medimos a Tc e a atividade locomotora dos tuco-tucos em condições controladas de laboratório. Na caracterização inicial, constatamos que o ritmo de Tc dos tuco-tucos persiste mesmo em escuridão e temperatura constantes. Quando houve exposição a um ciclo diário de claro/escuro, o ritmo de Tc foi sincronizado, e os valores mais altos ocorreram na fase de escuro. Os ritmos de Tc e de atividade locomotora mostraram-se fortemente associados no tempo. Investigamos, então, se a corrida na roda de atividade modificaria a amplitude do ritmo de Tc, por envolver atividade muscular intensa. Observamos, no entanto, que a amplitude é pouco alterada com a retirada da roda e que na sua ausência os animais substituem a corrida por outras atividades que também causam efeitos agudos na Tc. Em seguida, estudamos a variação da sensibilidade da Tc aos efeitos agudos da atividade ao longo do dia. Através de um método estatístico, que também foi utilizado para filtrar os dados de Tc, verificamos que há maior correlação entre variações de Tc e de atividade no início da noite. Por fim, investigamos se o controle do ritmo de Tc é exercido pelos núcleos supraquiasmáticos, os quais são os osciladores circadianos do ritmo de atividade locomotora. Nossa abordagem utilizou animais neurologicamente intactos, comparando os padrões do ritmo de Tc e de atividade locomotora durante a ocorrência do fenômeno de "partição do ritmo". Constatamos que na maioria dos casos os padrões de partição, tanto da Tc como da atividade locomotora são idênticos, sugerindo um controle temporal comum. No entanto, em um dos animais observamos diferenças entre os dois ritmos, sugerindo que esse controle circadiano pode ser ainda mais complexo.

ABSTRACT

In mammals, body temperature (Tb), as well as locomotor activity, changes during the day, exhibiting a rhythmic pattern. This daily rhythmicity is generated endogenously by circadian oscillators. Usually, the highest Tb values occur simultaneously to locomotor activity. Nevertheless, daily Tb changes are observed even in immobile individuals. This fact is evidence that the Tb rhythm is not a mere consequence of the acute effects of locomotor activity. The present work had the objective of studying the circadian rhythm of Tb. in the rodent *Ctenomys* aff. *knighti* (tuco-tuco) and its temporal relationship with the locomotor activity rhythm. The characterization of the Tb rhythm in this animal is especially interesting because it inhabits the subterranean environment, which poses challenges to both rhythmic expression (because environmental cycles are either absent or have low amplitude) and thermoregulation (due to high relative humidity, hypoxic atmosphere and limited ventilation). We measured Tb and locomotor activity of tuco-tucos under controlled laboratory conditions. An initial characterization showed that the tuco-tuco's Tb rhythm persisted even in constant darkness and constant temperature. This rhythm synchronized to a daily light/dark cycle, with highest values occurring during the dark phase. Tb and locomotor activity rhythm were robustly associated in time. Then, we investigated whether the wheel running would modify the Tb rhythm amplitude, because this behavior involves intense muscular activity. However, we observed that the amplitude is only slightly altered upon running-wheel removal and that in the absence of the wheel tuco-tucos substitute running with other behaviors which also have acute effects on Tb. Applying a statistical method, which was also used to filter Tb data, we verified that there is a stronger correlation between Tb changes and activity in the beginning of the night. Finally, we investigated whether the Tb rhythm is also under control of the suprachiasmatic nuclei, which are knowingly the circadian oscillators for the locomotor activity rhythm. We used an approach which involved neurally intact animals, by comparing the rhythmic patterns of Tb and locomotor activity rhythms during the occurrence of a phenomenon called "splitting". In most cases, splitting patterns of both Tb and locomotor activity rhythms were identical, indicating a common temporal control of these two variables. Nevertheless, we observed, in one animal, differences between the two rhythms, which suggest that the circadian control might be even more complex.

LISTA DE ABREVIAÇÕES E SÍMBOLOS

α (“alfa”) – Fase de atividade locomotora ou de temperatura corporal elevada

CC – Claro constante

CE – Ciclo de claro/escuro

EE – Escuro constante

NSQ – Núcleos supraquiasmáticos

NSQdm – Núcleo supraquiasmático dorsomedial

NSQvl – Núcleo supraquiasmático ventrolateral

ρ (“rô”) – Fase de repouso ou de temperatura corporal baixa

Ta – Temperatura ambiental

Tc – Temperatura corporal

τ (“tau”) – Período do ritmo expresso em livre-curso

SUMÁRIO

RESUMO i
ABSTRACT ii
LISTA DE ABREVIAÇÕES E SÍMBOLOS iii

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO GERAL 1
1.1 O ritmo circadiano de temperatura corporal em mamíferos 1
1.2 O ambiente subterrâneo e os roedores que o habitam 2
1.3 Tuco-tuco: um roedor subterrâneo sul-americano 3
1.4 Objetivos 4
CAPÍTULO 2 - MATERIAL E MÉTODOS GERAIS 5
2.1. Animais 5
2.2.Área de estudo e método de captura 6
2.3. Alojamento e manutenção dos animais 7
2.4. Condições de iluminação 7
2.5. Métodos de medição de Tc 8
2.6. Procedimentos cirúrgicos 10
2.7. Coleta dos dados de Tc e de atividade locomotora 10
2.8. Análise dos dados 11
2.8.1. Actogramas 11
2.8.2. Plexogramas: cálculo de fases, relação de fases e amplitude 13
2.8.3. Cálculo do período através do teste Periodograma Qui-quadrado 13
CAPÍTULO 3 - CONCEITOS BÁSICOS DE CRONOBIOLOGIA 16
3.1. Um breve histórico da cronobiologia 16
3.2. Estrutura do sistema circadiano em mamíferos 17
3.3. Propriedades fundamentais dos ritmos circadianos 18
3.4. Mecanismos de sincronização 19
3.5. Ritmos circadianos em roedores subterrâneos 20
CAPÍTULO 4 - CARACTERIZAÇÃO DO RITMO CIRCADIANO DE TC EM TUCO-TUCOS 22
4.1. Resumo 22
4.2. Introdução 22
4.2.1. Protocolos experimentais para a caracterização cronobiológica *22*
4.3. Objetivo 23
4.4. Métodos 25
4.5. Resultados 25
4.5.1. Condições constantes 25
4.5.2. Sincronização com o ciclo de CE 27
4.5.3. Relação entre os ritmos de Tc e de atividade locomotora 27
4.6. Discussão 28
CAPÍTULO 5 – MODULAÇÃO DO RITMO DE TC PELA ATIVIDADE EM RODA E OUTROS ASPECTOS COMPORTAMENTAIS 31
5.1. Resumo 31
5.2. Introdução 33

5.2.1. Modulação do ritmo circadiano de Tc 31
5.2.2. É possível medir apenas o componente do ritmo circadiano de Tc controlado pelo oscilador? 32
5.2.3. A atividade em roda 33
5.3. Objetivos 34
5.4. Métodos 34
5.4.1. Parte 1 – Modulação dos parâmetros rítmicos 34
5.4.2. Parte 2 – Avaliação dos níveis de estresse após a retirada da roda 35
5.4.3. Parte 3 – Análise visual do comportamento diário de tuco-tucos na presença e na ausência da roda de atividade 36
5.5. Resultados 37
5.5.1. Parte 1 - Modulação dos parâmetros rítmicos de Tc 37
5.5.2. Parte 2 - Avaliação dos níveis de estresse após a retirada da roda 38
5.5.2.1. Registros de temperatura e atividade locomotora 38
5.5.2.2. Avaliação do comportamento em relação ao oferecimento da madeira 38
5.5.3. Parte 3- Análise comportamental de tuco-tucos na presença e ausência da roda 44
5.5.3.1. Comportamentos exibidos na presença e na ausência da roda 44
5.2.3.2. Efeitos de diferentes comportamentos na elevação da Tc 45
5.5.3.3. Diferentes posturas de repouso e a diminuição da Tc 45
4.6. Discussão 48
CAPÍTULO 6 - EFEITOS AGUDOS DA ATIVIDADE LOCOMOTORA NA TC: DEPENDÊNCIA DE FASE E MÉTODO DE FILTRAGEM DO RITMO DE TC 51
6.1. Resumo 51
6.2. Introdução 51
6.2.1. Ritmo circadiano de produção de calor 51
6.2.2. Ritmo circadiano de dissipação de calor 52
6.2.3. Interação entre os ritmos circadianos de produção e de dissipação de calor 53
6.2.4. Dependência de fase dos efeitos da atividade locomotora na Tc 54
6.2.5. Filtragem do ritmo de temperatura através de tratamentos estatísticos 55
6.3. Objetivos 55
6.4. Métodos 55
6.4.1. Determinação do tempo de integração (IT) 55
6.4.2. Previsão de valores de Tc a partir de modelos lineares 56
6.5. Resultados 57
6.5.1. Determinação do tempo de integração (IT) e coeficientes de correlação 57
6.5.2. Aplicação do método Weinert-Waterhouse 58
6.6. Discussão 59
CAPÍTULO 7 - PARTIÇÃO DO RITMO CIRCADIANO DE TC 62

7.1. Resumo 62
7.2. Introdução 62
7.2.1. Identificação do oscilador circadiano que controla o ritmo de Tc 62
7.2.2. A composição multioscilatória dos núcleos supraquiasmáticos 64
7.2.3. A partição do ritmo de atividade locomotora 65
7.3.4. Mecanismo da partição de ritmos circadianos 67
7.3.5. Partição de outros ritmos circadianos 68
7.3.6. Investigação da partição do ritmo de Tc: hipóteses a respeito do oscilador circadiano 68
7.3. Objetivos 69
7.4. Métodos 69
7.5. Resultados 69
7.5.1. Animais cujos ritmos não apresentaram partição 69
7.5.2. Animais cujos ritmos de Tc e de atividade locomotora apresentaram o mesmo padrão de partição 70
7.5.3. Diferença entre os padrões dos ritmos de Tc e de atividade locomotora em um indivíduo 71
7.5.4. Actogramas dos dados tratados pelo método de Weinert-Waterhouse 75
7.6. Discussão 75
CONCLUSÕES 79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 81
APÊNDICE 1 – DESENVOLVIMENTO DO PROTOCOLO CIRÚRGICO 88
A1.1. Compilação de dados sobre as cirurgias em Ctenomys realizadas em nosso laboratório 88
A1.2. Anestesia 91
A1.3. Preparação do campo cirúrgico 91
A1.4. Incisão 92
A1.5. Sutura 92
A1.5.1. Fios de sutura 92
A1.5.2. Tipo de sutura 93
A1.6. Prevenção contra hipotermia 93
A1.7. Cuidados pós operatórios 94
A1.8. Referências bibliográficas 94
APÊNDICE 2 – AUMENTO DA TC EM RESPOSTA À ELEVAÇÃO DA TA 95
A2.1. Evidência de compensação de τ a variações de Tc 96
A2.2. Referências bibliográficas 98

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO GERAL

1.1 O ritmo circadiano de temperatura corporal em mamíferos

Animais homeotérmicos, como a maioria dos mamíferos, são aqueles que regulam sua temperatura corporal (Tc) dentro de uma faixa de valores estreita (IUPS Thermal Commission, 2001). Um aspecto importante dessa regulação é que o valor de Tc defendido, dentro dessa faixa, varia ao longo do dia, exibindo um padrão que é repetido dia após dia, de forma rítmica (Mrosovsky, 1990). Esse ritmo diário de Tc é observado na maior parte das espécies de mamíferos homeotérmicos estudadas até hoje (Refinetti, 2010).

Além da Tc, diversas variáveis fisiológicas e comportamentais apresentam ritmicidade diária. Em um primeiro momento, poder-se-ia assumir que esses ritmos biológicos são apenas reações fisiológicas ou comportamentais aos ciclos ambientais diários, como os de intensidade luminosa, de temperatura e de disponibilidade alimentar. Entretanto, essa expressão rítmica continua a ser observada mesmo quando o organismo em questão é exposto a uma condição na qual todas as variáveis ambientais são mantidas constantes. Nessa situação, o período do ritmo (ou seja, o intervalo de tempo que cada ciclo leva para se completar) é sempre diferente, embora próximo, de 24 horas, motivo pelo qual esse ritmo recebe o nome de circadiano, termo do latim que significa "em torno de um dia" (Halberg et al., 1959). A persistência em condições constantes é uma evidência de que esses ritmos são gerados endogenamente, por estruturas chamadas osciladores circadianos (Pittendrigh, 1960).

De forma geral, os valores mais altos de Tc ocorrem nos mesmos horários do dia em que há atividade locomotora, o que pode levar à ideia de que o ritmo circadiano de Tc é uma mera consequência dos efeitos agudos da atividade muscular na Tc. No entanto, diversos estudos verificaram que ambos os ritmos persistem independentemente um do outro (Mrosovsky, 1990). Uma dessas evidências é o fato da Tc de humanos apresentar valores mais altos durante o dia e mais baixos durante a noite mesmo quando o indivíduo é mantido em repouso absoluto, condição na qual a Tc não está sujeita aos efeitos agudos da atividade locomotora (Minors e Waterhouse, 1984). Há controvérsias, porém, sobre se os ritmos de Tc e de atividade locomotora são controlados por osciladores circadianos anatomicamente distintos ou se o controle temporal de ambos é realizado pelo mesmo marca-passo. Os estudos que exploraram essa questão não apresentam resultados uniformes, sendo que essa pergunta nunca foi, definitivamente, respondida (Kittrell, 1991). Um dos motivos pelos quais os resultados desses estudos não são conclusivos é que eles esbarram em todos os problemas inerentes às investigações baseadas em lesões neurais. Nesse sentido, abordagens que

possibilitem explorar esse assunto em animais neurologicamente intactos podem trazer evidências importantes para a elucidação dessa questão.

1.2. O ambiente subterrâneo e os roedores que o habitam

Explorar o ritmo circadiano de Tc em animais selvagens pode trazer informações valiosas a respeito da geração e de possíveis vantagens adaptativas desse ritmo, especialmente caso eles habitem ambientes extremos, como o subterrâneo. Buffenstein (2000) caracteriza o ambiente subterrâneo como "escuro, úmido, com baixa produtividade primária e ventilação limitada", condições físicas que impõem desafios à sobrevivência da maioria dos mamíferos. No entanto, diversas espécies de roedores apresentam mecanismos fisiológicos especializados que permitem sua sobrevivência nesse ambiente particular.

Dentre as características dos túneis subterrâneos que são distintas daquelas da superfície estão os padrões dos ciclos ambientais. Na superfície, o dia e a noite são muito bem marcados pelas variáveis ambientais cíclicas como as de temperatura e de iluminação, decorrentes da rotação da Terra. Abaixo da terra, no entanto, essas variações diárias, quando detectadas, ocorrem com amplitude muito atenuada (Burda et al, 2007). Essa condição peculiar levanta a questão sobre a existência de ritmos circadianos em roedores subterrâneos, que passam a maior parte de suas vidas dentro dos túneis, com pouca exposição a pistas temporais externas. Caso a ritmicidade endógena exista, é interessante verificar se esses ritmos estão sincronizados com o dia e a noite externos.

O estudo da ritmicidade de Tc em animais subterrâneos, em particular, é interessante, pois diversas características dos túneis impõem desafios específicos à termorregulação. Devido à estagnação do ar e à alta umidade relativa, a dissipação de calor é dificultada dentro dos túneis. Isso aumenta as chances de superaquecimento do animal, particularmente durante a escavação, quando o animal realiza atividade muscular intensa (McNab, 1966). Existem também desafios ao metabolismo energético, que consequentemente podem comprometer a termorregulação. Dentre eles está a atmosfera hipóxica e hipercápnica das galerias subterrâneas. Além disso, o fato de o forrageamento acontecer majoritariamente por escavação e a pouca disponibilidade alimentar devido à baixa produtividade primária característica do ambiente, tornam a busca por alimento uma atividade com custo energético muito elevado (Luna e Antinuchi, 2007).

Poucos estudos a respeito do ritmo circadiano de Tc foram realizados em roedores subterrâneos. A maioria deles com espécies nativas da África e Ásia (Goldman et al., 1997; Lovegrove e Heldmaier, 1994; Lovegrove e Muir, 1996). No presente trabalho, investigamos

a ritmicidade de Tc em roedores subterrâneos pertencentes a um gênero sul-americano, denominado *Ctenomys*.

1.3. Tuco-tuco: um roedor subterrâneo sul-americano

O gênero *Ctenomys* (Rodentia: Ctenomydeae) compreende mais de 60 espécies, constituindo o maior gênero de roedores subterrâneos em número de espécies, a maioria delas solitária (Lacey et al. 2000). Esses animais são popularmente conhecidos como tuco-tucos ou ultutucos, nomes onomatopéicos em alusão ao som típico das suas vocalizações. O gênero distribui-se pelo cone sul da América do Sul, do Peru até a Terra do Fogo, ocupando uma ampla gama de habitats, que diferem quanto à vegetação, tipo de solo, clima e altitude (Lacey et al., 2000).

Embora as diversas espécies de *Ctenomys* apresentem tamanho corporal variado (de 100g a mais de 1.000g), a morfologia externa é muito similar entre elas (Luna et al., 2009). Os tuco-tucos apresentam características morfológicas e anatômicas especializadas para a vida subterrânea, como corpo fusiforme, maior musculatura dos membros anteriores e pavilhões auriculares reduzidos (Stein, 2000). Por outro lado, algumas características se assemelham mais àquelas de roedores de superfície, como o tamanho dos olhos e estrutura da retina (Schleich et al. 2010). Há registros de que esses animais realizam atividades de forrageio e de remoção de solo, na superfície (Vassallo et al. 1994, Tomotani et al., no prelo). Quando estão em seus túneis, no entanto, cobrem o seu acesso, impedindo a entrada de luz e de predadores.

Embora algumas espécies de *Ctenomys* sejam alvo de intensos estudos fisiológicos, ecológicos e genéticos, a biologia da maioria das espécies de tuco-tucos é desconhecida (Lacey et al. 2000). Desde 2007, nosso laboratório estuda uma espécie até então pouquíssimo conhecida, *Ctenomys* aff. *knighti* (Fig 1.1), que ocorre na província de La Rioja, localizada no semi-árido noroeste argentino. Os indivíduos dessa espécie são capturados com relativa facilidade e se mantêm saudáveis em cativeiro. Tudo isso, associado ao fato desses tuco-tucos se encontrarem a poucos metros do centro de pesquisas onde os experimentos são realizados, torna esses animais um sistema excelente para estudos tanto em laboratório quanto em campo. Em laboratório, seu ritmo circadiano de atividade locomotora foi caracterizado (Valentinuzzi et al., 2009) e os mecanismos de sincronização desse ritmo com o ciclo ambiental de claro/escuro foram investigados (Flôres, 2011). Já em campo, estudos revelaram que esses animais realizam atividades na superfície com frequência durante o dia (Tomotani et al., no prelo).

Figura 1.1. Indivíduos de *Ctenomys* aff. *knighti* em condições naturais (à esquerda) e de laboratório sobre roda de atividades (à direita), aqui retratada em uma termografia (a escala de cores corresponde à temperatura em ^{o}C).

1.4. Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo abordar um novo aspecto da fisiologia e da organização temporal desses animais, ao estudar, em laboratório, o ritmo circadiano de Tc em *Ctenomys* aff. *knighti* e sua relação com o ritmo circadiano de atividade locomotora Para isso, estabelecemos os seguintes objetivos específicos:

1) Verificar a endogenicidade do ritmo de Tc, bem como sua sincronização com o ciclo de claro/escuro (Capítulo 4);
2) Investigar as diferenças e semelhanças nos parâmetros do ritmo de Tc dos animais na presença e na ausência da roda de atividade, relacionando-os ao comportamento dos tuco-tucos nessas duas situações (Capítulo 5);
3) Estudar a dependência de fase dos efeitos agudos da atividade locomotora na Tc e estabelecer um método estatístico para filtrá-los dos dados brutos da ritmicidade (Capítulo 6);
4) Investigar se o mesmo oscilador circadiano que gera o ritmo de atividade locomotora também gera o ritmo circadiano de Tc, em tuco-tucos (Capítulo 7).

Todas as etapas experimentais deste projeto foram conduzidas no *Centro Regional de Investigaciones Científicas y Transferência Tecnológica* (CRILAR), sob co-orientação da Dra. Verónica Sandra Valentinuzzi.

CAPITULO 2 - MATERIAL E MÉTODOS GERAIS

Este capítulo apresenta informações sobre os animais estudados e os métodos comuns à maior parte dos experimentos. Os protocolos experimentais e outros detalhes específicos de cada experimento serão abordados nos próximos capítulos.

2.1. Animais

Inicialmente, os tuco-tucos encontrados na área de estudo deste trabalho foram identificados como *Ctenomys knighti* Thomas, 1919. No entanto, existem diferenças entre a morfologia dos animais e a descrição morfológica original feita por Thomas (1919), além da área de ocorrência ser distante daquela do holótipo (B. Tomotani, observações pessoais). Por esses motivos, o processo de identificação da espécie ainda está em andamento. Análises de cariótipo foram realizadas pelo *Grupo de Investigaciones de la Biodiversidad (GIB) IADIZA-CCT Mendoza-CONICET* e o número cromossômico difere daquele das populações geograficamente próximas (Fornel, 2010). Pele e esqueletos encontram-se depositados nas coleções dos museus *Centro Nacional Patagónico- CENPAT, Puerto Madryn, Chubut* (espécimens CNP2429 a 2432), *Colección de Mamíferos de la Fundación Miguel Lillo, Tucumán* (sem número de tombo) e *Colección Mastozoológica Del IADIZA, Mendoza* (sem número de tombo). Como a identidade dos tuco-tucos da área de estudo ainda está em discussão, no presente trabalho os animais serão tratados por *Ctenomys* aff. *knighti*.

Neste estudo foram utilizados somente indivíduos adultos de *C.* aff. *knighti*, embora a idade exata deles seja desconhecida, uma vez que todos foram capturados em seu habitat natural. Foram utilizados tanto machos quando fêmeas, que pesavam entre 116 e 220g. A tabela 1.1 reúne informações referentes a cada indivíduo utilizado. Após a realização dos experimentos nenhum animal foi eutanasiado ou liberado na natureza. Esses tuco-tucos permaneceram no laboratório e foram alocados em outros experimentos.

Todos os procedimentos realizados com esses animais foram autorizados pelo Escritório Técnico e Legal (*Oficina de Técnica legal*) da Secretaria do Meio-Ambiente de La Rioja (*Secretaria de Ambiente, Ministerio de Producción y Desarrollo Local*), autorização *n° 028-10* e pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (CEUA IB-USP), protocolo 2012.1.112.41.8 As técnicas de

captura, alojamento e manutenção dos animais seguem as recomendações da *American Society of Mammalogists* para o uso de animais silvestres em pesquisa (Sikes et al., 2011).

Tabela 2.1. Informações sobre os animais utilizados no estudo e os experimentos dos quais eles participaram.

		Captura		Cirurgia		Experimentos			
Animal	**Sexo**	**Data (dd/mm/aa)**	**Peso (g)**	**Data (dd/mm/aa)**	**Peso (g)**	**Caracterização básica**	**Parâmetros rítmicos com e sem roda**	**Comportamento com e sem roda**	**Claro constante**
#45	♀	14/07/09	138	12/02/10	152	X	X	-	-
#46	♀	14/07/09	153	12/02/10	176	X	X	X	X
#52	♀	08/12/09	62	02/06/10	146	X	X	X	X
#69	♂	20/04/10	220	05/02/11	177	X	X	-	X
#97	♂	17/06/11	195	21/07/11	195	X	X	X	-
#98	♂	19/06/11	197	18/07/11	190	X	X	X	-
#99	♂	21/06/11	145	03/08/11	147	-	-	-	X
#100	♀	15/07/11	127	30/07/11	128	-	-	X	X
#101	♀	20/07/11	154	01/08/11	153	-	-	X	X
#102	♂	21/07/11	124	31/07/11	116	-	-	X	X
#104	♂	25/07/11	220	02/08/11	220	-	-	-	X
#106	♀	05/08/11	135	08/08/11	135	-	-	X	X

2.2. Área de estudo e método de captura

Os experimentos foram conduzidos no *Centro Regional de Investigaciones Científicas y Transferência Tecnológica* (CRILAR), localizado em Anillaco, na província argentina de La Rioja (26° 48’ S; 66° 56’ W; 1445 m). Todos os animais utilizados neste estudo foram capturados dentro de uma área de 15 km^2 ao redor do centro de pesquisa. Essa área, localizada no deserto de Monte, apresenta clima semi-árido, solo arenoso e vegetação composta de arbustos esparsos, algumas plantas rasteiras e poucas árvores (Abraham et al., 2009). Além de ocuparem as áreas de vegetação nativa, os tuco-tucos também são encontrados em plantações de uva, azeitona e nozes, que são abundantes na região.

Para a captura dos animais foram utilizadas armadilhas do tipo *live-trap*, as quais não provocam nenhum ferimento ao animal. Cada armadilha consiste em um tubo de PVC (25 cm de comprimento e 7,5cm de diâmetro) que contém uma rede aramada em uma das extremidades e uma portinhola de metal na outra. A armadilha é posicionada na saída da toca

do animal, com a portinhola aberta. Dentro do tubo de PVC há um gatilho que é acionado quando o tuco-tuco entra na armadilha, fechando a portinhola e mantendo o animal dentro do tubo. Após a colocação das armadilhas, foram realizadas inspeções em intervalos de no máximo 3 horas, para que o animal não ficasse muito tempo preso. Após a captura, os tuco-tucos foram levados imediatamente ao laboratório, onde foram pesados e colocados em uma gaiola de vidro ou acrílico. Alimentos foram oferecidos assim que os animais estavam acomodados nas gaiolas.

2.3. Alojamento e manutenção dos animais

Para a realização dos experimentos, os tuco-tucos foram mantidos individualmente em gaiolas de acrílico (53x29x27cm), equipadas com rodas de atividade (23 cm de diâmetro, 10 cm de largura, 1 cm entre as barras) e forradas com uma camada de papel picado. Essas gaiolas foram alojadas dentro de caixas de isolamento com ventilação, que acomodavam de um a dois animais. Cada caixa estava equipada com uma lâmpada fluorescente de 36 W conectada a um timer e com duas lâmpadas de luz vermelha conectadas a um *dimmer*. Os alimentos foram oferecidos *ad libitum* e a dieta foi constituída de ração para roedores, cenoura, batata doce, verduras, aveia e sementes de girassol. A reposição dos alimentos ocorreu diariamente, em horários aleatórios, e a limpeza das gaiolas ocorreu semanalmente. Não foi oferecida água, como é o procedimento comum em experimentos com animais subterrâneos e de deserto, que não consomem água livre em condições naturais (Buffenstein, 2000; Schmidt-Nielsen, 1972). A umidade relativa do laboratório variou entre 30 e 60% e a temperatura foi mantida a 26±2^{o}C, valores que se encontram dentro das zonas termoneutras medidas para outras espécies de *Ctenomys* (Busch, 1989). *Data loggers* (HOBO U10/003; Onset Computer Corporation, Bourne, MA) registraram a temperatura e a umidade relativa do laboratório a cada 15 minutos.

2.4. Condições de iluminação

A principal variável ambiental manipulada em nossos experimentos foi a intensidade luminosa. Utilizamos, neste trabalho, dois tipos de condições luminosas. Na condição que chamamos de claro, eram mantidas acesas tanto a lâmpada fluorescente branca quanto as lâmpadas vermelhas, resultando em uma intensidade luminosa de 200 a 300 lux, medidos na

altura da tampa da gaiola. Na condição que denominamos de escuro a lâmpada fluorescente era desligada, mas as lâmpadas vermelhas eram mantidas acesas para possibilitar a manutenção dos animais. Dessa forma, a condição de escuro foi, na verdade, caracterizada pela presença de luz vermelha de baixa intensidade (1-5 lux). Dependendo do experimento os animais eram expostos à condição de escuro constante (EE), claro constante (CC) ou ciclo de claro/escuro (CE). O ciclo de CE utilizado nos nossos experimentos consistiu em 12 horas de claro seguidas de 12 horas de escuro. Por esse motivo, nos referimos a esse ciclo utilizando a notação CE 12:12.

2.5. Métodos de medição de Tc

Para a realização de estudos do ritmo circadiano de Tc, é necessário que as medidas de temperatura sejam tomadas em intervalos regulares ao longo de vários dias. Idealmente isso deve ser feito sem que o animal seja manipulado, uma vez que o estresse da manipulação pode aumentar os valores da Tc (Cabanac e Briese, 1992). Usualmente, trabalhos com mamíferos utilizam termopares ou sensores de temperatura implantados na cavidade abdominal (Refinetti e Menaker, 1992a). Os termopares são cabos flexíveis compostos de dois fios, cada um feito de um metal diferente (Baker et al., 1975). Uma das extremidades desse cabo é termossensível e pode ser inserida no reto do animal. Medidas contínuas no tempo podem ser obtidas conectando-se o termopar a um aparelho de leitura e registro (Mansberg e Hendler, 1963). Embora essa técnica tenha a vantagem de ser menos invasiva, uma vez que não há necessidade de cirurgia, ela foi descartada no primeiro teste que tentamos realizar com os tuco-tucos, pois os animais roíam os cabos assim que eram colocados na gaiola. Partimos, portanto, para o uso de sensores implantados na cavidade peritoneal e testamos dois aparelhos distintos, antes do início dos experimentos deste trabalho.

Inicialmente testamos *data loggers* de temperatura (Fig 2.1A), disponíveis comercialmente sob o nome de *iButtons* (modelo DS1921H; Maxim/Dallas Semiconductor Corp., USA). Esses *data loggers* são redondos (diâmetro de 17,3 mm e espessura de 5,9 mm) e pesam 3,3 g. Como não são fabricados com o intuito de serem implantados, esses aparelhos não são impermeáveis. Por isso, os *iButtons* não podiam ser submersos em solução esterilizante e necessitavam de uma proteção feita com uma película selante (Parafilm-M; American National Co, Chicago, IL). Essa proteção aumentava tanto o tamanho quanto o

peso do aparelho implantado. Além disso, uma vez que os registros são armazenados no próprio aparelho, é necessário retirá-lo do animal, ao final do experimento, o que envolve um segundo procedimento cirúrgico. No experimento piloto realizado com *iButtons*, envolvendo oito animais, apenas 50% dos sensores funcionaram. Essa baixa taxa de sucesso pode estar relacionada com o fato do sensor não ser impermeável e das medidas adotadas para protegê-lo não terem sido adequadas. Os dados que puderam ser recuperados eram de boa qualidade, porém existe limitação do tempo pelo qual é possível coletar dados continuamente. Utilizando um intervalo entre medidas de 15 minutos, por exemplo, é possível coletar dados por apenas 23 dias, tempo insuficiente para a realização da maioria dos experimentos executados neste estudo.

Figura 2.1. Fotografias do *data logger* de temperatura, *iButton* (A) e do transmissor telemétrico, G2 *E-Mitter* (B) ao lado de tuco-tucos anestesiados e posicionados com o ventre voltado para cima.

O segundo sensor testado, e escolhido para ser utilizado neste trabalho, foi um transmissor telemétrico sem bateria (modelo G2 E-Mitter; Mini Mitter, Bend, OR) (Fig. 2.1B). Esse transmissor envia informações sobre a Tc e atividade locomotora geral para uma placa receptora conectada a um computador, permitindo, dessa forma, o acompanhamento dos dados em tempo real. Como os dados são armazenados no computador e o sensor não precisa de bateria para funcionar, não há limitação de tempo para realização das medidas. Dessa forma, podemos realizar experimentos com a duração de vários meses e até registrar a

Tc durante toda a vida do animal. Esses transmissores também têm a vantagem de pesarem apenas 1,1 g e terem um formato semelhante ao de uma cápsula (15,5 mm de comprimento e 6,5 mm de diâmetro). Esse formato permite que a incisão feita para o implante seja menor. Além disso, o transmissor é impermeável, tornando possível sua esterilização em líquidos e garantindo seu funcionamento na cavidade abdominal.

2.6. Procedimentos cirúrgicos:

Não há registros na literatura de procedimentos cirúrgicos para o implante de sensores na cavidade peritoneal em *Ctenomys*. Dessa forma, desenvolver o protocolo cirúrgico foi uma etapa crucial deste trabalho. Utilizando como ponto de partida um protocolo utilizado em ratos de laboratório, modificamos diversos procedimentos para que se adequassem às peculiaridades da anatomia e fisiologia dos tuco-tucos. Os detalhes e o processo de desenvolvimento desse novo protocolo cirúrgico encontram-se no Apêndice 1.

As primeiras cirurgias foram realizadas em animais anestesiados por 100 mg/Kg de ketamina (Ketamina 50, Holliday-Scott S.A., Buenos Aires, Argentina) e 10mg/Kg de xilazina (Kensol®, Avellaneda, Argentina) ou por 200mg/Kg de ketamina e 20mg/Kg de acepromazina (Acedam, Holliday-Scott S.A., Buenos Aires, Argentina). O procedimento consistiu em uma incisão de aproximadamente um centímetro no abdômen do animal para que o transmissor, que pesa cerca de 1g, fosse acomodado na cavidade peritoneal. Durante todo o procedimento, o tuco-tuco foi mantido sobre uma manta térmica para evitar que houvesse hipotermia. Após a cirurgia, foi administrada uma dose profilática de analgésico, flunixina meglumina (Banamine® Schering-Plough, Rio de Janeiro, Brazil; 2,5mg/Kg) e antibiótico, enrofloxacino (Flotril® 2.5%, Schering-Plough, Rio de Janeiro, Brazil; 10mg/Kg). Em seguida, os animais foram mantidos em observação por 3-5 dias.

2.7. Coleta dos dados de Tc e de atividade locomotora

Em todos os experimentos, foram medidas, simultaneamente, a Tc e a atividade locomotora de cada animal. Para o registro de Tc, cada gaiola foi colocada sobre uma placa receptora (modelo ER-4000; Mini Mitter, Bend, OR) conectada a um computador, que recebia continuamente os dados do transmissor e os processava através do *software VitalView* (Mini-Mitter, Bend, OR). O registro de atividade locomotora foi realizado tanto pelo transmissor intraperitoneal (que media a atividade locomotora geral) quanto através da

contagem das revoluções de uma roda de atividade acoplada ao programa de registro *ArChron Data Acquisition System* (Simonetta System, Universidad Nacional de Quilmes, Buenos Aires). A atividade locomotora de alguns animais também foi detectada através de sensores de infravermelho posicionados na tampa da gaiola e conectados ao programa *Archron*. O registro de todas as variáveis foi realizado em intervalos de 5 minutos.

No experimento que envolveu a filmagem dos animais (Capítulo 5), as placas receptoras foram posicionadas no chão do laboratório para que todas as gaiolas pudessem ser simultaneamente capturadas por uma filmadora fixada no teto do laboratório (Fig. 2.2). Essa filmadora se conectava a um computador equipado com o *software Big Brother* (Actimetrics, Wilmette, IL) que realizava a gravação contínua dos vídeos.

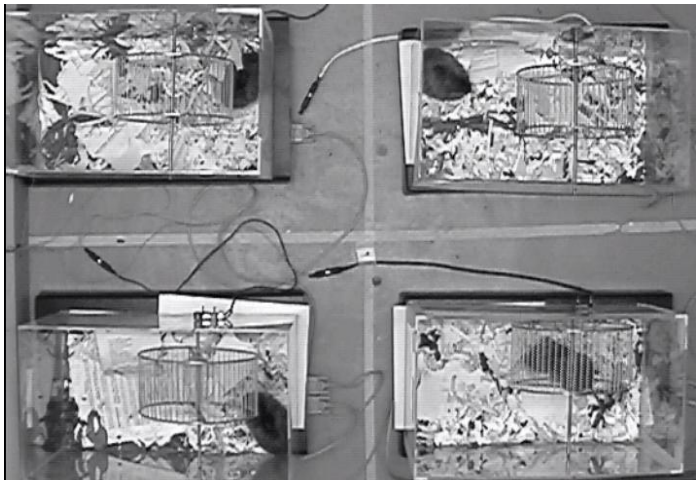

Figura 2.2. Imagem capturada pelo sistema de vídeo, na qual aparecem os quatro animais envolvidos no experimento.

2.8. Análise dos dados

2.8.1. Actogramas

Para que os padrões rítmicos fossem visualizados, foram construídos *actogramas*, utilizando-se o software *ElTemps* (Díez-Noguera, Universitat de Barcelona, 1999). Essa forma de representação gráfica é tradicionalmente utilizada para registros de atividade locomotora, mas também pode ser utilizada para a visualização de outras variáveis biológicas. O conceito por trás de um gráfico do tipo actograma é simples. É como se um grande gráfico da série temporal fosse cortado a cada 24 horas (Fig.2.3A) e cada um desses trechos fossem empilhados, de forma que cada linha do gráfico correspondesse a um dia

(Moore-Ede et al., 1982). Para melhor visualização, os actogramas são construídos em duplicata. Para isso, apresenta-se dois gráficos idênticos um ao lado do outro, sendo que o gráfico da direita posiciona-se deslocado uma linha para cima, conforme Fig.2.3B. Dessa forma, são visualizados os registros de 48 horas em uma única linha.

Para facilitar a visualização dos dados, os actogramas mostram apenas os valores, de Tc ou de atividade locomotora, que ficam entre limites mínimos e máximos estabelecidos para cada animal. Assim, uma barra preta é apresentada no actograma de Tc, de atividade em roda ou de atividade geral, respectivamente, nos horários em que a Tc, as revoluções da roda de atividade ou as contagens de atividade do sensor intraperitoneal ultrapassam um limite mínimo (Fig. 2.3). O estabelecimento do limite máximo impede que os valores mais baixos, apresentados no actograma, sejam "ofuscados" por valores mais altos, especialmente em actogramas que apresentam muitos dias de dados, nos quais a altura de cada linha é muito pequena. Para os dados de atividade em roda, o limite mínimo sempre era zero, ou seja, todos os momentos nos quais os animais correram na roda foram representados no actograma. O limite máximo selecionado foi de 100 revoluções por 5 minutos. Já no caso da atividade locomotora geral o limite mínimo consistiu em 50 e o limite máximo em 100 contagens do sensor intraperitoneal por 5 minutos. Para a Tc, os limites mínimos e máximos foram selecionados individualmente para cada animal, uma vez que há variabilidade interindividual nos valores dessa variável.

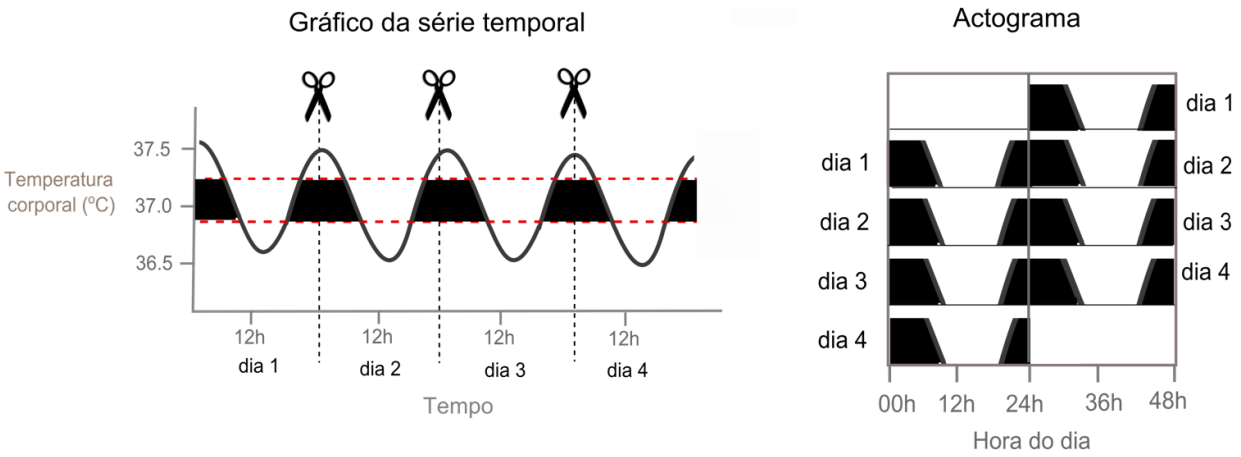

Figura 2.3. Construção de um actograma a partir de dados hipotéticos de Tc. No gráfico da esquerda os dados brutos de Tc referentes a quatro dias estão apresentados em função do tempo. As linhas horizontais vermelhas representam os limites máximos e mínimos dos valores de Tc que serão indicados no actograma (áreas em preto). As linhas pontilhadas verticais demarcam o início de cada dia, onde o gráfico da série temporal será "cortado". Esses trechos correspondentes a24 horas de dados são então empilhados, sequencialmente, formando um actograma (esquerda), aqui representado em duplicata. Os actogramas de atividade locomotora são construídos da mesma forma (ver texto).

2.8.2. Plexogramas: cálculo de fases, relação de fases e amplitude:

Para as análises de amplitude e relação de fase entre os ritmos de Tc e de atividade locomotora, foram construídos plexogramas, os quais são formas de representação gráfica nas quais são apresentadas as médias dos valores de todos os dias de registro, por horário de medição. Dessa forma, a abscissa do gráfico mostra os horários ao longo das 24 horas e a ordenada os valores médios da variável medida. Para a construção dos plexogramas, foram utilizados dados obtidos ao longo de 10 dias. A relação de fase entre os ritmos foi calculada utilizando-se o *onset* de cada plexograma como a fase de referência e com a seguinte fórmula: relação de fase = (*onset* do ritmo de Tc) – (*onset* do ritmo de atividade locomotora). O *onset* foi definido como o horário no qual o valor da variável no plexograma ultrapassava o valor médio total e se mantinha elevado por pelo menos 1 hora. A amplitude foi calculada como a diferença entre os valores máximo e mínimo do plexograma. É importante ressaltar que, segundo algumas definições,essa diferença entre o máximo e o mínimo é chamada de "faixa de oscilação" (*range of oscillation*), enquanto a amplitude é considerada a diferença entre o valor máximo e/ou mínimo e a média (Aschoff et al., 1965). Optamos por utilizar o termo amplitude em vez de "faixa de oscilação" por questões de fluidez e compreensibilidade do texto. A construção e análise dos plexogramas foram realizadas utilizando-se a linguagem de programação R, versão 2.11.1. (R Development Core Team, 2010).

2.8.3. Cálculo do período através do teste Periodograma Qui-quadrado

Os períodos dos ritmos em diferentes condições foram calculados pelo teste estatístico Períodograma Qui-quadrado de Sokolove e Bushell (1978), realizado através do software *ClockLab* (Actimetrics, Evanston, IL). A aplicação do teste sempre foi realizada em conjuntos que consistiam de 10 a 15 dias de dados. Para ilustrar o funcionamento desse teste, utilizamos um conjunto de dados fictícios, correspondentes a 10 dias, gerados com intervalo de 5 minutos e período igual a 24 horas (Fig. 2.4A).

De forma geral, o teste Periodograma Qui-quadrado funciona da seguinte maneira: para cada período "P" a ser testado, é construído com plexograma, cujo valor do limite máximo da abscissa é igual a P (Fig. 2.4B). É calculada, então, a diferença entre o valor da média para cada horário (ou seja, de cada ponto do plexograma) e o valor da média total do conjunto de dados. A partir da soma dessas diferenças, podemos obter o desvio padrão total de cada plexograma. Quanto mais consistente for o plexograma, maior será o seu desvio

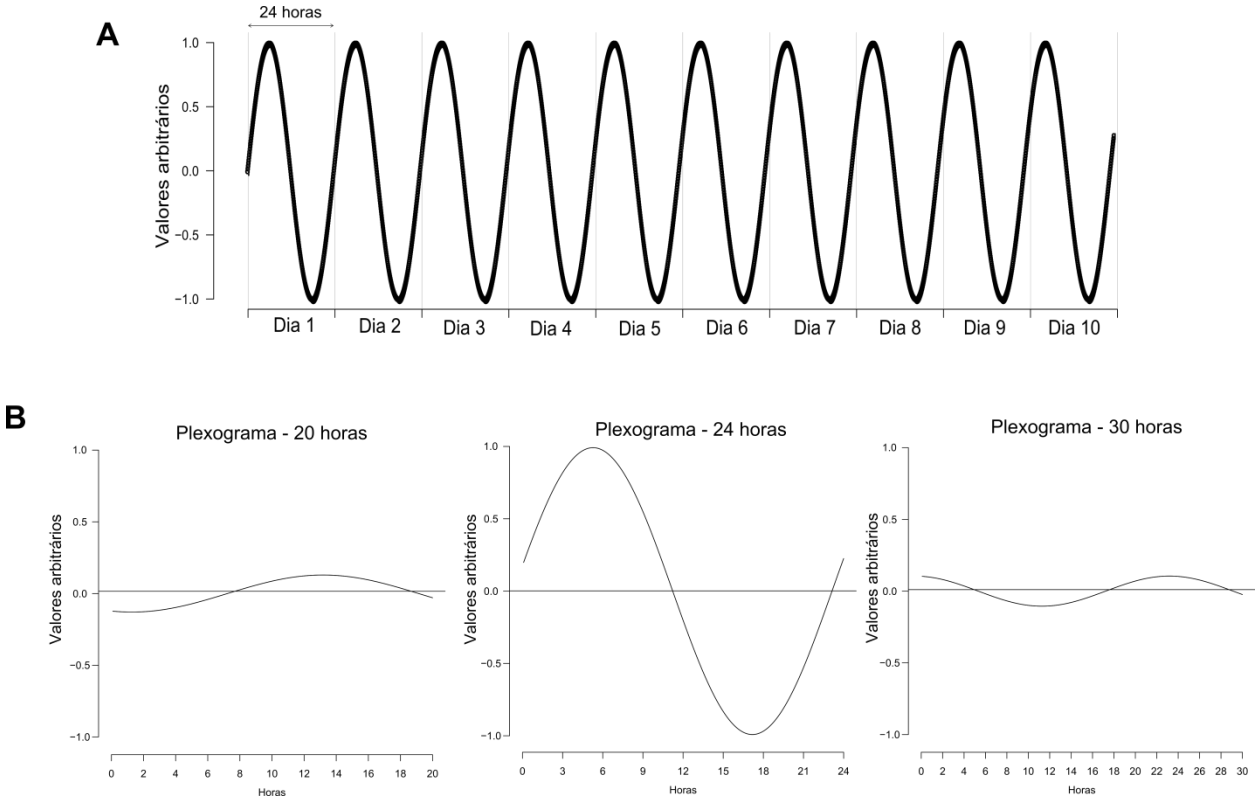

Figura 2.4. Ilustração do funcionamento do teste Periodograma Qui-quadrado. **A.** Gráfico da série temporal dos dados fictícios com período de 24 horas, com comprimento de 10 dias. B. Exemplo de três plexogramas construídos para diferentes períodos ("P"): 20 horas, 24 horas e 30 horas. A linha horizontal representa a média total dos dados. O plexograma construído para o P igual ao período real (24 horas) apresenta seus pontos muito mais distantes da média total, ou seja, o desvio padrão total do plexograma é muito maior do que aqueles obtidos para os outros dois P.

padrão total, ou seja, a maior a soma das distâncias entre os pontos da curva e a média total (Fig. 2.4B).

O desvio padrão do plexograma é então normalizado pelo desvio padrão total do conjunto de dados para que seja obtido um valor "Q_p" (para detalhes do cálculo de Q_p, ver Sokolove e Bushell, 1978). Esse procedimento é repetido para cada P a ser testado e é, então, construído um gráfico de Q_p em função de P (Fig. 2.5). O período no qual o "pico" do gráfico ocorre é considerado o período do ritmo. Além disso, uma linha de significância ($p<0,05$) é traçada no gráfico, de forma que apenas os valores dos "picos" acima dela são considerados.

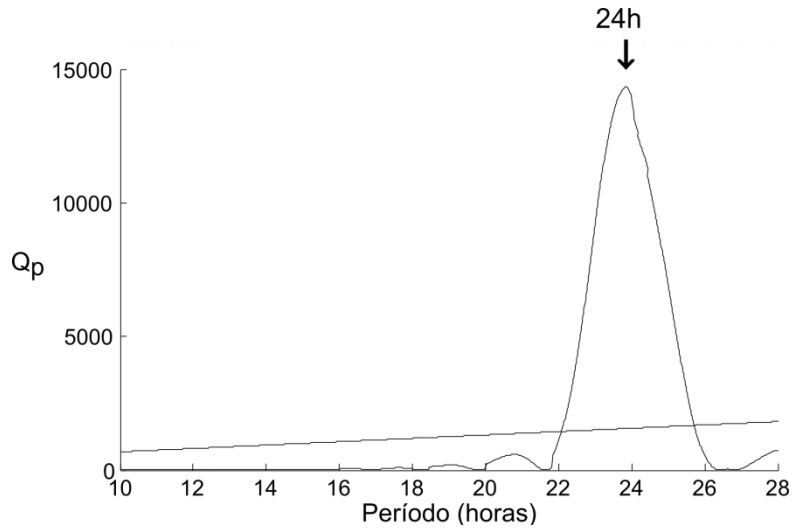

Figura 2.5. Gráfico resultante do teste Periodograma Qui-quadrado para os dados fictícios apresentados na figura 2.4. Nele, Qp está apresentado em função dos períodos, "P", testados. Nota-se que o pico ocorre em P=24 horas, equivalente ao período real dos dados. Também está representada no gráfico uma linha de significância para $p<0,05$.

CAPÍTULO 3 – CONCEITOS BÁSICOS DE CRONOBIOLOGIA

3.1. Um breve histórico da cronobiologia

Relatos de ritmos biológicos datam desde a antiguidade. Em 350 a.C., por exemplo, o filósofo grego Aristóteles escreveu sobre suas observações de que vários animais iniciavam a atividade e dormiam em horários específicos do dia (*apud* Daan, 2010). Durante quase dois mil anos, os relatos sobre ritmos biológicos restringiram-se a observações dos organismos em seu habitat natural. A primeira abordagem experimental a investigar esse assunto foi realizada em 1729, pelo astrônomo francês de Mairan (*apud* Moore-Ede et al., 1982). Ele estudou o movimento foliar de uma espécie de *Mimosa* e observou que, mesmo quando a planta era colocada dentro de um armário escuro, as folhas continuavam abrindo durante o dia e se fechando durante a noite. Esse experimento demonstrou que o ritmo de movimento das folhas de *Mimosa* não era meramente uma reação às condições de iluminação do ambiente. Alguns anos mais tarde, seu compatriota, Duhamel du Monceau, realizou um estudo parecido, mas desta vez em uma caverna que, além de ser permanentemente escura, ainda apresentava temperatura ambiental (Ta) constante (1758 *apud* Moore-Ede et al., 1982). Du Monceau relatou que até mesmo nessas condições o movimento foliar apresentava padrão rítmico. Essas observações não passaram despercebidas por Charles Darwin, que postulou, em seu livro "*The power of movement in plants*", que a ritmicidade desses movimentos foliares poderia ter valor adaptativo (Darwin e Darwin, 1880), pois, à noite, com as folhas fechadas, a perda de calor seria minimizada, enquanto durante o dia a abertura das folhas garantiria o máximo de superfície exposta à luz, para realização da fotossíntese.

Apesar da persistência de um ritmo diário em condições de iluminação e Ta constante ser uma evidência da sua natureza endógena, ainda perdurou a suspeita de que alguma outra pista temporal do ambiente, desconhecida pelos experimentadores, pudesse estar causando as respostas rítmicas observadas nas folhas da *Mimosa*. No entanto, em 1832, o botânico suíço A. de Candolle relatou que o ritmo de movimento foliar não somente persistia na ausência de pistas temporais externas, mas também exibia, nessas condições, um período de 22 a 23 horas (*apud* Moore-Ede et al., 1982). A observação de de Candolle recebeu atenção somente dois séculos depois, quando Erwin Bünning (1930) salientou que os períodos próximos, mas não idênticos a 24 horas, dos ritmos em livre-curso (i.e. expressos em condições constantes),

eram uma propriedade geral dos ritmos circadianos (*apud* Foster e Keitzman, 2005). Mais tarde, os períodos diferentes de 24 horas foram considerados a prova definitiva da existência de um oscilador circadiano endógeno (Pittendrigh, 1960).

Apesar da investigação intensa de ritmos em plantas, a persistência de ritmos na ausência de pistas ambientais cíclicas em animais começou a ser investigada somente no fim do século XIX, sendo um dos primeiros estudos do gênero um trabalho realizado sobre o ritmo de Tc, em macacos-de-cheiro (*Saimiri sciureus*, Cebidae) (Simpson e Galbrath, 1905 *apud* Moore-Ede et al., 1982). Alguns anos mais tarde, em 1922, o fisiólogo americano Curt Richter publicou um trabalho acerca do ritmo diário de atividade locomotora em ratos de laboratório, no qual relata o mesmo fenômeno observado em plantas por de Candolle: em condições constantes esse ritmo apresentava sempre um período diferente de 24 horas (*apud* Moore-Ede, 1982).

Na metade do século XX o estudo de ritmos biológicos já havia despertado o interesse de pesquisadores de diversas áreas, mas foi apenas em 1960, na reunião *Cold Spring Harbor Symposium on Biological Clocks*, que a cronobiologia (como foi chamada a área que estuda ritmos biológicos), teve sua sistematização disciplinar (Rotenberg et al., 2003). Esse simpósio, que reuniu nomes importantes da área, como Collin Pittendrigh e Jürgen Aschoff, foi fundamental para que muitos dos conceitos utilizados até hoje fossem consolidados. A partir de então, as investigações nesse campo de estudo vêm se intensificando. Apesar de outros ritmos biológicos, como os sazonais e os circa-marés (aqueles que se sincronizam com o ciclo das marés), também receberem atenção dos cronobiólogos, os ritmos mais estudados são os circadianos.

3.2. Estrutura do sistema circadiano em mamíferos

Com o conhecimento acumulado até a década de 60, já podemos traçar um modelo básico do sistema circadiano (Fig. 3.1). Sabemos que a geração endógena da ritmicidade é realizada por um oscilador circadiano. Para que os ritmos das variáveis fisiológicas e comportamentais sejam expressos, os sinais rítmicos do oscilador devem ser transmitidos para os diversos órgãos e tecidos do organismo, por vias eferentes. Por fim, sabemos que os ritmos circadianos sincronizam-se com os ciclos ambientais. Para que essa sincronização

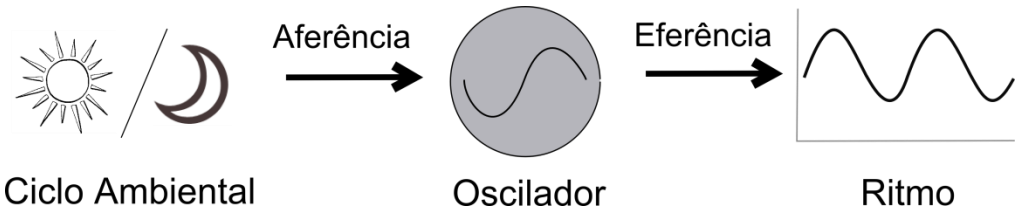

Figura 3.1. Modelo simplificado do sistema circadiano. A geração da ritmicidade circadiana ocorre no oscilador circadiano. As informações temporais dessa ritmicidade são transmitidas ao organismo por vias eferentes, levando à expressão dos diversos ritmos circadianos observados. Já a informação temporal dos ciclos ambientais é transmitida ao oscilador através de vias aferentes.

ocorra, é importante que as informações temporais do ambiente sejam processadas e transmitidas ao oscilador, pelas vias aferentes.

Os esforços para identificar, anatomicamente, esses componentes do sistema circadiano em mamíferos concentraram-se na segunda metade do século XX. No fim da década de 60, Curt Richter (1967) realizou uma série de experimentos cujos resultados sugeriram que o oscilador circadiano estava localizado no hipotálamo. Poucos anos depois, descobriu-se que há um trato nervoso conectando a retina ao hipotálamo, denominado trato retino-hipotalâmico, e que esse trato apresenta projeções para dois pequenos núcleos localizados acima do quiasma óptico, os núcleos supraquiasmáticos (NSQ) (Moore e Lenn, 1972). Como a sincronização dos ritmos circadianos com o ciclo de CE já era bem conhecida, os NSQ foram considerados candidatos excelentes a oscilador circadiano, uma vez que há uma via aferente para a transmissão da informação luminosa, projetada diretamente da retina. De fato, experimentos nos quais os NSQ foram lesados (Moore e Eichler, 1972; Stephan e Zucker, 1972) e transplantados (Ralph et al., 1990), comprovaram que esta é a localização do oscilador circadiano que controla ritmos como o de atividade locomotora e de ingestão de água. Os NSQ apresentam muitas projeções nervosas, tanto para outras áreas do hipotálamo e do cérebro quanto para órgãos periféricos (Bartness et al., 2001; Watts, 1991). Essas projeções podem servir como vias eferentes nervosas, que transmitem os sinais do oscilador. Além dessas vias, há também evidências de eferências neurossecretórias (Silver et al., 1996).

3.3. Propriedades fundamentais dos ritmos circadianos

Atualmente, sabemos que ritmos circadianos estão presentes em todos os grupos de seres vivos, de protistas a eucariotos multicelulares (Dunlap et al., 2004). Notavelmente, as

propriedades formais desses ritmos são essencialmente as mesmas em todas as espécies, fato que já chamava a atenção de cientistas desde o simpósio em *Cold Spring Harbor* (Pittendrigh, 1960). Os ritmos circadianos diferenciam-se de outros ritmos bilógicos por apresentarem três propriedades formais fundamentais, independente do organismo em que são expressos (Marques et al., 2003). A primeira delas é a endogenicidade, comprovada pela persistência da ritmicidade em condições constantes na qual o ritmo, em livre-curso, expressa o período intrínseco do oscilador (chamado de τ - "tau"), sempre diferente de 24 horas. A segunda propriedade é a sincronização com ciclos ambientais, de forma que seja estabelecida uma relação de fase estável entre o ritmo biológico e o ciclo ambiental. Finalmente, todo ritmo circadiano apresenta compensação de seu período a variações de temperatura. Isso significa que, ao contrário de outros processos fisiológicos, cujas taxas ou velocidades variam de acordo com a temperatura (Hochachka e Somero, 2002), o valor do τ do oscilador circadiano é mantido quando há aumento ou diminuição da temperatura (Pittendrigh, 1954).

3.4. Mecanismos de sincronização

A endogenicidade dos ritmos circadianos permite que o organismo se prepare e se antecipe, em termos fisiológicos e/ou comportamentais para os desafios ambientais cíclicos e, portanto, previsíveis que recorrem a cada 24h (Enright, 1970). Essa antecipação fisiológica ocorre com a alocação temporal dos processos biológicos em fases específicas do dia. Para que essa alocação temporal ocorra, é necessário que o oscilador esteja sincronizado com os ciclos externos, através de um mecanismo denominado arrastamento. Nesse processo, as propriedades do oscilador circadiano são ajustadas de forma que ele passa a oscilar com o mesmo período do ciclo ambiental, o qual passa a ser chamado, nesse caso, de ***Zeitgeber*** (neologismo do alemão: *Zeit*=tempo, *Geber*=doador) (Aschoff, 1960). Para a maior parte dos seres vivos, o principal *Zeitgeber* com período de 24h é o ciclo diário de claro/escuro (CE), embora outros ciclos, como o de Ta, também possam arrastar o oscilador circadiano de diversos organismos (Moore-Ede et al., 1982). Dessa forma, a figura .3.1 e, mais tarde, a figura 4.1 representam, esquematicamente, o processo do arrastamento do oscilador circadiano por um ciclo ambiental diário. O ritmo observado, nestas condições, apresenta o mesmo período do *Zeitgeber*.

Além do arrastamento, a sincronização de um ritmo com um ciclo ambiental também pode acontecer por estimulação ou inibição direta da variável fisiológica ou comportamental

pela presença/ausência de alguma variável ambiental cíclica diária. Esse mecanismo de sincronização chamado de mascaramento ocorre sem que as propriedades do oscilador circadiano sejam alteradas, apenas pela modulação diária da expressão final do ritmo. Um exemplo claro de sincronização por mascaramento foi observado em esquilos voadores (*Glaucomys volans,* Sciuridae). Esses roedores, quando submetidos a ciclos diários de Ta, diminuíam a atividade locomotora na fase mais quente, concentrando-a na fase mais fria do dia. No entanto, quando os animais foram transferidos para Ta constante, ficou evidente que a fase e o período do oscilador não haviam sido ajustados pelo ciclo Ta, ou seja, o ritmo de 24h era apenas uma reação comportamental à temperatura mais alta (DeCoursey, 1960).

Muitas vezes, o arrastamento e o mascaramento atuam em conjunto na integração temporal do organismo com o ambiente. Enquanto o arrastamento resulta no estabelecimento de uma relação de fase estável entre o ritmo biológico e o ciclo ambiental, garantindo assim a rigidez necessária para a função de relógio biológico (Pittendrigh e Daan, 1976), o mascaramento permite uma resposta fisiológica ou comportamental imediata, por exemplo, diante de mudanças ambientais imprevisíveis. Um exemplo disso pode ser encontrado nos padrões de atividade locomotora de roedores diurnos de deserto. Apesar desses animais apresentarem-se ativos durante as horas de claro do dia, conforme ditado pelo oscilador circadiano arrastado por ciclos ambientais, a atividade é inibida quando a Ta é excessivamente alta, por mascaramento (Rezende et al, 2003). Dessa forma, podemos dizer que o mascaramento é parte integral no sistema de temporização biológica, pois confere plasticidade à expressão rítmica e ajuste fino da sincronização (Page, 1989).

3.5. Ritmos circadianos em roedores subterrâneos

Uma vez que a presença de ritmos endógenos, sincronizados com ciclos ambientais são importantes, principalmente, por conferirem antecipação fisiológica e comportamental às variações diárias das condições ambientais, é interessante investigar se animais que vivem em ambientes nos quais tais variações são mínimas, como o subterrâneo, exibem ritmos circadianos.

Estudos voltados para essas questões foram realizados majoritariamente em ratos-toupeiras e relataram grande variabilidade interindividual de padrões rítmicos. Nos vários estudos que investigaram atividade locomotora em membros da família africana Bathyergidae (Oosthuizen et al., 2003; Riccio e Goldman, 2000) e da família asiática Spalacidae (Ben-Schlomo et al., 2005, Nevo et al., 1882, Tobler et al., 1998), foram detectados, em condições

constantes, ritmos em livre-curso apenas em uma parte dos indivíduos, enquanto outros apresentaram-se arrítmicos. Esses trabalhos também relatam que quando os ratos-toupeiras são expostos a um ciclo de CE, a sincronização do ritmo de atividade locomotora não ocorre em todos os indivíduos. Além disso, dentre os animais nos quais ocorre sincronização, há tanto indivíduos diurnos quanto noturnos. Estudos acerca do ritmo de Tc são mais escassos, mas descrevem resultados muito similares aos do ritmo de atividade locomotora em espécies destas famílias (Goldman et al., 1997; Lovegrove e Heldmaier, 1994; Lovegrove e Muir, 1996).

Adaptações à vida subterrânea surgiram de forma independente nas várias famílias de roedores subterrâneos, tornando-os um grupo de animais extremamente interessante para estudos de convergência e divergência evolutiva de diversas funções (Nevo, 1979). Por esse motivo, estudos cronobiológicos em diferentes espécies podem trazer informações importantes a respeito do significado dos ritmos circadianos para animais que habitam esse ambiente peculiar. No entanto, são raros os estudos com roedores subterrâneos de outras famílias que não Bathyergidae e Spalacidae. Dentre as espécies sul-americanas, o coruro (*Spalacopus cyanus*, Octondotidae) teve seu ritmo de atividade locomotora estudado em laboratório, onde foi classificado como marcadamente noturno (Begall et al., 2002), embora seja diurno em campo (Rezende et al., 2003; Urrejola et al., 2005) .

A espécie de tuco-tuco investigada no presente trabalho também teve seu ritmo de atividade locomotora caracterizado em laboratório. Notavelmente, os padrões desse ritmo em *Ctenomys* aff. *knighti* apresentam pouca variabilidade interindividual, tanto em escuro constante quanto sob ciclo de CE. Em condições constantes, todos os indivíduos exibem um ritmo com período diferente de 24 horas. Quando são expostos ao ciclo de CE, há arrastamento e, em todos os indivíduos, a atividade se concentra nas horas de escuro (Valentinuzzi et al., 2009). Neste trabalho, pretendemos relacionar diversos aspectos do ritmo de Tc paralelamente com o ritmo de atividade locomotora.

CAPÍTULO 4 - CARACTERIZAÇÃO DO RITMO CIRCADIANO DE TC EM TUCO-TUCOS

4.1. Resumo

O primeiro passo na caracterização cronobiológica de um ritmo diário é a verificação de sua endogenicidade e sincronização com ciclos ambientais. Este capítulo apresenta a caracterização do ritmo diário de Tc em *Ctenomys* aff. *knighti*, demonstrando que este é circadiano e que se sincroniza com um ciclo diário de CE por arrastamento, concentrando os valores de Tc mais altos na fase de escuro. Será discutido, também, o notável fato dos tuco-tucos apresentarem muito menos variabilidade interindividual de padrões rítmicos em comparação a outros roedores subterrâneos.

4.2. Introdução

Embora a maior parte dos estudos sobre ritmos circadianos seja realizada em organismos modelo (no caso de mamíferos, estes são os roedores de laboratório, como ratos, camundongos e hamsters), a investigação de ritmos circadianos em espécies selvagens traz informações valiosas para a área, ajudando a entender qual é o significado e as vantagens adaptativas dos ritmos para espécies com diferentes hábitos de vida. Para cada nova espécie estudada, é importante realizar, em primeiro lugar, a caracterização dos padrões do ritmo de interesse, tanto em condições constantes quanto na presença de ciclos ambientais, seguindo protocolos considerados clássicos na cronobiologia. A caracterização cronobiológica em si já pode trazer resultados interessantes. Observar a persistência de um ritmo biológico na ausência de pistas temporais, evidenciando a existência de um oscilador endógeno, não é, de forma alguma, trivial, do ponto de vista experimental.

4.2.1. Protocolos experimentais para a caracterização cronobiológica.

Um protocolo experimental clássico para a caracterização de um ritmo está esquematizado nas figuras 4.1C e 4.1D e exige a representação do ritmo na forma de actogramas, conforme explicado no capítulo 2. O protocolo é constituído por três etapas

obrigatórias: primeiramente, o organismo é mantido em condições absolutamente constantes. Essa etapa é importante para que seja verificada a endogenicidade do ritmo, que é comprovada caso seja observada expressão rítmica com período diferente de 24 horas. A segunda etapa do protocolo tem o objetivo de testar a sincronização desse ritmo com um determinado ciclo ambiental. Para isso, é introduzida variação diária de apenas uma variável ambiental escolhida, enquanto as outras são mantidas constantes. Se a sincronização ocorrer, espera-se que o ritmo passe a se expressar com o mesmo período do ciclo ambiental e que a relação de fase entre o ritmo e o ciclo ambiental seja estável.

Essa evidência isolada, no entanto, não é suficiente para distinguir a sincronização por arrastamento (Fig. 4.1A) da sincronização por mascaramento (Fig. 4.1B). Por esse motivo, é preciso realizar a terceira etapa do protocolo, na qual o organismo retorna à condição constante, de forma a restaurar a expressão do ritmo em livre-curso. Caso a fase inicial do ritmo em livre-curso seja aquela determinada pela condição anterior de sincronização, temos evidência de que o oscilador estava no mesmo passo do ciclo ambiental e consideramos que houve arrastamento (Fig. 4.1C). Por outro lado, se a fase for aquela que se esperaria caso o ciclo nunca tivesse sido introduzido (projetada pela linha tracejada vermelha, Fig.4.1D), temos indício de que houve mascaramento e, apesar da expressão do ritmo ter sido modulada (de forma "reativa"), o oscilador circadiano continuou ciclando no seu próprio passo. Como o ciclo testado não afetou o oscilador, as reações cíclicas do organismo cessam assim que o ciclo é retirado (Fig. 4.1D) (Aschoff, 1960).

4.3. Objetivo

O experimento descrito neste capítulo teve como objetivo a caracterização dos padrões rítmicos da Tc em tuco-tucos mantidos em laboratório. Aplicando o protocolo descrito anteriormente, investigamos a persistência do ritmo de Tc em animais mantidos em condições constantes e verificamos se esse ritmo é sincronizável pelo ciclo de CE por arrastamento. Os padrões do ritmo de Tc também foram comparados aos do ritmo de atividade locomotora.

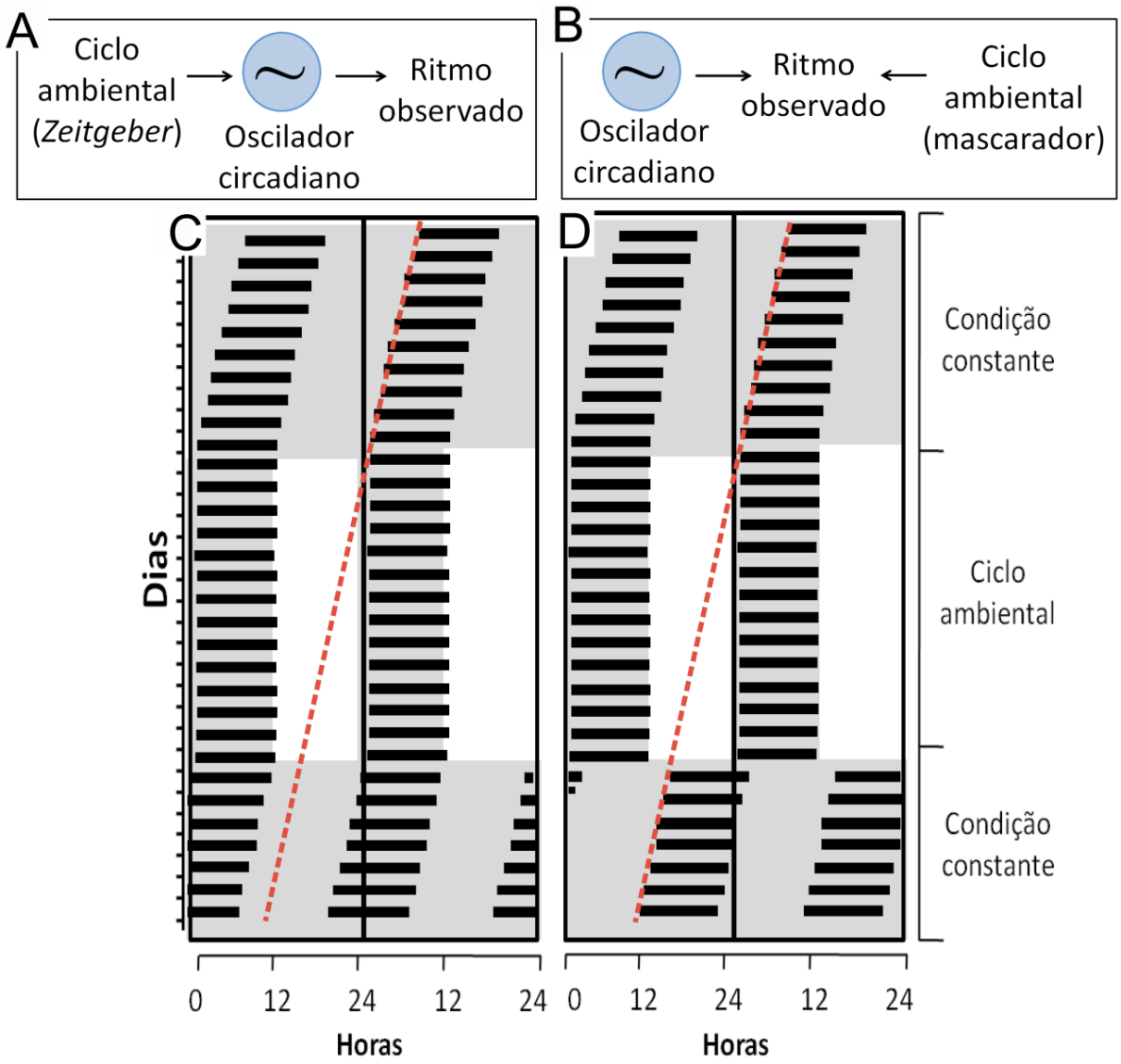

Figura 4.1. Diferenças entre arrastamento e mascaramento. **A** – No arrastamento, o ciclo ambiental (*Zeitgeber*) ajusta o oscilador circadiano, que passa a oscilar com o mesmo período do ciclo, assim como o ritmo gerado por ele. **B** – No mascaramento, o ciclo ambiental modula diretamente a expressão do ritmo observado, sem alterar o período do oscilador. **C** e **D** – Representações gráficas do protocolo descrito no texto e resultados hipotéticos na forma de actograma duplo (em escala de 48h). Nesses actogramas hipotéticos, cada linha representa um dia e as barras pretas indicam os momentos de atividade locomotora de um animal. Supondo que estamos testando se o ciclo claro/escuro é um *Zeitgeber* para o organismo hipotético da figura, o fundo cinza do gráfico indica escuro e o branco indica claro. Inicialmente a iluminação é mantida constante e em seguida são introduzidas as variações cíclicas da iluminação, que estão sendo testadas. Ao final, a escuridão constante é retomada. Em ambos os gráficos o período do ritmo em livre-curso (em condições constantes) é menor do que 24 horas e quando o ciclo de claro/escuro é introduzido, há sincronização do ritmo, com a atividade ocorrendo na fase de escuro. **C** – Quando a condição constante é reestabelecida, a fase de atividade continua sendo aquela determinada na presença do ciclo ambiental, e não aquele que se esperaria caso o oscilador continuasse oscilando com seu período endógeno (a fase esperada nesse caso está projetada pela linha tracejada), indicando que houve arrastamento. **D** – Após o retorno às condições constantes, a fase do ritmo em livre-curso mudou abruptamente para aquela esperada caso o período do oscilador não tivesse sido alterado (linha tracejada), indicando que houve mascaramento.

4.4. Métodos

Seis tuco-tucos (#45, #46 e #52, 69, #97 e #98) foram mantidos, inicialmente, em EE, por 25 (#69), 39 (#97), 44 (#45, #46, #52) ou 60 (#98) dias. Em seguida, foram submetidos a um regime de CE 12:12 (início da fase de claro às 07:00) por 14 (#45, #46 e #52), 23 (#69), 30 (#98) ou 41 (#97) dias. Após essa etapa, a condição de EE foi restabelecida por mais 16 (#45, #46 e #52), 15 (#69) ou 21 (#97 e #98) dias. Valores de τ foram medidos através dos dados obtidos durante os dias correspondentes à primeira etapa em EE, indicados acima.

Durante todo o experimento, todos os animais tiveram acesso à roda de atividade e foram tomados, simultaneamente, registros da Tc, da atividade locomotora geral, medida pelo sensor intraperitoneal e da atividade em roda, medida pela contagem das revoluções.

4.5. Resultados

4.5.1. Condições constantes

A inspeção visual dos actogramas (intervalo superior indicado por EE nas Fig. 4.2 e 4.3) revelou que a Tc, em todos os tuco-tucos estudados, é rítmica em condições constantes,

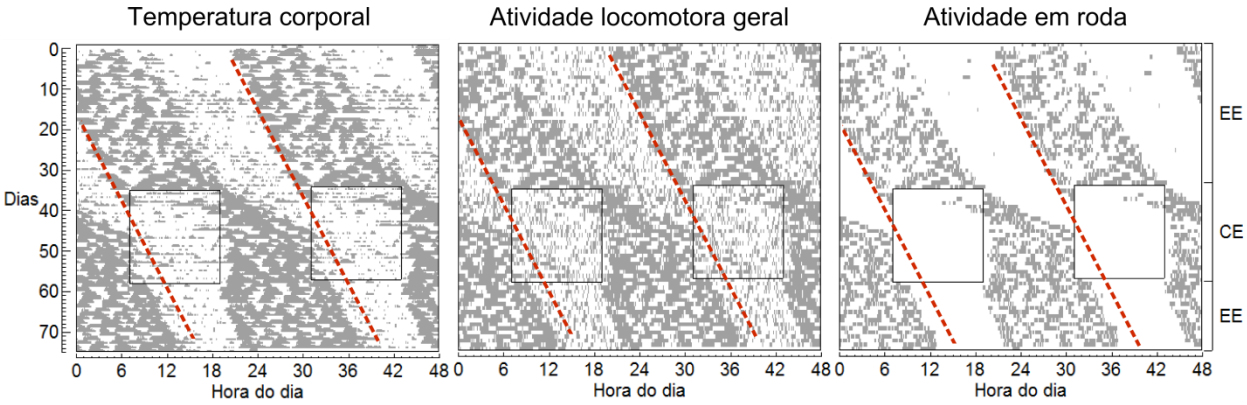

Figura 4.2. Actogramas em duplicata do animal #69, enfatizando a fase do ritmo circadiano ditado pelo oscilador em condições de livre-curso, antes da sincronização com o ciclo CE. A linha tracejada vermelha indica a fase do ritmo em livre-curso, durante a primeira etapa em EE e sua projeção até o final das três etapas do protocolo. Barras cinzas indicam os momentos em que a Tc ultrapassou os limiares pré-estabelecidos para cada animal (esquerda), a atividade geral ultrapassou 50 contagens em 5 minutos (meio) ou os momentos em que foram detectadas revoluções da roda de atividade (direita). Os retângulos indicam a fase de claro durante o ciclo de CE. A sincronização por arrastamento fica evidenciada pela fase do ritmo na segunda etapa EE, após CE, não coincidir com a projeção da fase do oscilador em livre-curso (linha tracejada vermelha) antes da sincronização por CE, conforme explicado na Fig.4.1.c.

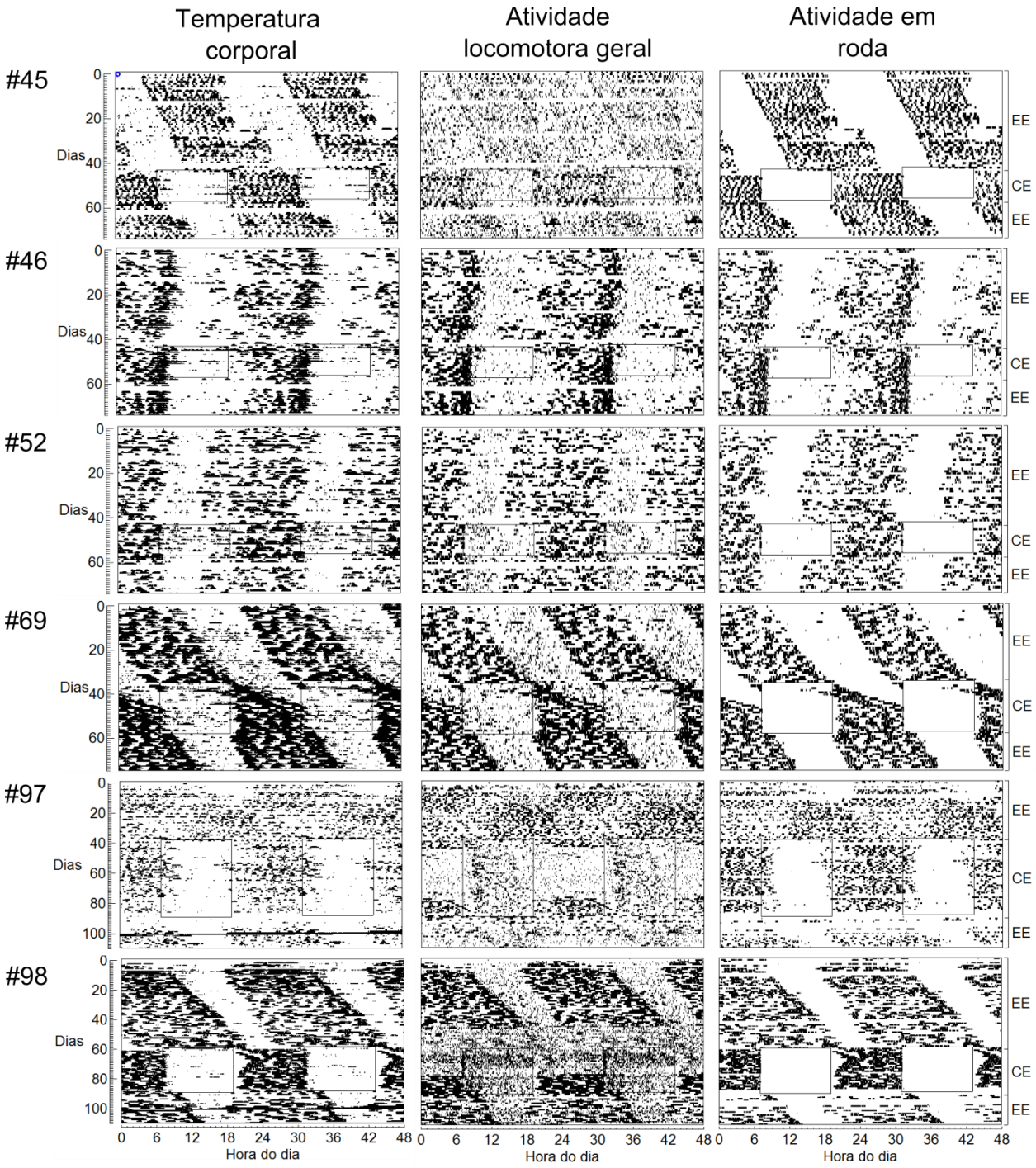

Figura 4.3. Actogramas em duplicata da Tc (esquerda), atividade locomotora geral (meio) e atividade em roda (direita) em todos os animais. Barras pretas indicam os momentos em que a Tc ultrapassou os limiares pré-estabelecidos para cada animal (esquerda) (#45: 36,4 ^{o}C; #46: 36,2 ^{o}C; #52: 37 ^{o}C; #69: 36^{o}C ; #97: 36,6 ^{o}C; #98: 36,2^{o}C) a atividade geral ultrapassou 50 contagens em 5 minutos (meio) ou os momentos em que foram detectadas revoluções da roda de atividade (direita). Os retângulos indicam a fase de claro durante o ciclo de CE.

assim como os ritmos de atividade locomotora. A aplicação do teste estatístico Periodograma Qui-quadrado comprovou a existência do ritmo circadiano de Tc em condições constantes, e acusou os valores de τ estatisticamente significativos nestas condições, que variaram entre 23,53 e 24,4 horas (Tabela 4.1).

4.5.2. Sincronização com o ciclo de CE

Quando os tuco-tucos foram expostos ao ciclo de CE 12:12, todos os ritmos foram sincronizados, após alguns dias de transientes (Fig. 4.2 e 4.3). Os valores mais altos de Tc e de atividade locomotora se concentraram na fase de escuro. Em quatro animais (#45, #52, #69, #98), a atividade em roda ocorreu durante toda a fase de escuro e não aconteceu durante a fase de claro. A Tc desses animais, no entanto, exibiu alguns episódios de elevação enquanto as luzes estavam acesas. Dois animais apresentaram parte de sua atividade em roda também durante alguns momentos do dia. Em um deles (#46), o término da atividade ocorreu quando as luzes já estavam acesas. No outro (#97), o início e o término da atividade em roda aconteceram durante a fase de claro.

Após o restabelecimento do EE, a fase do ritmo em livre-curso foi aquela determinada pelo ciclo de CE ao qual os tuco-tucos estavam previamente expostos pois não coincidiu com a linha tracejada vermelha (indicado explicitamente na Fig.4.2). Este fato comprova que a sincronização verificada durante a etapa em CE ocorreu por arrastamento do oscilador circadiano. Este mesmo resultado se aplica a todos os casos estudados, apresentados na Fig.4.3.

4.5.3. Relação entre os ritmos de Tc e de atividade locomotora

O ritmo de Tc mostrou-se fortemente associado, no tempo, aos ritmos de atividade locomotora geral e em roda, com período idêntico e relação de fase estável entre os ritmos (Fig. 4.2). Em todas as condições e em todos animais, o ritmo de Tc seguiu o mesmo padrão do ritmo de atividade em roda e atividade locomotora geral. A relação de fase entre os ritmos de Tc e de atividade em roda, em CE, variou entre -115 e 32 minutos (Tabela 4.1 e Fig. 4.4).

Tabela 4.1. Valores de τ do ritmo de Tc e sua relação de fase com o ritmo de atividade em roda (relação de fase = *onset* Tc - *onset* atividade em roda) nos seis tuco-tucos. Os valores de τ foram avaliados durante os dias correspondentes à primeira etapa em EE, em cada indivíduo e as relações de fase calculadas durante o CE.

	#45	**#46**	**#52**	**#69**	**#97**	**#98**
τ	24,2 h	23,8 h	24,4 h	24,2h	23,53h	24,22h
Relação de fase	32 min	-35 min	10 min	-115 min	30 min	5 min

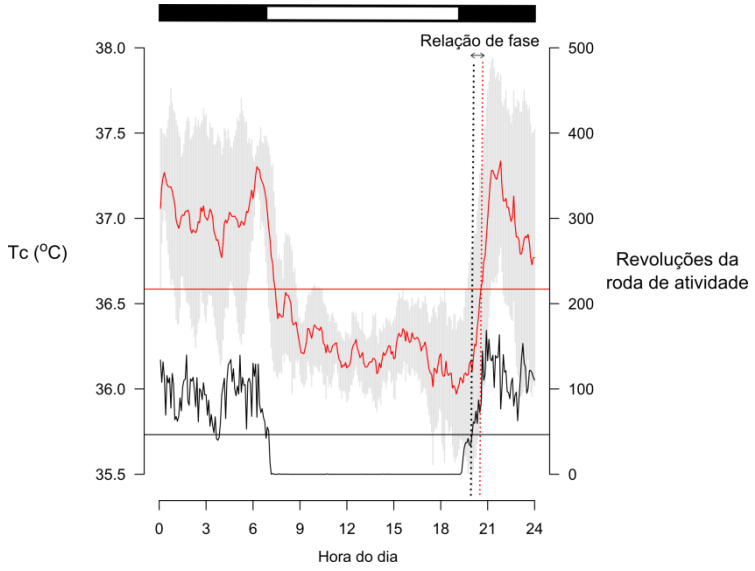

Figura 4.4. Plexograma representativo de um tuco-tuco (#98) em CE, indicando a relação de fase entre os ritmos de Tc (vermelho) e o de atividade em roda (preto). Cada ponto representa os valores médios calculados ao longo de 10 dias para o horário correspondente do dia. Linhas horizontais indicam as médias totais de cada variável. As linhas verticais representam os desvios padrões da Tc, calculados em cada fase do dia. A barra superior indica as fases de claro (branco) e escuro (preto) do ciclo CE. As linhas pontilhadas marcam o *onset* de cada ritmo. A diferença entre esses onsets é tomada como a relação de fase entre os ritmos.

4.6. Discussão

A expressão rítmica da Tc em EE, com período diferente de 24 horas, confirmou a natureza endógena desse ritmo, em tuco-tucos. O ritmo de Tc sincronizou-se com o ciclo CE ao qual os animais foram expostos, sendo que os valores mais elevados de Tc concentraram-se nas horas de escuro. O fato da fase do ritmo em livre-curso, após o restabelecimento do EE, ser aquela determinada pelo ritmo sincronizado ao ciclo de CE evidenciou que a sincronização ocorreu por arrastamento do oscilador circadiano e não apenas por uma reação fisiológica direta à presença/ausência de luz. Essas observações revelam que o ritmo de Tc de *Ctenomys* aff. *knighti* apresenta pelo menos duas das propriedades fundamentais dos ritmos

circadianos: são endógenos e sincronizam-se com ciclos ambientais, por arrastamento. Há evidências de que o ritmo de Tc, em tuco-tucos também exibe a terceira propriedade, da compensação de τ a variações de temperatura. Isso será discutido no Apêndice 2. Nesse sentido, podemos concluir, através destes experimentos, que os tuco-tucos apresentam, comprovadamente, um ritmo circadiano de Tc.

Todos os indivíduos estudados apresentaram padrões rítmicos uniformes, tipicamente apresentados por roedores noturnos, com Tc altas e atividade locomotora durante a fase de escuro do ciclo CE. Esses resultados reforçam a constatação de que os ritmos circadianos dos tuco-tucos apresentam muito menos variabilidade interindividual comparado às espécies de ratos-toupeiras previamente estudadas (Capítulo 3; Valentinuzzi et al., 2009). Dessa forma, podemos dizer que, assim como em relação a alguns aspectos morfológicos e anatômicos (Capítulo 1), a organização temporal dos tuco-tucos se assemelha mais àquela de roedores de superfície do que a de outros roedores subterrâneos estudados.

Essa semelhança com roedores de superfícies pode estar relacionada com o grau de exposição aos ciclos ambientais externos. Ratos-toupeiras africanos e asiáticos emergem muito raramente à superfície, realizando praticamente todas suas atividades, incluindo forrageamento, abaixo da terra (Buffenstein, 2000). Por outro lado, os membros do gênero *Ctenomys* passam mais tempo fora de seus túneis. Isso foi, inicialmente, sugerido por evidências indiretas, que mostravam que estes animais eram predados com frequência por corujas (Vassalo et al., 1994). Além disso, os tuco-tucos alimentam-se de partes aéreas de plantas, dessa forma exigindo saídas frequentes à superfície (Comparatore et al., 1995; Rosi et al., 2003). Observações contínuas de *Ctenomys* aff. *knighti* em uma arena experimental, realizadas por nosso grupo, revelaram que esses animais saem à superfície praticamente todos os dias, ainda que em breves episódios que duram, no máximo, 90 minutos (Tomotani et al., no prelo). Esse grau de exposição aos ciclos externos pode ter sido uma pressão seletiva para a manutenção de ritmos circadianos precisamente sincronizáveis.

Os ritmos de Tc e de atividade locomotora mostraram-se fortemente associados. De forma geral, os valores mais altos de Tc ocorreram nos momentos em que o animal estava mais ativo. Esse padrão é semelhante ao relatado para a maioria das espécies estudadas de animais homeotérmicos (Refinetti e Menaker, 1992a). A principal evidência da existência independente dos ritmos circadianos de Tc e de atividade locomotora em animais não-humanos é o fato de, em muitos casos, a elevação da Tc ocorrer antes do início da atividade locomotora (Refinetti e Menaker, 1992a). No entanto, nossos resultados mostram que apenas

dois tuco-tucos apresentam aumento da Tc antecipado ao início da atividade (Tabela 4.1). A falta de antecipação da Tc em relação ao ritmo de atividade locomotora também foi observada em ratos de laboratório, em um estudo no qual o autor questionava se essa antecipação, descrita em outros estudos, não seria, na verdade, um artefato causado pelo método de determinação da fase do ritmo de Tc (Refinetti, 1997).

Uma vez que a elevação da Tc ocorre, de forma geral, concomitantemente à atividade locomotora, questionamos se a variação diária dos valores de Tc observada nos tuco-tucos não poderia ser, ao menos em parte, uma mera consequência dos efeitos agudos do exercício realizado pelo animal. Esse questionamento nos levou a explorar esse assunto mais profundamente, conforme descrito nos próximos capítulos.

CAPÍTULO 5 – MODULAÇÃO DO RITMO DE TC PELA ATIVIDADE EM RODA E OUTROS ASPECTOS COMPORTAMENTAIS

5.1. Resumo

Fatores endógenos e exógenos ao animal podem modificar a amplitude dos ritmos circadianos. Quando essa modificação ocorre diretamente, sem o envolvimento do oscilador, dizemos que houve modulação do ritmo. O ritmo circadiano de Tc é modulado por diversos fatores ambientais, fisiológicos e comportamentais. Neste capítulo estudamos a modulação desse ritmo pelo acesso dos animais à roda de atividade. Observamos que mesmo quando a roda de atividade é retirada da gaiola, o ritmo de Tc persiste, sem mudanças no τ, na fase e na sincronização com o ciclo de CE. Ao contrário do que já foi relatado para outros roedores, no entanto, a amplitude do ritmo de Tc em tuco-tucos também é pouco afetada pela retirada da roda. Uma análise comportamental dos animais revelou que mesmo na ausência da roda de atividade os animais exibem comportamentos que podem causar aumentos agudos de Tc. Esse fato pode explicar, ao menos em parte, a razão da amplitude não se modificar com a remoção da roda.

5.2. Introdução

5.2.1. Modulação do ritmo circadiano de Tc

Como verificamos no capítulo 4, a ritmicidade diária de Tc é gerada endogenamente pelo oscilador circadiano, que exerce controle temporal de mecanismos termorregulatórios. O controle exercido pelo oscilador circadiano define o período e a fase do ritmo de Tc. Devemos considerar, porém, uma terceira propriedade em um ritmo, a amplitude, a qual é suscetível a modulações por diversos fatores fisiológicos, comportamentais ou ambientais. Dessa forma, a amplitude do ritmo de Tc apresenta grande variabilidade inter e intra-específica e até intraindividual.

Dentre os fatores que podem explicar a variabilidade interespecífica está a relação entre a amplitude do ritmo de Tc e a massa corpórea. A amplitude tende a ser maior em animais de menor massa corpórea e vice-versa (Aschoff, 1982). Diferenças entre as amplitudes de espécies selvagens e de laboratório também foram relatadas, sendo que

espécies selvagens apresentam, de forma geral, amplitudes maiores (DeCoursey et al., 1998). Alguns estudos também sugerem que a amplitude do ritmo de Tc possa estar relacionada ao habitat natural dos animais, diferindo, por exemplo, entre animais que vivem em ambientes xéricos e mésicos (Lovegrove e Heldmaier, 1994; Refinetti, 1999).

Mudanças nas condições ambientais nas quais os animais se encontram também podem modificar a amplitude do ritmo de Tc. Por exemplo, há demonstrações de que a amplitude varia de acordo com a Ta (Aschoff e Heise, 1972; Geiser, 2004) e com a disponibilidade de alimentos (MacMillen e Trost, 1967). Outro fator que pode modular o ritmo de Tc é a privação de água. Em camelos privados de água, por exemplo, a amplitude do ritmo é cerca de 3^{o}C mais alta do que quando os animais têm acesso ilimitado a uma fonte hídrica (Schmidt-Nielsen et al., 1956).

Alguns eventos fisiológicos e comportamentais causam efeitos agudos nos valores da Tc. Quando esses eventos ocorrem periodicamente, acabam também modificando a amplitude do ritmo circadiano da Tc. Sabe-se, por exemplo, que o sono de ondas lentas acompanha uma redução da Tc (Aschoff, 1983; Mrosovsky, 1990). A alimentação é outro fator que pode modificar os valores de Tc, sendo observada a elevação da temperatura antes, durante e após as refeições (de Vries et al., 1993). Provavelmente o mais conhecido dentre os fatores que causam efeitos agudos na Tc seja a atividade física. Durante o exercício, o calor decorrente da atividade muscular aumenta em grandes proporções. Isso levaria a um aumento aditivo da Tc sobre o valor defendido endogenamente e sob controle do oscilador circadiano (Mrosovsky, 1990).

5.2.2. É possível medir apenas o componente do ritmo circadiano de Tc controlado pelo oscilador?

Diante de todos os fatores descritos no item anterior, os investigadores do ritmo de Tc enfrentam desafios quando querem estudar apenas o componente do ritmo que é controlado endogenamente pelo oscilador circadiano, filtrando-se os efeitos da modulação, tratados na seção anterior. Por esse motivo, é importante, nesses estudos, padronizar condições como a Ta e a quantidade de alimentos e de água. Enquanto essas variáveis são facilmente manipuladas pelo experimentador, controlar os fatores comportamentais e fisiológicos que causam alterações diretas na Tc é muito mais complicado.

O controle dessas variáveis é possível somente quando é utilizado um protocolo conhecido como rotina constante (Minors e Waterhouse, 1984). Nesse protocolo, o indivíduo permanece desperto e em repouso absoluto durante todo o experimento. O procedimento pode ser realizado com o indivíduo em jejum ou a alimentação pode ser oferecida de forma praticamente constante. Espera-se que, nessas condições, todas as variações de Tc registradas ao longo do dia sejam devidas ao controle endógeno, exercido pelo oscilador circadiano. Embora essa metodologia tenha sido aplicada com sucesso em humanos, utilizá-la em animais não é simples. A razão desta dificuldade está nos desafios de se privar o animal de sono, deixá-lo em jejum ou forçá-lo a comer constantemente, além de realizar contenção física ou química para impedir a atividade locomotora (Cabanac e Briese, 1992; DeCoursey, 1998; Mrosovsky, 1990).

Identificar todos os efeitos do sono e da alimentação na amplitude do ritmo de Tc torna-se uma tarefa praticamente impossível, mas os efeitos do exercício podem ser ao menos estimados utilizando-se abordagens nas quais a atividade locomotora é limitada, mas não impedida. Em alguns estudos isso foi alcançado colocando-se um indivíduo em um compartimento pequeno o suficiente para que o animal não pudesse se deslocar (DeCoursey, 1998) ou então retirando-se a roda de atividade da gaiola (Golombek et al., 1993; Refinetti e Menaker, 1992b). Como os tuco-tucos correm vigorosamente na roda de atividade (observações pessoais), acreditamos, inicialmente, que essa seria a principal forma de exercício para eles. Dessa maneira, escolhemos, em um primeiro momento, comparar os ritmos de Tc na presença e na ausência da roda de atividade, na tentativa de estudar seus efeitos na modulação no ritmo de Tc.

5.2.3. A atividade em roda

A corrida na roda de atividade é um fenômeno amplamente observado em roedores mantidos em cativeiro (Sherwin, 1998). Embora não haja um consenso sobre as suas motivações, há evidências de que esse comportamento envolve o sistema de recompensa e acredita-se que essa atividade possa estar relacionada ao balanço energético e à diminuição dos níveis de estresse (Eberli, 2011; Sherwin, 1998).

Estudos envolvendo rodas de atividade são abundantes na cronobiologia. Como suas revoluções podem ser facilmente registradas, a corrida em roda é a variável escolhida em grande parte dos estudos sobre ritmos de atividade locomotora. Além disso, diversos trabalhos têm como foco estudar a influência da presença da roda nos parâmetros rítmicos.

Por exemplo, descobriu-se que o oferecimento diário de uma nova roda, sempre no mesmo horário, sincroniza os ritmos circadianos, mesmo quando todas as outras variáveis ambientais são mantidas constantes (Reebs e Mrosovsky, 1989). Outros trabalhos apontam que em alguns animais, como no roedor sul-americano *Octodon degus* (Octodontidea), a roda pode induzir mudanças dramáticas na fase do dia em que a atividade ocorre, convertendo indivíduos diurnos em noturnos (Kas e Edgar, 1999). Já em ratos silvestres (*Microtus arvalis,* Cricetidae), observou-se que a retirada da roda pode levar ao desaparecimento de alguns ritmos circadianos (Van der Veen et al., 2006).

Alguns estudos também investigaram o efeito da retirada da roda na amplitude do ritmo circadiano de Tc. Em hamsters, observou-se que a amplitude é cerca de 40% menor quando os animais são impedidos de correr na roda (Golombek et al., 1993; Refinetti e Menaker, 1992b). No entanto, para entender como essa modulação ocorre é necessário investigar os padrões comportamentais nas duas condições, uma vez que os animais apresentam, além da atividade em roda, outros tipos de comportamentos que também poderiam ser considerados exercícios intensos (DeCoursey et al., 1998).

5.3. Objetivos

Os experimentos descritos a seguir tiveram como objetivo estudar a modulação do ritmo circadiano de Tc pela atividade em roda. Para isso, estabelecemos três objetivos específicos:

1) Investigar se a ausência da roda causa mudanças nos padrões rítmicos da Tc caracterizados no capítulo 4 (Parte 1);
2) Avaliar se a presença da roda de atividade influencia o estresse dos animais mantidos em cativeiro (Parte 2);
3) Estudar as diferenças nos padrões comportamentais quando os animais têm ou não acesso à roda de atividade e relacioná-las à modulação do ritmo de Tc (Parte 3).

5.4. Métodos

5.4.1. Parte 1 – Modulação dos parâmetros rítmicos

Imediatamente após o final do experimento descrito no capítulo 4, quando os animais ainda estavam em EE, as rodas de atividade foram retiradas da gaiola e os tuco-tucos foram

submetidos à mesma série de condições de iluminação: 1) EE por 28 (#45, #46 e #52) ou 31 dias (#69, #97 e #98); 2) CE por 21 (#97 e #98), 28 (#69), 30 (#45) ou 41 (#46 e #52) dias; 3) EE por 15 dias.

Após a remoção da roda, a única medida de atividade locomotora passou a ser aquela medida pelo transmissor intraperitoneal. Esse transmissor registra atividade sempre que movimentos do animal causam mudanças no seu ângulo relativo à antena da placa receptora.

A comparação dos dados foi realizada através da construção de actogramas e plexogramas, conforme explicado no capítulo 2. Além dos parâmetros rítmicos analisados no capítulo 4, foram caracterizados os valores máximos, mínimos e médios da Tc, bem como a amplitude do ritmo. A quantidade de atividade locomotora geral por dia também foi quantificada.

5.4.2. Parte 2 – Avaliação dos níveis de estresse após a retirada da roda

Níveis altos de estresse podem induzir o aumento da Tc (Cabanac e Briese, 1992). Estudos em hamsters (*Mesocricetus auratus*, Cricetidae) sugerem que em animais acondicionados em gaiolas com roda de atividade esse aumento da Tc pode ser menor do que em animais sem acesso a roda, presumivelmente porque o acesso à roda de atividade pode diminuir o estresse desses roedores (Eberli, 2011). Dessa forma, como as nossas comparações poderiam ser influenciadas pelos níveis de estresse dos animais, buscamos avaliar se os tuco-tucos também ficam mais estressados quando não têm acesso à roda. O marcador fisiológico mais comum em avaliações de estresse são os níveis de corticosteróides (Khansari, 1990). No entanto, limitações metodológicas não permitiram que realizássemos essas medições. Por esse motivo, testamos uma forma alternativa de estimar o estresse dos animais, através de um marcador comportamental. Essa ideia partiu da observação de que os tuco-tucos aparentavam roer objetos com mais frequência quando submetidos a situações de estresse (observações pessoais), além de já ter sido relatado que esse comportamento é exibido por roedores em situações de estresse (Ayada et al., 2002). Oferecemos, então, pequenos pedaços de madeira para que os tuco-tucos (#46, #52, #97, #98, #100, #101, #102 e #106) pudessem roê-los, de forma controlada. Inicialmente, cada pedaço de madeira foi oferecido, por oito dias, a animais com acesso à roda de atividade. Em seguida, a roda foi retirada, e os pedaços de madeira, após serem pesados em uma balança de precisão, foram recolocados nas gaiolas, por mais oito dias. Ao fim do experimento, todos os pedaços de madeira foram novamente pesados. A diferença de peso de cada pedaço entre as pesagens foi utilizada como indicativo da quantidade roída pelo animal.

Durante todo o experimento, os animais foram mantidos sob regime de CE 12:12 (início da fase de claro às 07:00). A Tc e a atividade locomotora geral também foram registradas, com exceção do animal #102, cujo transmissor intraperitoneal apresentou problemas de interferência. Quatro tuco-tucos que participaram deste experimento (#100, #101, #102 e #106) foram mantidos dentro das caixas de isolamento descritas no Capítulo 2. Já os outros indivíduos, que também participaram das filmagens da Parte 3, foram mantidos em uma pequena sala, na qual a temperatura foi controlada a 22±1^{o}C e a umidade relativa variou entre 30-60%.

5.4.3. Parte 3 – Análise visual do comportamento diário de tuco-tucos na presença e na ausência da roda de atividade

A análise comportamental foi realizada através da filmagem de quatro indivíduos (#46, #52, #97 e #98), mantidos sob CE 12:12. Para que a câmera de vídeo pudesse capturar todos os animais, o experimento não foi conduzido nas caixas de isolamento, mas sim em uma pequena sala, descrita na Parte 2. Nessa sala, a intensidade luminosa na fase de claro também foi de aproximadamente 200 lux, medidos na altura da tampa da gaiola. Assim como nas caixas de isolamento, lâmpadas vermelhas foram mantidas ligadas durante todo o experimento, produzindo intensidade luminosa baixa (<5 lux). Por 18 dias, os animais tiveram acesso à roda de atividade. Em seguida, a roda foi retirada e o registro continuou por mais 11 dias. A Tc e a atividade locomotora também foram registradas, concomitantemente à filmagem. A análise dos vídeos foi realizada visualmente. Foram analisados os vídeos referentes a 24 horas contínuas em cada condição (4^{o} e 28^{o} dias após o início do experimento). Através da análise visual foram identificados e registrados sete comportamentos, categorizados da seguinte forma:

1- corrida na roda de atividade,
2- roer,
3- "escavação" (caracterizado pelo movimento das patas anteriores que remetem àquele que os animais apresentam no campo para movimentar o solo),
4- alimentação,
5- g*rooming*

6- deslocamento (caracterizado por qualquer forma de locomoção que não se enquadre nos comportamentos mencionados anteriormente),

7- inatividade (quando não se detectava visualmente atividade).

Cada comportamento era somente registrado caso fosse realizado por ao menos um minuto.

5.5. Resultados

5.5.1. Parte 1 - Modulação dos parâmetros rítmicos de Tc

Através da análise dos actogramas, constamos que o período e a fase dos ritmos de Tc e de atividade locomotora não mudaram significativamente após a retirada da roda (Fig. 5.1). Quando os animais, agora sem acesso à roda de atividade, foram expostos ao ciclo de CE, houve novamente sincronização dos ritmos, com os maiores valores de Tc ocorrendo durante a fase de escuro. Os valores médios da Tc variaram entre 0,03 e 0,2°C em relação àqueles obtidos na presença da roda, sendo que em apenas um animal (#45) houve diminuição desse valor (Tabela 5.1).

Tabela 5.1. Parâmetros dos ritmos de Tc na presença e ausência da roda de atividade. Valores de Tc (°C) médios, máximos, mínimos e a amplitude, foram calculados com base nos plexogramas construídos para os dias nos quais estavam sob o ciclo de CE.

Animal	Com roda	Sem roda	Dife-rença	Com roda	Sem roda	Dife-rença	Com roda	Sem roda	Dife-rença	Com roda	Sem roda	Dife-rença
#45	36,65	36,62	-0,03	37,41	37,89	0,48	35,97	36,32	0,35	1,44°C	0,82	-0,62
#46	36,45	36,58	0,13	37,27	37,06	-0,21	35,97	36,29	0,32	1,31°C	0,77	-0,54
#52	36,35	37,25	0,90	37,96	37,89	-0,07	36,93	36,94	0,01	1,03°C	0,95	-0,08
#69	36,61	36,81	0,20	37,54	37,71	0,17	36,02	36,31	0,29	1,52°C	1,4	-0,12
#97	36,54	36,73	0,19	36,94	37,29	0,35	36,13	36,32	0,19	0,8°C	0,96	0,16
#98	36,59	36,75	0,16	37,34	37,37	0,03	35,97	36,3	0,33	1,37°C	1,07	-0,29

Em cinco animais, a amplitude do ritmo de Tc diminuiu, mesmo que sutilmente, na ausência da roda (Tabela 5.1 e Fig. 5.2). Interessantemente, essa diminuição não ocorreu devido ao decréscimo dos valores máximos (que diminuíram em apenas dois animais), mas sim ao

aumento dos valores mínimos (que ocorreu em todos os animais). A retirada da roda de atividade resultou na diminuição da atividade locomotora geral por dia em apenas metade dos indivíduos (Fig. 5.3).

5.5.2. Parte 2 - Avaliação dos níveis de estresse após a retirada da roda

5.5.2.1. Registros de temperatura e atividade locomotora

Os registros de Tc e atividade locomotora medidos pelo transmissor intraperitoneal mostram que todos os animais apresentaram ritmos sincronizados ao ciclo de CE, exibindo padrão noturno. Com a retirada da roda, houve diminuição da amplitude do ritmo de Tc em cinco animais (#46, #52, #98, #100 e #106) e aumento em dois (#97 e #101) (Tabela 5.2 e Fig. 5.4). A quantidade de atividade locomotora geral por dia, medida pelo sensor intraperitoneal, diminuiu em todos os animais, com exceção do tuco-tuco #97 (Fig 5.5).

Para testarmos estatisticamente as diferenças nas duas condições (presença e ausência da roda), agrupamos os dados de média, máximos e amplitude da Tc, bem como os de atividade locomotora total, obtidos neste experimento com aqueles obtidos na Parte 1, totalizando 13 animais. A aplicação do teste-T de Student apontou que não houve diferença significativa em nenhum dos valores desses parâmetros, nas duas condições (Tabela 5.3). É importante notar, no entanto, que os altos valores de desvio padrão sugerem grande variabilidade interindividual. É possível que esses parâmetros sejam modulados de forma diferente em cada animal, devido a diferenças fisiológicas e comportamentais.

5.5.2.*2. Avaliação do comportamento em relação ao oferecimento da madeira*

Ao contrário do esperado, todos os tuco-tucos, com a exceção do animal #46, roeram mais os pedaços de madeira oferecidos na presença do que na ausência da roda (Fig. 5.6). Curiosamente, o peso de alguns pedaços de madeira aumentou durante o experimento.

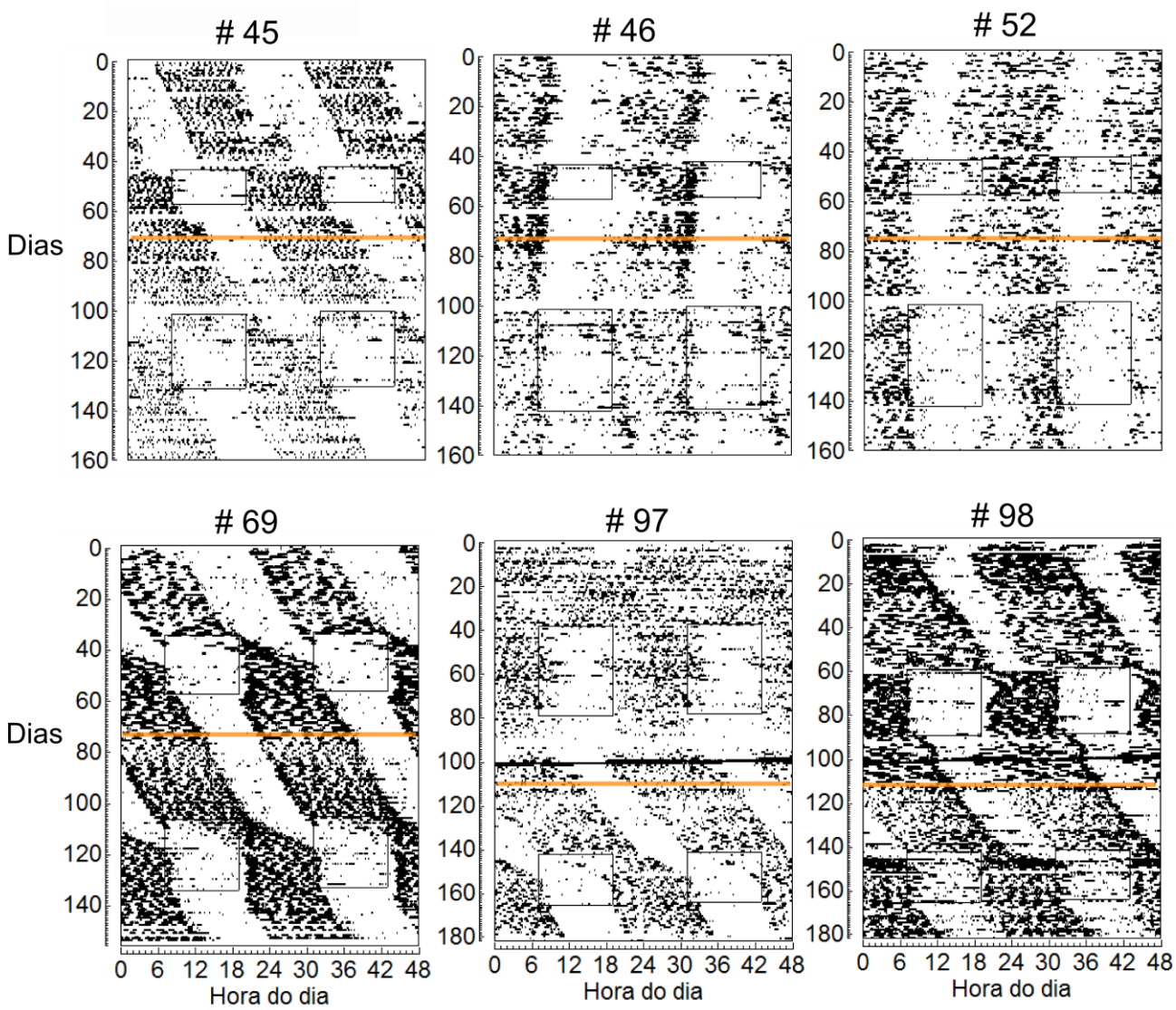

Figura 5.1. Comparação do ritmo de Tc na presença e na ausência de roda em seis tuco-tucos. Os actogramas em duplicata da Tc mostram para cada indivíduo, os dadoss obtidos no experimento do capítulo 4, seguidos da retirada da roda (indicada pela linha laranja). Os quadrados brancos indicam a fase de claro.

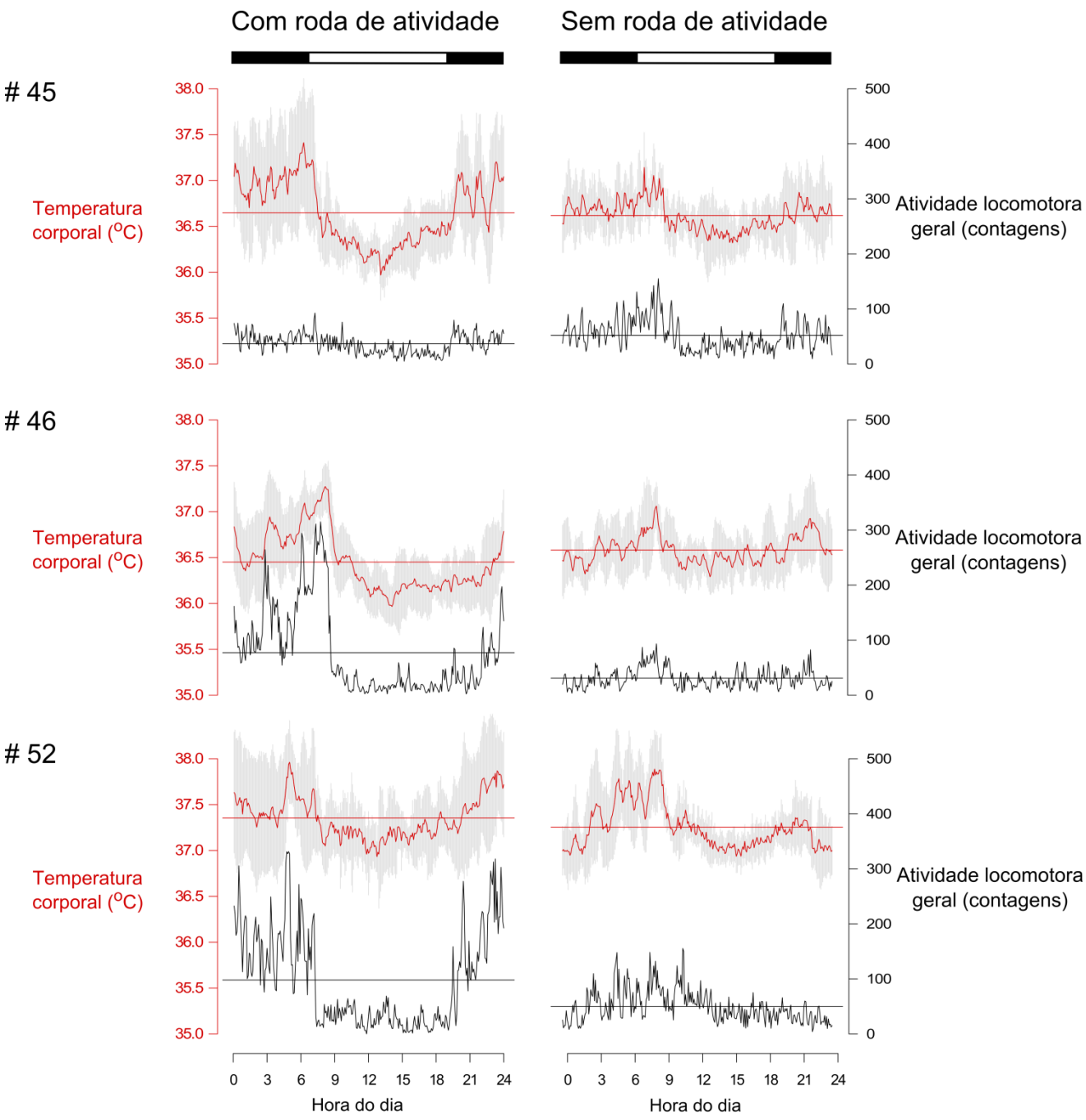

Figura 5.1. Plexogramas da Tc (vermelho) e atividade locomotora geral (preto) de seis indivíduos expostos ao ciclo de CE. Cada ponto representa os valores médios calculados ao longo de 10 dias para o horário correspondente do dia. Linhas horizontais indicam as médias totais de cada variáveis. As linhas verticais representam os desvios padrões da Tc. A barra superior indica as fases de claro (branco) e escuro (preto).

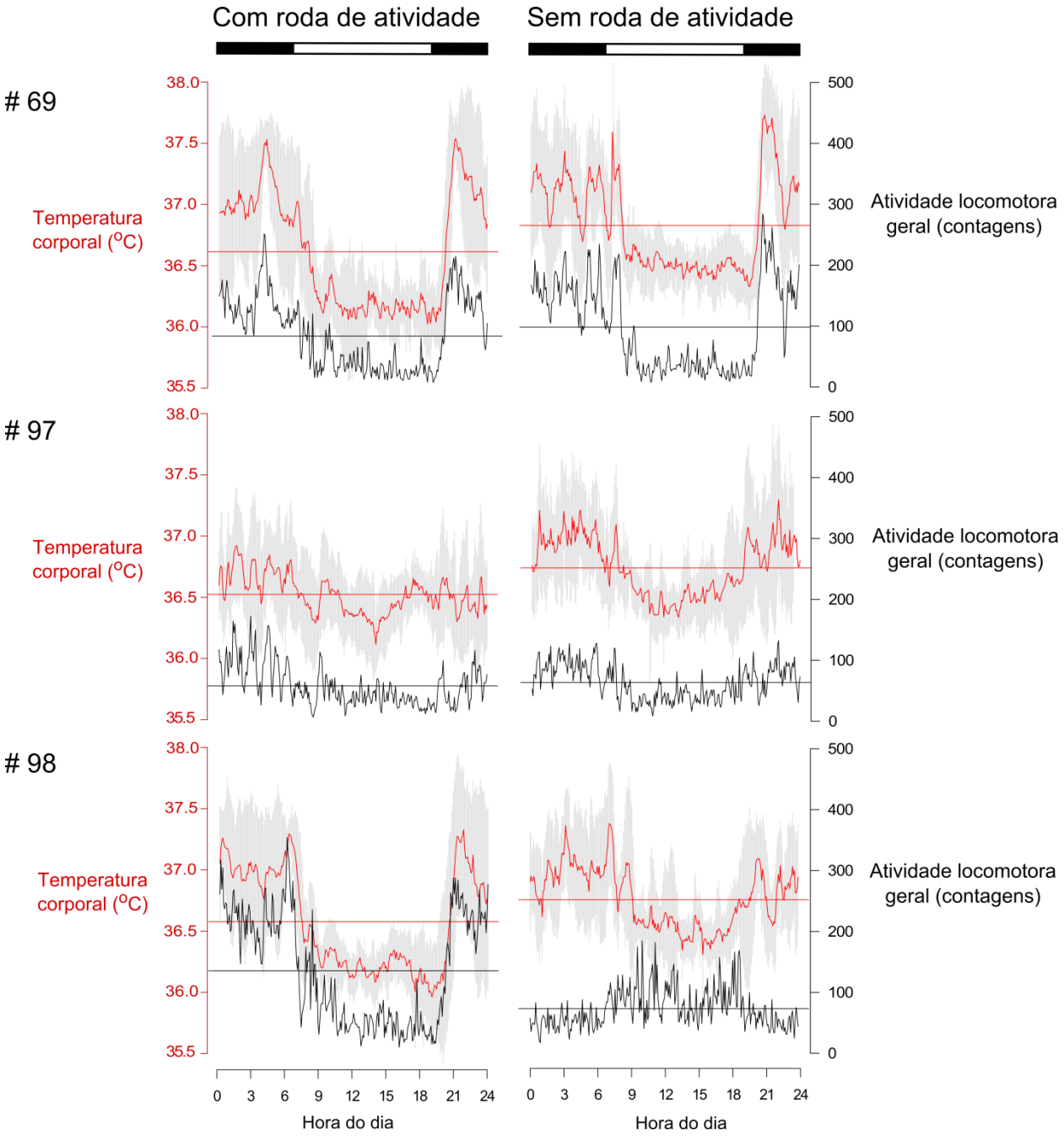

Figura 5.2 – Continuação.

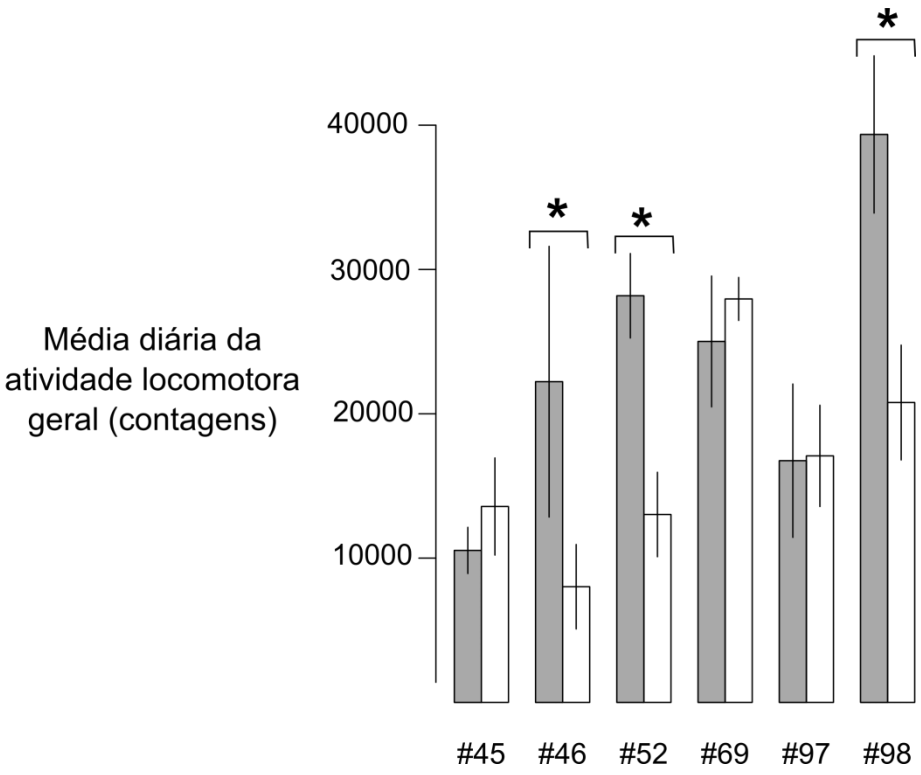

Figura 5.3. Médias diárias da atividade locomotora geral, medida pelo sensor intraperitoneal. As médias foram calculadas ao longo de 10 dias (em CE), na presença (cinza) e ausência (branco) da roda de atividade. Linhas verticais mostram os desvios padrões. Os asteriscos indicam os animais nos quais a diferença entre as duas condições foi significa, calculada pelo teste T ($p<0,05$).

Tabela 5.2. Parâmetros dos ritmos de Tc na presença e ausência da roda de atividade. Valores de Tc (^{o}C) médios, máximos, mínimos e a amplitude, foram calculados com base em plexogramas.

	Média			**Máximo**			**Mínimo**			**Amplitude**		
Animal	**Com roda**	**Sem roda**	**Dife-rença**	**Com roda**	**Sem roda**	**Dife-rença**	**Com roda**	**Sem roda**	**Dife-rença**	**Com roda**	**Sem roda**	**Dife-rença**
#46	36,43	36,41	-0,02	37,18	37,10	-0,08	35,87	36,15	0,28	1,31	0,95	-0,36
#52	36,18	36,19	0,01	37,33	37,47	0,14	35,39	35,65	0,26	1,94	1,83	-0,11
#97	36,6	36,61	0,01	36,93	37,01	0,08	36,22	36,21	-0,01	0,71	0,8	0,09
#98	36,42	36,35	-0,07	37,21	37,06	-0,15	35,6	35,85	0,25	1,61	1,21	-0,4
#100	36,93	36,69	-0,24	37,3	37,08	-0,22	36,52	36,26	-0,26	0,78	0,83	-0,04
#101	36,99	36,77	-0,22	37,49	37,29	-0,20	36,44	36,17	-0,27	1,05	1,11	0,06
#106	36,5	36,26	-0,24	37,28	36,51	-0,77	36,1	35,96	-0,14	1,17	0,55	0,62^{o}C

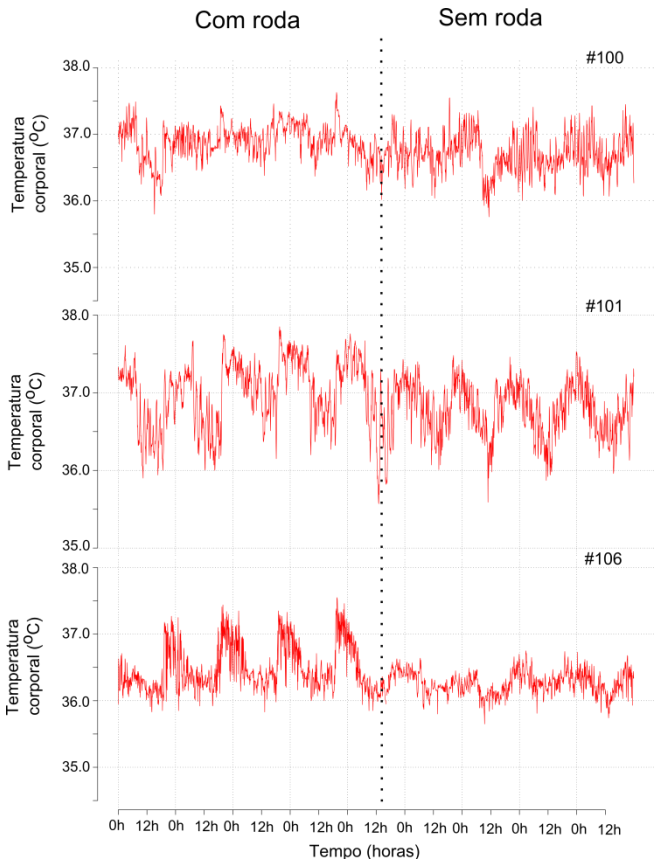

Figura 5.4, Dados brutos da serie temporal de Tc de três animais sob ciclo de CE, ao longo de nove dias. Inicialmente esses animais tinham acesso à roda de atividade, que foi retirada no momento indicado pela linha pontilhada.

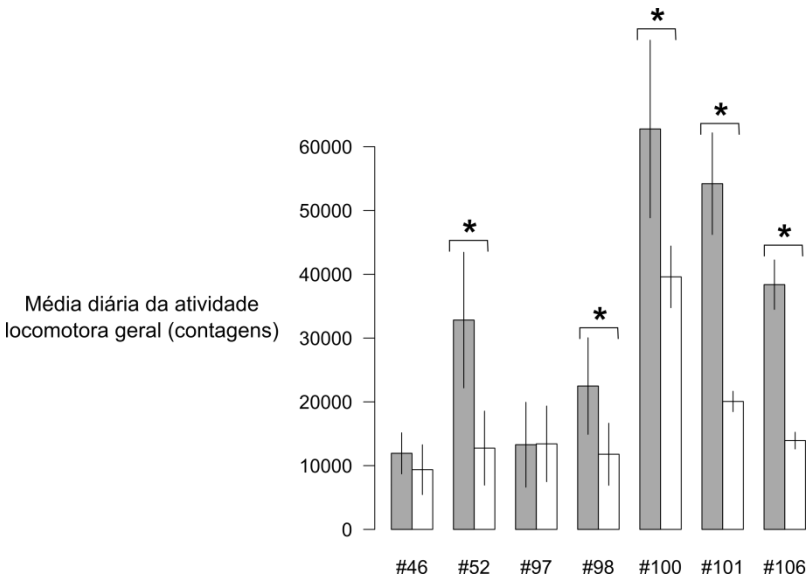

Figura 5.5. Médias diárias da atividade locomotora geral, medida pelo sensor intraperitoneal. As médias foram calculadas ao longo de 10 dias, na presença (cinza) e ausência (branco) da roda de atividade. Linhas verticais mostram os desvios padrões. Os asteriscos indicam os animais nos quais a diferença entre as duas condições foi significa, calculada pelo teste T ($p<0,05$).

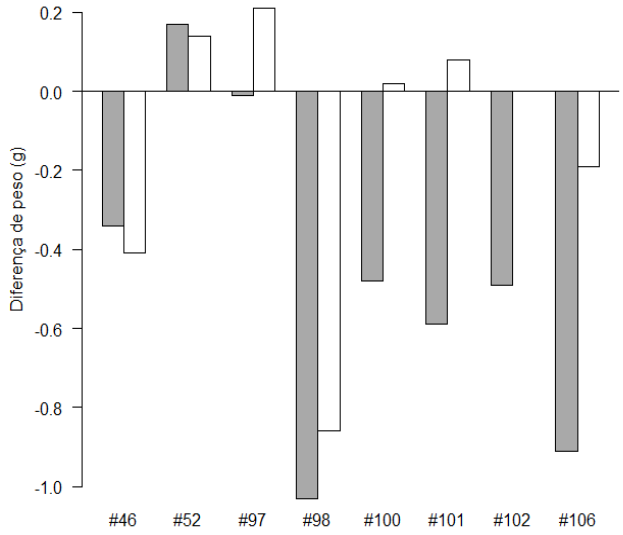

Figura 5.6. Variação nos pesos dos pedaços de madeira oferecidos a sete animais em duas situações: na presença (cinza) e na ausência da roda de atividade (branco). As variações correspondem à diferença (pf-pi) entre o peso inicial (pi) do pedaço de madeira e o peso medido 8 dias após o mesmo ter sido colocado na gaiola (pf).

5.5.3. Parte 3- Análise comportamental de tuco-tucos na presença e ausência da roda

5.5.3.1. Comportamentos exibidos na presença e na ausência da roda

Durante a análise visual dos vídeos, observou-se que, quando os animais têm acesso à roda, alternam, durante a fase de escuro, atividades de corrida com breves episódios de outros comportamentos, como ingestão de alimentos, *grooming* e movimentos que simulam a escavação e com longos episódios (de mais de uma hora) de inatividade. Muitos dos episódios de corrida na roda, durante a noite, duram mais de 30 minutos ininterruptos. Durante a fase de claro, os animais raramente utilizam a roda, mas são observados outros comportamentos.

As filmagens após a retirada da roda revelam que, na ausência da atividade em roda, outros comportamentos são expressos com mais frequência, particularmente deslocamentos pela gaiola e movimentos que se assemelham à escavação (Fig. 5.7). É importante notar que, bem como a corrida na roda, o roer também foi impedido quando a roda foi retirada, já que esse era o objeto que os animais roíam. Na ausência da roda os episódios contínuos de atividade duravam menos, raramente excedendo 20 minutos antes de serem interrompidos. O tempo total de inatividade na ausência da roda aumentou em 15%, 20% e 16%, em três animais (#46, #97 e #98, respectivamente) e diminuiu em 6% no animal #52.

5.2.3.2. Efeitos de diferentes comportamentos na elevação da Tc

Com o objetivo de investigar os efeitos agudos de diferentes padrões comportamentais na Tc, foi realizada uma análise descritiva da Tc em duas situações diferentes. Dois registros de Tc do animal #52, com duração de uma hora cada, foram comparados. O primeiro foi tomado na presença da roda, quando o animal apresentou um episódio de atividade em roda por 30 minutos (intercalado por breves episódios de alimentação). O segundo foi tomado na ausência da roda, quando o animal apresentou episódios intercalados de deslocamento e "escavação", bem como de alimentação, por 30 minutos contínuos. Nos dois registros, os animais apresentavam-se inativos por ao menos 30 minutos antes da atividade se iniciar. Devido a essa necessidade de encontrar um registro que cumprisse essas exigências (30 minutos contínuos de atividade precedidos de 30 minutos de inatividade), não foi possível utilizar dados tomados exatemente no mesmo horário do dia. Garantimos, no entanto, que ambos os dados foram tomados na segunda metade da fase de atividade. Em ambos os casos pudemos observar um aumento rápido da Tc após o início da atividade (Fig. 5.8). Após 30 minutos de atividade, a Tc alcançou o mesmo patamar com os dois tipos de atividade.

5.5.3.3. Diferentes posturas de repouso e a diminuição da Tc

Uma observação que merece destaque é aquela acerca das posturas que o animal assume durante os episódios de repouso, intercalado com aqueles de atividade. Normalmente, durante o repouso o animal se apoia nas quatro patas, com a coluna curvada e o ventre voltado para baixo (Fig 5.9A). No entanto, em alguns momentos o tuco-tuco apresenta uma postura diferente, deitando com as costas e a cabeça apoiadas no chão e expondo o ventre (Fig 5.9B). Notavelmente, essas posturas parecem ter um efeito importante na Tc do animal. Quando o animal repousa sobre as quatro patas, a Tc, que se elevou durante o exercício prévio, cai mais lentamente do que quando ele se posiciona com o ventre para cima (Fig 5.9C e 5.9D).

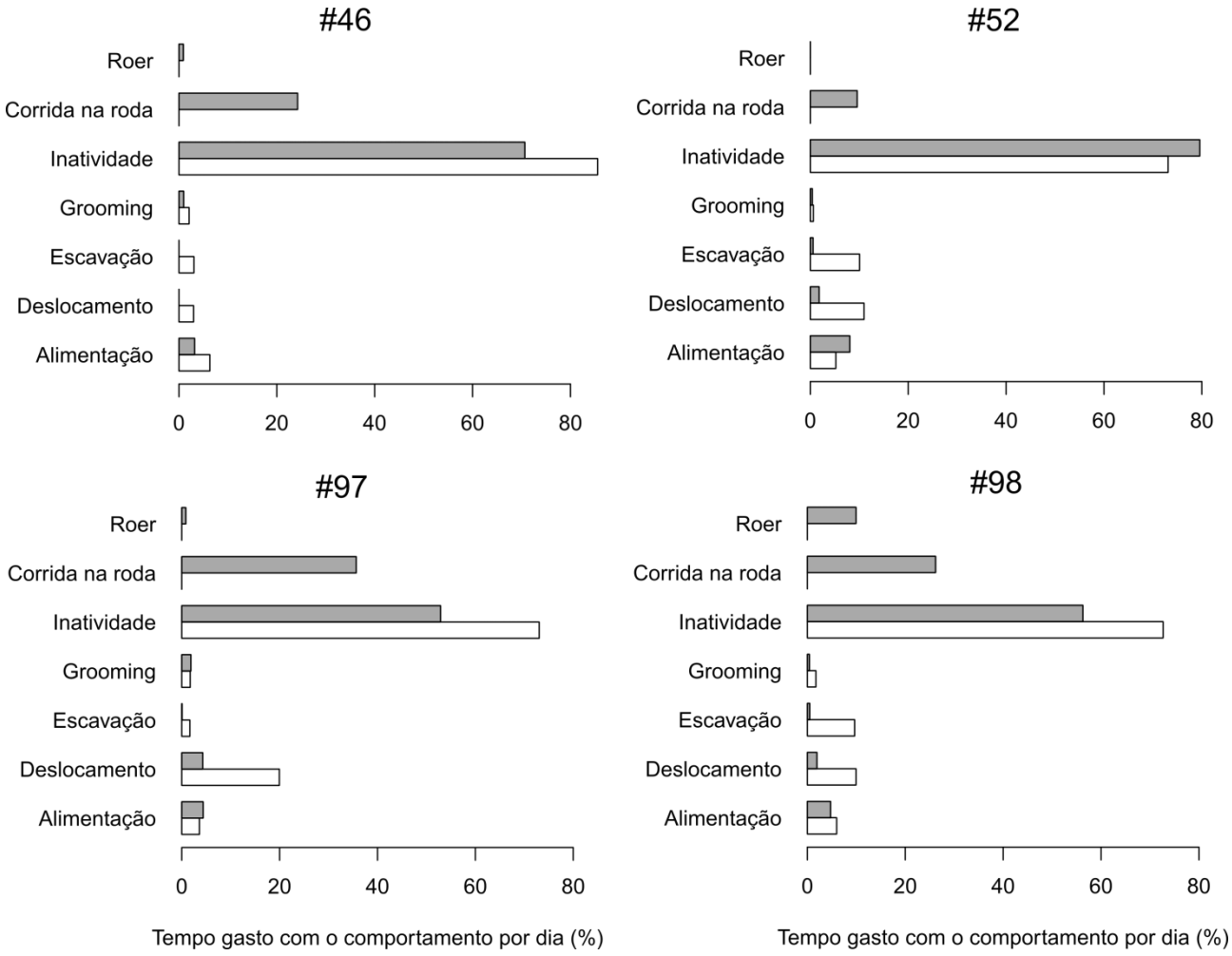

Figura 5.7. Porcentagem do tempo despendido em cada comportamento por dia em quatro indivíduos. Comparação entre duas situações: presença (barras em cinza) e ausência (barras brancas) da roda de atividade.

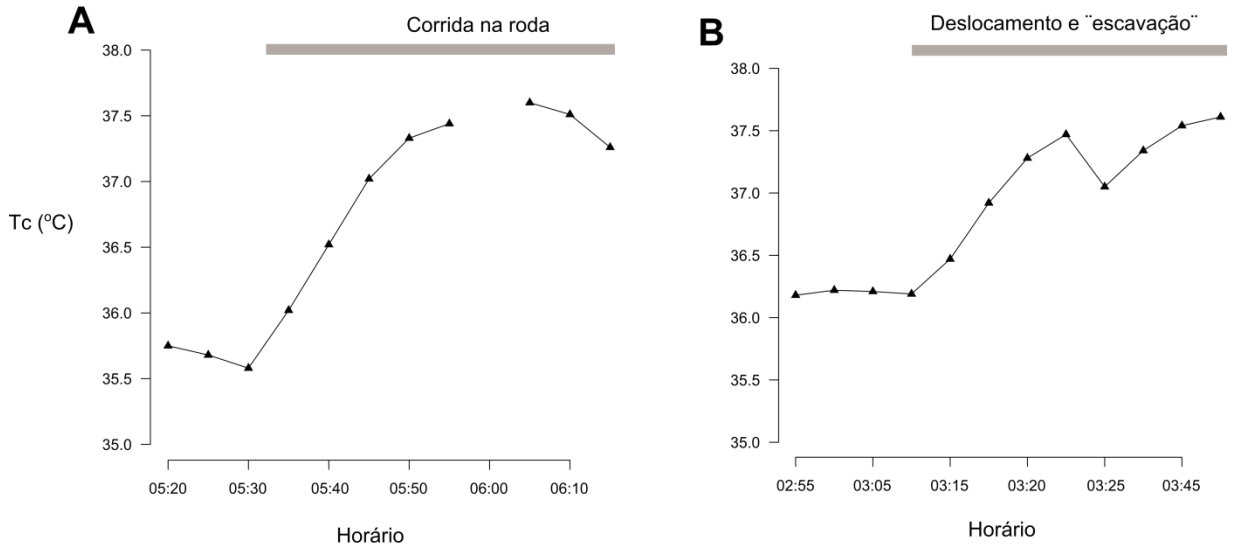

Figura 5.8. Comparação dos efeitos na Tc de duas atividades distintas. Os registros foram feitos na presença (A) e ausência (B) da roda de atividade. As barras cinzas indicam a fase na qual o animal estava ativo. Nas duas situações há aumento da Tc após o início da atividade. No gráfico A há um ponto faltante, às 06:00.

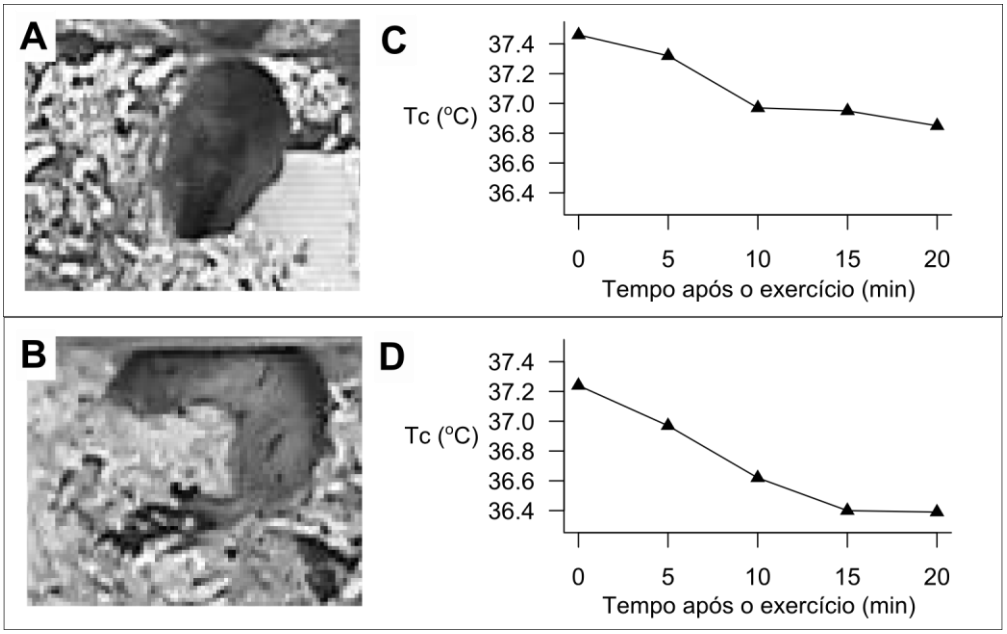

Figura 5.9. Diminuição da Tc após o exercício em duas diferentes posturas de repouso. **A**. Fotografia de um animal apoiado nas quatro patas durante o repouso. **B.** Fotografia de um animal deitado com a cabeça apoiada no chão e o ventre voltado para cima. **C.** Tc medida logo após o animal cessar o exercício, enquanto repousa apoiado nas quatro patas. **D.** Tc medida logo após o animal cessar o exercício, enquanto repousa deitado e com o ventre voltado para cima.

4.6. Discussão

Os resultados obtidos nesses experimentos nos permitem dizer que o ritmo circadiano de Tc persiste na ausência da roda de atividade sem alterações no τ e na fase, e que há sincronização com o ciclo de CE por arrastamento, da mesma forma que ocorre quando o animal tem acesso à roda (Fig. 5.1). A análise comparativa da amplitude do ritmo de Tc, nas condições de acesso e ausência da roda de atividade, mostrou que a diferença não é significativa, embora seja possível observar alterações nos seus valores quando analisamos os padrões de cada indivíduo separadamente. Esses resultados contrastam com aqueles obtidos para hamsters (*Mesocricetus auratus*), cuja diferença, de em média 0,86^{o}C, na amplitude entre as duas condições, é estatisticamente significativa (Golombek et al., 1993). Considerando que ao menos parte da modulação da amplitude ocorre por efeitos agudos da atividade locomotora, essa diferença pode estar relacionada a diferenças no comportamento das duas espécies. Apesar de não haver análises das mudanças comportamentais nos hamsters, algumas especulações podem ser feitas em relação aos tuco-tucos.

Em primeiro lugar, os nossos resultados mostram que parte da modulação da amplitude do ritmo de Tc ocorreu pela elevação dos valores mínimos (Tabelas 5.1 e 5.2). Como as condições ambientais não foram modificadas durante todo o experimento, pode-se inferir que esse fator que levou a essa elevação dos mínimos seria alguma mudança fisiológica decorrente da retirada da roda. Um dos candidatos é o estresse, que pode levar à elevação da Tc (Cabanac e Briese, 1992, Mrosovsky, 1990). Um estudo com hamsters mostrou que a presença da roda de atividade pode levar a um aumento menor da Tc decorrente do estresse pela manipulação (Eberli et al., 2011). Como os tuco-tucos são animais selvagens, hipotetizamos que a própria situação de cativeiro já seria estressante para eles, e que a presença da roda de atividade poderia diminuir os níveis de estresse, atenuando assim seus efeitos sob a Tc.

Infelizmente, os resultados do experimento para avaliar níveis de estresse foram inconclusivos. O fato dos animais terem roído mais madeira na presença da roda (Fig. 5.6) contradiz a nossa hipótese inicial, de que os animais roeriam mais na ausência da roda, por ficarem mais estressados. Devemos levar em conta, no entanto, que a introdução de um objeto novo sempre pode induzir os animais a roê-lo, passando a ignorá-lo em seguida. Nesse sentido, a ordem de condições do experimento pode ter influenciado os resultados. Outro aspecto a ser levado em conta, é o fato de alguns pedaços de madeira terem aumentado de

peso durante o experimento. Esse fato, que provavelmente ocorreu por absorção de umidade, comprometeu a confiabilidade desses dados. Uma alternativa para controlar esse problema seria utilizar outro tipo de material, como plástico, que já foi utilizado em um experimento similar envolvendo camundongos (Ayada et al., 2002). Sendo assim, esse experimento deveria ser repetido com ajustes metodológicos e mais controles para que uma discussão mais aprofundada sobre os resultados pudesse ser feita.

Outro aspecto a ser levado em consideração a respeito da comparação da amplitude na presença e na ausência da roda de atividade é que, quando o experimento da Parte 1 foi planejado esperava-se que a remoção da roda acarretaria uma drástica redução da atividade locomotora. Entretanto, observou-se que essa diminuição não ocorreu em todos os animais. Notamos que em alguns animais há, inclusive, aumento das contagens medidas pelo sensor. Esses resultados já sugeriram que os animais, na ausência da roda de atividade, deveriam substituir a corrida por outros comportamentos que pudessem, também, aumentar a Tc. A análise dos vídeos revelou que três dos quatro animais filmados passaram mais tempo inativos na ausência da roda (Fig. 5.6). Por outro lado, nessa condição os animais aumentam o tempo de expressão de outros comportamentos, principalmente deslocamento e "escavação". Essa substituição da corrida por outras atividades, após a retirada da roda, já foi observada em outros animais. Camundongos sem acesso à roda, por exemplo, passam mais tempo escalando a tampa da gaiola do que quando a roda é oferecida (Harri et al., 1999).

Nossos resultados sugerem que os comportamentos de "escavação" e de deslocamento têm efeitos diretos na Tc similares aos da roda (Fig. 5.8). Dessa forma, eles poderiam ser suficientes para que houvesse, diariamente, valores máximos de Tc similares àqueles observados na ausência da roda. Como o animal passa menos tempo ativo, esses valores mais altos de Tc provavelmente ocorreriam também por menos tempo. No entanto, como a amplitude é a diferença entre os valores máximos e mínimos, seu valor sofreria poucas modificações.

Os gráficos de dados brutos das séries temporais (Fig. 5.4) e plexogramas (Fig. 5.2), nos permitem observar que a elevação da Tc, provavelmente decorrente dos efeitos diretos do exercício é seguida de uma diminuição de seus valores até um determinado patamar, que deve ocorrer durante o repouso. Nossos resultados sugerem que a taxa desse decréscimo também é influenciada por aspectos comportamentais, particularmente pela postura que o animal adota durante o repouso (Fig 5.9). A adoção de diferentes posturas pode ser, portanto, um exemplo de mecanismo comportamental de termorregulação, utilizado por esses animais para dissipar calor. Mecanismos similares, nos quais o animal expande a área em contato com

o ambiente, para aumentar a troca de calor, já foram relatados para diversas espécies de animais (Cabanac, 2010; Roberts et al., 1974).

A intenção inicial dessa série de experimentos era apenas investigar e possivelmente quantificar a modulação do ritmo de Tc pela atividade locomotora através da retirada da roda. Os resultados obtidos, no entanto, mostraram que os aspectos comportamentais exibidos na presença e na ausência da roda de atividade são complexos e essa complexidade se reflete nos seus efeitos na Tc. Os resultados dos experimentos e análises apresentados neste capítulo foram valiosos, mas não foram suficientes para quantificar os efeitos diretos da atividade locomotora no aumento da Tc. Por essa razão, passamos a tratar essa questão através de um tratamento estatístico, cujos resultados são descritos no próximo capítulo.

CAPÍTULO 6 - EFEITOS AGUDOS DA ATIVIDADE LOCOMOTORA NA TC: DEPENDÊNCIA DE FASE E MÉTODO DE FILTRAGEM DO RITMO DE TC

6.1. Resumo

Como vimos no capítulo 5, o ritmo diário de Tc que observamos é composto não somente pelas variações da Tc controladas pelo oscilador circadiano, mas também por acréscimos pontuais devidos aos efeitos agudos da atividade locomotora. Neste capítulo apresentamos a aplicação de um método estatístico para filtrar, dos dados brutos de Tc, esses efeitos agudos da atividade locomotora. A dissipação de calor de um animal apresenta taxas diferentes em cada horário do dia, o que faz com que os acréscimos de Tc, causados diretamente pela atividade locomotora, variem também ao longo do dia. Foram analisadas, dessa forma, quais são as fases do dia em que existe maior correlação entre aumento de atividade e aumento de Tc. Chegamos ao resultado de que essa correlação, nos tuco-tucos, é maior no início da fase de escuro e menor no meio da fase de claro, em ciclo CE12:12. Além disso, utilizamos modelos lineares para prever, em cada horário, qual seria a Tc caso o animal estivesse imóvel. Filtramos, assim, os efeitos agudos da atividade locomotora do ritmo de Tc.

6.2. Introdução

6.2.1. Ritmo circadiano de produção de calor

Reações bioquímicas do metabolismo resultam na conversão de energia química em energia térmica. Dessa forma, quanto maior a taxa metabólica, maior a quantidade de calor produzida pelo animal. Animais endotérmicos apresentam, como um dos aspectos que os diferenciam de animais ectotérmicos, taxas metabólicas muito mais elevadas. Dependendo da Ta à qual esses animais são expostos, apenas o calor decorrente do metabolismo basal (necessário para manter o animal vivo, sem que eles realizem nenhuma atividade locomotora ou digestão) pode ser suficiente para manter uma Tc estável (Pough et al., 2005). Entretanto, a produção de calor pode aumentar quando ocorrem atividades que implicam no aumento da taxa metabólica, como a digestão e a realização de exercícios físicos. Já quando os animais são expostos a baixas temperaturas, são ativados alguns mecanismos específicos de produção de calor, que podem ser dependentes ou independentes de tremor (Bícego et al., 2006). Em roedores, um mecanismo independente de tremor particularmente importante é a termogênese

realizada no tecido adiposo marrom. Esse processo ocorre porque as células desse tecido, presente principalmente entre as escápulas do animal, contêm mitocôndrias que apresentam um mecanismo especializado para a conversão em calor da energia proveniente da oxidação de ácidos graxos (Himms-Hagen, 1985).

A taxa metabólica de um animal é tradicionalmente estimada através de medidas de consumo de oxigênio. O valor da taxa metabólica basal (também chamada de taxa metabólica padrão) é obtido quando essas medidas são tomadas em condições específicas, nas quais o animal deve estar em repouso e em jejum, com o mecanismo termorregulatório ativado (Rolfe e Brown, 1997). Se essas medidas forem realizadas em diferentes horas do dia, observa-se que o consumo de O_2 varia ao longo do dia, evidenciando a existência de um ritmo circadiano de taxa metabólica basal (Aschoff, 1982). Além da taxa metabólica basal, ritmos circadianos também são constatados em mecanismos específicos de produção de calor, como a termogênese do tecido adiposo marrom (Haim e Zisapel, 1999; Redlin et al., 1992). Nesse sentido, podemos dizer que os mamíferos apresentam um ritmo circadiano de produção de calor.

6.2.2. Ritmo circadiano de dissipação de calor

Intuitivamente poder-se-ia assumir que o ritmo de produção de calor, por si só, seria o responsável pelo ritmo circadiano de Tc. No entanto, a Tc de um organismo não depende somente de quanto calor é produzido, mas também de quanto calor é dissipado. Como veremos a seguir, a taxa de calor dissipado também varia de acordo com a hora do dia (Aschoff e Heise, 1972).

Para compreender o que significa a taxa de dissipação de energia termica, é importante entender como ocorre a troca de calor entre o animal e o ambiente. O fluxo de calor entre dois materiais acontece sempre que a temperatura entre eles é diferente. Como dificilmente o animal e o ambiente apresentam temperaturas idênticas, há constante troca de calor entre eles. Essa troca pode acontecer de diferentes maneiras. Uma delas é por condução, processo no qual a troca de calor ocorre por contato físico entre dois materiais. Quando um desses materiais é um fluido (como o ar), essa troca é acelerada pela convecção. Nesse caso, há deslocamento do fluido, o que contribui para a manutenção de um gradiente de temperatura. Outro processo de troca de calor com o ambiente é por radiação, no qual a transferência ocorre através da emissão de radiação eletromagnética. Por fim, uma forma comum de transferência de calor, que associa condução e convecção, é aquela que ocorre por evaporação de água. Ao menos parte da evaporação acontece através da respiração, uma vez

que o ar exalado está saturado de vapor de água. Em muitos animais a evaporação de água também ocorre através da sudorese e do ofego (Schmidt-Nielsen, 1997). A importância de cada forma de transferência de calor na troca total de calor do animal com o ambiente depende da espécie e das características de seu habitat. No caso de roedores subterrâneos, a alta umidade relativa do ar e a atmosfera estagnada dos túneis limitam a convecção e a evaporação (McNab, 1966). Dessa forma, acredita-se que a principal forma de troca para esses animais seja a condução entre o animal e o solo (Buffenstein, 2000).

A "facilidade" com que ocorre a troca de calor entre o animal e o ambiente é representada pela condutância térmica (McNab, 1980). O cálculo da condutância é feito dividindo-se a quantidade de calor transferida por unidade de tempo pela diferença entre as temperaturas do animal e do ambiente (Aschoff, 1981). Em um ambiente no qual a Ta é menor que a Tc, valores altos de condutância podem favorecer a dissipação de calor, enquanto valores baixos podem contribuir para a conservação da energia térmica pelo animal.

A condutância de um animal pode variar de acordo com fatores morfológicos, comportamentais e fisiológicos. Dentre os morfológicos há, por exemplo, a forma e o tamanho do corpo, a pelagem e a gordura subcutânea. Dentre os fatores fisiológicos estão aspectos autonômicos, como os mecanismos vasomotores que controlam o fluxo de sangue em uma determinada região do corpo. Já o comportamento acarreta mudanças posturais que também contribuem para modificar a condutância (Aschoff, 1981; Aschoff e Heise, 1972; Schmidt-Nielsen, 1997). Os aspectos morfológicos variam muito lentamente ao longo da vida do animal, durante o seu desenvolvimento ou apresentando variação sazonal. Já os aspectos fisiológicos e comportamentais se ajustam de forma muito mais rápida. Como vimos no capítulo 5, a adoção de uma postura que aumente a superfície exposta ao ar pode levar à rápida diminuição da Tc, sinalizando que houve aumento da condutância (Fig. 5.9). Ajustes na vasodilatação e vasoconstrição também podem ocorrer rapidamente. Variações desses ajustes ao longo dia resultam em um ritmo diário de fluxo sanguíneo nas extremidades do corpo, que é, em grande parte, responsável pelo ritmo circadiano de dissipação de calor (Aschoff e Heise, 1972; Stephenson et al., 1984).

6.2.3. Interação entre os ritmos circadianos de produção e de dissipação de calor

Como vimos anteriormente, a Tc é determinada pelas taxas tanto de produção quanto de dissipação de calor. Nesse sentido, a interação entre os ritmos dessas duas taxas resulta no ritmo circadiano de Tc (Aschoff e Heise, 1972, Aschoff, 1981). Parâmetros rítmicos da Tc, como a fase e a amplitude, dependem da relação de fase entre os ritmos de produção e de

dissipação de calor. Isso acontece porque a temperatura se eleva enquanto a quantidade de calor produzida é maior do que a de calor dissipada e começa a diminuir quando a quantidade de calor dissipada ultrapassa a de produzida. A figura 6.1 ilustra como ocorre a interação entre esses dois ritmos e diferentes relações de fase entre eles podem influenciar a fase e a amplitude do ritmo de Tc. Essa figura também apresenta o ritmo de condutância. O pico desse ritmo ocorre quando a razão entre a taxa de dissipação de calor e a diferença entre a Tc e a Ta é máxima. Isso ocorre um pouco depois do pico da dissipação de calor, quando a Tc está diminuindo.

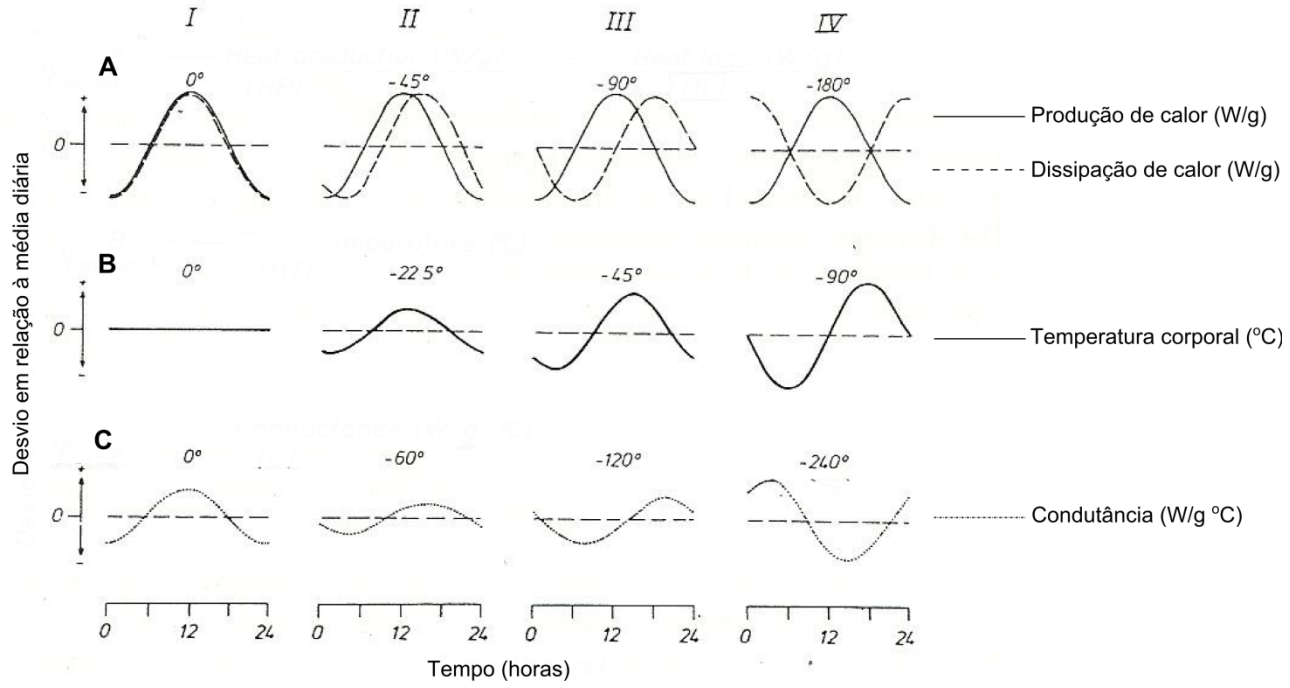

Figura 6.1. Esquemas hipotéticos da interação entre os ritmos de produção de calor, dissipação de calor, Tc e condutância. Foram hipotetizadas quatro situações (I , II, III, IV) nas quais a relação de fase entre os ritmos de produção de calor são diferentes (A) e qual seria a consequência dessa relação de fase na amplitude e fase dos ritmos de Tc (B) e de condutância (C). Os números sobre as curvas indicam, em graus, a relação de fase e os ritmos de dissipação de calor (A), Tc (B) e condutância (C). (Modificado de Aschoff, 1981)

6.2.4. Dependência de fase dos efeitos da atividade locomotora na Tc

Durante a atividade locomotora, a taxa metabólica se eleva, ou seja, mais calor é produzido, causando um rápido aumento da Tc. A magnitude final desse aumento, no entanto, depende de quanto calor será dissipado. Como a dissipação de calor e a condutância variam de acordo com a hora do dia, pode-se prever que a magnitude do aumento da Tc pela atividade locomotora também seja dependente de fase. De fato, diversos estudos

demonstraram que os efeitos do exercício na Tc variam durante o dia (Aldemir et al., 2000, DeCastro, 1978, Tanaka et al., 1990; Weinert e Waterhouse, 1998) .

6.2.5. Filtragem do ritmo de temperatura através de tratamentos estatísticos

Como vimos no capítulo 5, privar roedores de realizar exercícios é impossível em um experimento de longo prazo e que não use medidas extremas de contenção. Por esse motivo, alguns métodos estatísticos vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de "filtrar" os efeitos da atividade locomotora na Tc, após a realização do experimento (Refinetti, 1999; Waterhouse et al., 2000; Weinert et al., 2003; Weinert e Waterhouse, 1998). Dentre os métodos descritos na literatura, o que acreditamos ser mais apropriado para os nossos experimentos é aquele desenvolvido por Weinert e Waterhouse (1998). Esse método utiliza regressões lineares para, primeiramente, construir um modelo de dependência da Tc em relação à atividade locomotora. Um dos aspectos mais importantes desse método é que ele leva em conta que o fato do aumento da Tc, causada pela atividade locomotora, variar com a hora do dia.

6.3. Objetivos

Testamos a aplicação do método de Weinert-Waterhouse nos dados de Tc dos tuco-tucos, a fim de verificar a viabilidade de seu uso em experimentos futuros. Além disso, durante a aplicação dos métodos, calculamos o coeficiente de correlação entre a Tc e atividade locomotora para investigar sua dependência com a fase do dia.

6.4. Métodos

A aplicação do método de Weinert-Waterhouse envolve a execução e o ajuste de diversas análises. Além disso, realizamos pequenas modificações sobre o método original. Para a realização desses ajustes, foram utilizados os dados dos sete animais envolvidos nos experimentos das partes 2 e 3 do Capítulo 5.

6.4.1. Determinação do tempo de integração (IT)

O aumento da Tc não reflete imediatamente a quantidade de atividade muscular realizada naquele momento, mas sim a soma de toda a atividade realizada durante um determinado intervalo de tempo, anterior à detecção do aumento efetuado. Por essa razão, a

primeira etapa do método consiste no cálculo da estimativa desse intervalo de tempo, o chamado tempo de integração (IT) da atividade. O tempo necessário para que a atividade muscular se acumule e resulte no aumento de Tc observado, ou seja, o IT, pode variar de acordo com o tamanho do animal e sua condutividade térmica. O cálculo do IT a ser utilizado nas próximas etapas da análise envolveu o teste de diversos valores. Para isso, foram criadas planilhas nas quais, para cada registro de Tc, havia um valor que correspondia à atividade locomotora geral (medida pelo sensor intraperitoneal) somada por IT minutos anteriores ao registro da temperatura. Dessa forma, o cálculo do valor atividade integrada para um IT de, por exemplo, 15 minutos e para um registro da temperatura hipoteticamente realizado às 11:00, corresponderia à soma dos valores de atividade registrados às 11:00, 10:55 e 10:50. O escopo de valores IT calculados foi de 10 a 60 minutos, em incrementos de 5 minutos. Cada planilha com as atividades integradas foi então dividida em seções de 2 horas (00:00 – 02:00, 02:00 - 04:00, e assim por diante). Os dados obtidos durante todos os dias de registro, para cada seção, foram então agrupados, sendo criados assim conjuntos que reuniam os 28 dias de registro, para cada 2 horas. Para cada um desses conjuntos, foi calculado o coeficiente de correlação (pelo método de Pearson) entre a atividade integrada e a Tc. O valor de IT para qual o valor do coeficiente de correlação era maior foi então selecionado.

6.4.2. Previsão de valores de Tc a partir de modelos lineares

Com a definição dos valores de IT, prosseguimos para a segunda etapa da análise. Essa etapa tem como objetivo determinar o provável valor da Tc, em cada fase do dia, caso o animal estivesse imóvel. Foram realizadas regressões lineares entre os valores de Tc e de atividade integrada em seções de 3 horas, ao longo das 24 horas do dia. Essas regressões estimam modelos lineares, a partir dos quais podemos prever o valor da Tc esperada quando o valor da atividade é zero (que corresponde ao intercepto do modelo linear) (Fig. 6.2). Esse valor foi então associado ao horário no meio da janela de 3 horas. Para tratar os dados obtidos nos experimentos, essa janela de 3 horas foi deslocada em incrementos de 5 minutos. Assim, o valor previsto de Tc para atividade igual a zero, no horário, por exemplo, das 11:00 é aquele previsto pelo modelo calculado para a seção que engloba dados das 09:30 até 12:25. Já o valor das 11:05 utiliza os dados da janela que vai das 09:35 às 12:30, e assim por diante. Análises envolvidas na aplicação desse método foram desenvolvidas utilizando-se a linguagem de programação R, versão 2.11.1. (R Development Core Team, 2010).

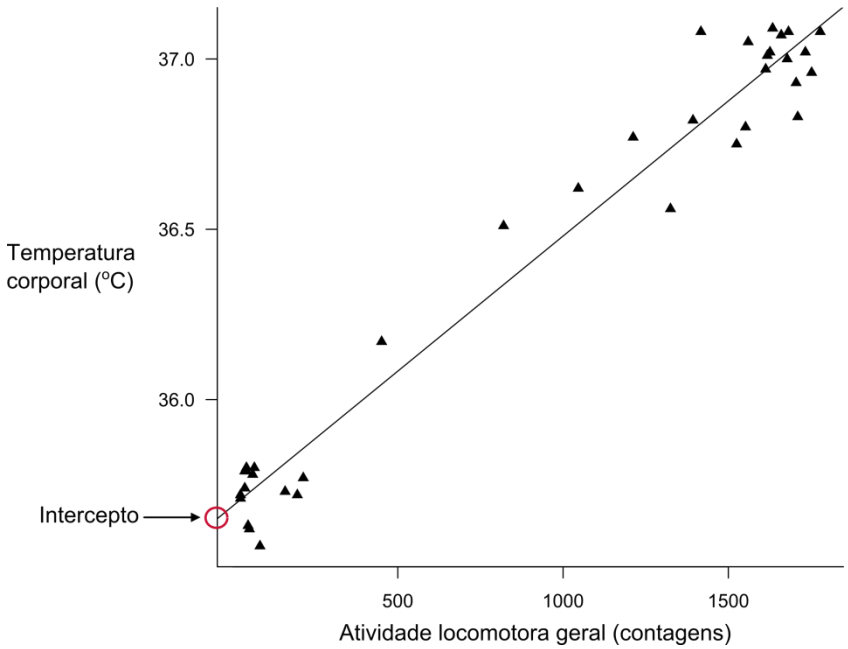

Figura 6.2. Relação entre a Tc e a atividade acumulada nos 30 minutos anteriores, em uma seção de 3 horas, das 00:00 às 02:55, para o animal #98. A linha representa o modelo estimado pela regressão linear. O círculo vermelho aponta o valor da Tc previsto por esse modelo para atividade igual a zero (intercepto), no horário da 01:30 (valor no meio da janela de 3 horas). Em cada horário do dia, temos um valor distinto deste intercepto, que corresponde à estimativa da Tc, naquele horário, tendo sido filtrado o efeito agudo da atividade.

6.5. Resultados

6.5.1. Determinação do tempo de integração (IT) e coeficientes de correlação

Em média, os valores dos coeficientes de correlação entre Tc e a atividade locomotora foram maiores quando a atividade estava integrada por um IT de 30 minutos. Quando analisamos, para esse IT, os coeficientes de correlação para cada janela de duas horas, notamos uma clara tendência a valores maiores nas horas de escuro e menores nas horas de claro, com os menores valores no meio da fase de claro e os maiores no início da fase de escuro (Fig. 6.3). Valores maiores do coeficiente de correlação indicam que naquele horário do dia, um aumento na atividade locomotora promove maior aumento de Tc.

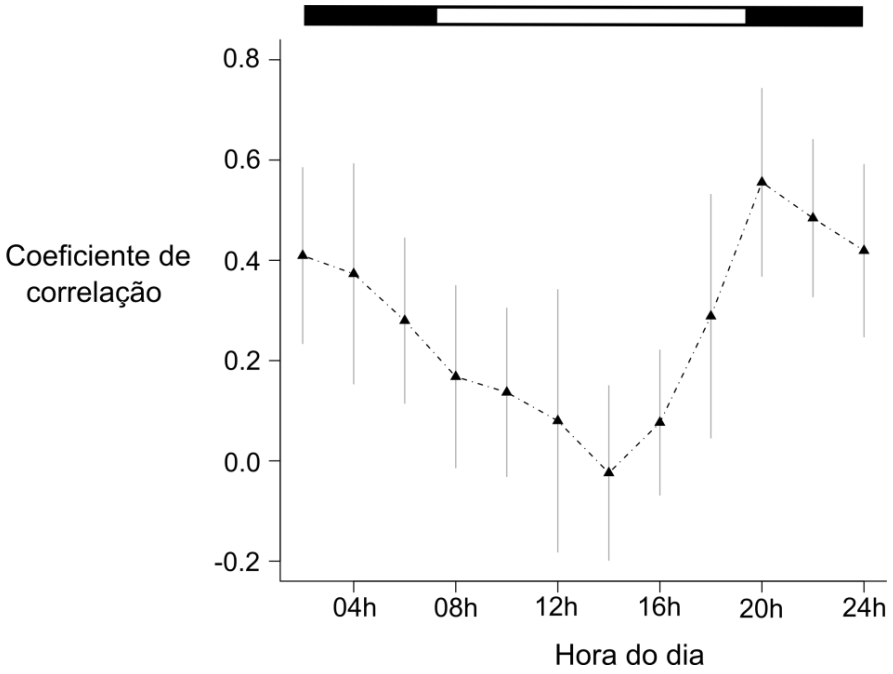

Figura 6.3. Média dos coeficientes de correlação entre a Tc e a atividade integrada por 30 minutos em sete tuco-tucos. Todos os dados foram coletados enquanto os animais estavam expostos ao ciclo de CE 12:12, indicado pela barra superior (preto=fase de escuro, branco= fase de claro), Cada ponto corresponde à média dos coeficientes de correlação calculada para cada janela de 2 horas.As linhas verticais representam os desvios-padrão.

6.5.2. Aplicação do método Weinert-Waterhouse

tamos a aplicação deste método, usando o IT de 30 minutos, no tratamento dos dados de um animal (#106) que participou do experimento da parte 2 do capítulo 5. Como podemos ver na figura 6.4, os dados de Tc tratados não apresentam os picos repentinos de aumento de Tc presentes nos dados brutos. Isso é um indicativo de que o tratamento ao menos atenuou os efeitos mais imediatos dos episódios de atividade na Tc. A análise dos plexogramas (Fig. 6.5) sugere que não há diferenças significativas na fase e na forma de onda, entre os dados tratados e os dados brutos. Há diferença, no entanto, na amplitude e nos valores máximos (Tabela 6.1.).

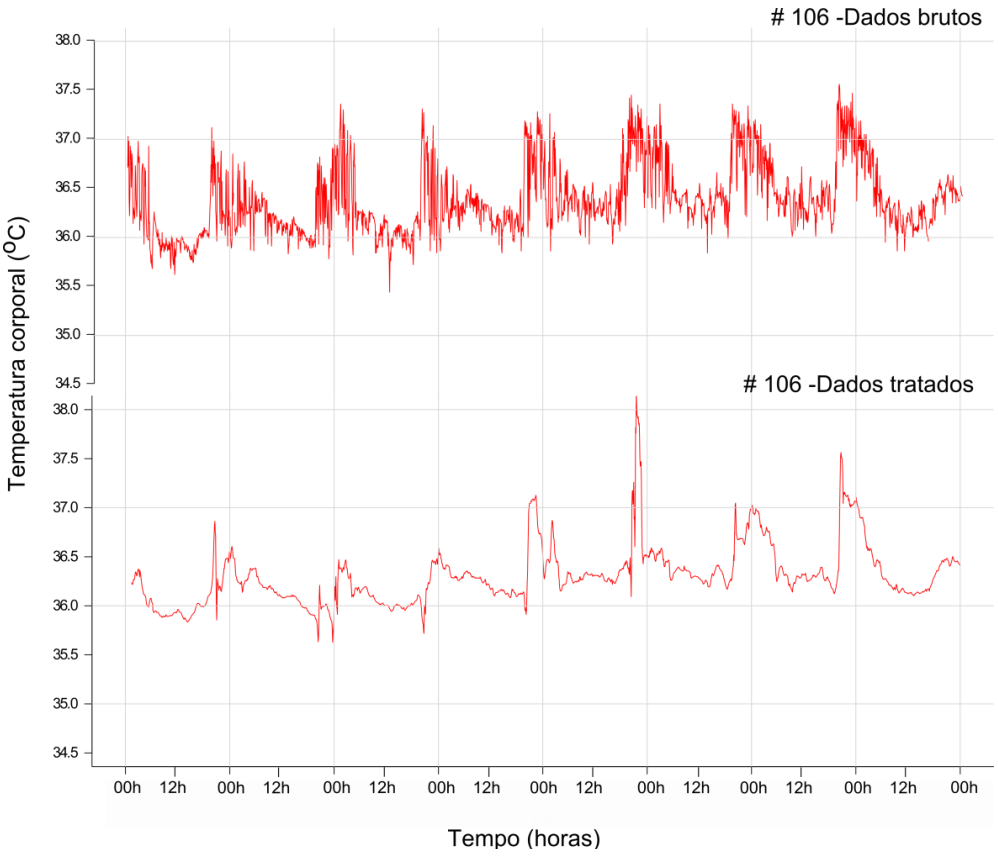

Figura 6.4. Comparação entre os dados de Tc brutos (painel superior) e tratados pelo método Weinert-Waterhouse (painel inferior) em um animal submetido ao ciclo de CE, ao longo de 8 dias. Os dados tratados representam o ritmo diário endógeno de Tc, já descontados (filtrados) os aumentos pontuais diretos de temperatura causados meramente pelo movimento muscular de locomoção, presentes nos dados brutos.

Tabela 6.1. Parâmetros dos ritmos de Tc calculados com base em dados brutos e tratados. Valores de Tc (°C) médios, máximos, mínimos e a amplitude, foram calculados com base nos plexogramas (Fig. 6.3).

	Média	Máximo	Mínimo	Amplitude
Dados brutos	36,37	37,03	36,06	0,97
Dados tratados	36,30	36,73	36,12	0,61

6.6. Discussão

Os valores mais altos de correlação durante a fase de escuro indicam que uma mesma quantidade de atividade muscular causa maior aumento da Tc nessa fase do que durante a fase de claro, sugerindo que existe variação diária da sensibilidade da Tc à atividade. Em outras palavras, poder-se-ia dizer que uma quantidade menor de calor proveniente da atividade física é dissipada durante as horas de escuro. No meio da fase se claro, por outro

lado, o coeficiente de correlação pode chegar a zero, sugerindo que, nesse horário, todo o calor decorrente da atividade locomotora é dissipado.

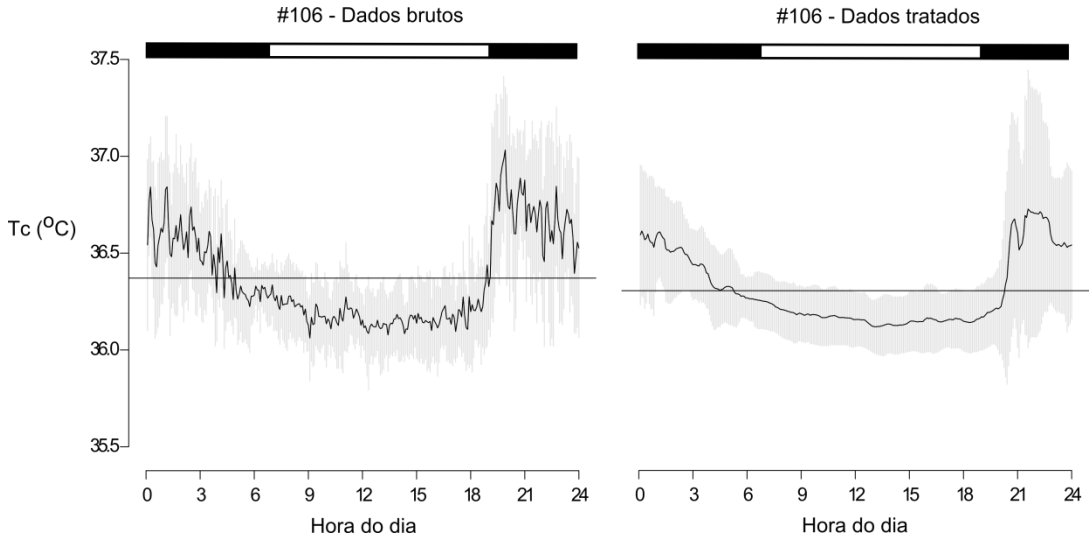

Figura 6.4. Plexogramas dos dados brutos (esquerda) e tratados (direita) do animal #106. Cada ponto representa a média para o horário dos dados dos oito dias. A linha horizontal representa a média e as linhas verticais os desvios-padrão.

Curiosamente, o padrão encontrado para os tuco-tucos é oposto àquele descrito para o camundongo, o qual apresenta os maiores coeficientes de correlação nas horas de claro (Weinert e Waterhouse, 1998) e igual ao observado em ratos, cuja correlação entre as duas variáveis é mais forte durante a noite (DeCastro, 1978). Por outro lado, quando ratos são forçados a se exercitar em uma esteira, há maior aumento de Tc durante as horas de claro. Nesse caso, a Tc final após 30 minutos de exercício é a mesma tanto à noite quanto de dia, mas como durante o dia a Tc antes do exercício é mais baixa (pois o rato é um animal noturno), a diferença entre a Tc após a atividade e a Tc inicial é maior (Tanaka et al., 1990).

Esses resultados contrastantes mostram que a interação entre a atividade locomotora e a Tc é muito complexa. É possível que essas diferenças entre espécies (ou dentro de uma mesma espécie, como no caso dos ratos) ocorram devido à diferença da relação de fase entre os ritmos de produção e de dissipação de calor (Fig. 6.2). É preciso levar em conta, porém, que os coeficientes de correlação são apenas uma medida indireta do quanto o calor gerado pelo exercício eleva a Tc. Medidas diretas de perda de calor e de condutância nessas situações seriam extremamente valiosas para resolver essa questão. No entanto, mesmo sem

termos essas medidas podemos fazer algumas especulações sobre a razão da Tc e a atividade locomotora estarem mais correlacionadas durante a fase de escuro, em tuco-tucos.

Como vimos no capítulo 1, o ambiente subterrâneo impõe desafios ao metabolismo energético, pois possui pouco alimento, alto custo de forrageamento e pouco oxigênio. Dessa forma, mecanismos que contribuam para diminuir o custo energético podem ser vantajosos para os tuco-tucos. Já foi relatado, por exemplo, que outras espécies de *Ctenomys* apresentam taxas metabólicas basais mais baixas do que as de roedores de superfície, sendo essa uma característica comum entre roedores subterrâneos (Luna et al., 2009). Mecanismos vasomotores e ajustes de postura consomem pouca energia e têm um papel importante na regulação da dissipação de calor. Nesse sentido, se os animais apresentarem, durante a noite, maior vasoconstrição nas extremidades, conservariam uma quantidade maior de energia térmica e não necessitariam de um aumento tão grande na produção de calor para que ocorra elevação noturna da Tc. Durante o dia haveria mais vasodilatação contribuindo para valores mais baixos de Tc e para dissipação mais eficiente do calor do exercício.

A consequência da vasoconstrição noturna seria uma "dificuldade" maior de dissipar o calor proveniente da atividade locomotora. Porém, essa própria conservação de parte da energia térmica proveniente do exercício poderia contribuir para que a Tc alcance o valor defendido, mais alto durante a noite. Esse tipo de efeito já foi observado na espécie de tuco-tuco *C. talarum*. Os indivíduos dessa espécie, quando expostos à Ta de 15^{o}C, em repouso, apresentam Tc cerca de 4^{o}C mais baixas do que a medida a 25^{o}C (Busch, 1989). No entanto, quando realizam atividade física, também a 15^{o}C, conseguem manter os valores de Tc elevados, indicando que a conservação da energia térmica decorrente do exercício contribui, ao menos nessa Ta, para a manutenção da Tc (Luna e Antinuchi, 2002).

Mesmo que não saibamos quais são os mecanismos por trás dessa variação, ficou evidente, pela análise dos nossos dados, que a sensibilidade da Tc à atividade locomotora é dependente de fase. Esse resultado reforça a necessidade da utilização de um método de tratamento de dados que leve em consideração essa variação. Os resultados preliminares que obtivemos com a aplicação do método de Weinert-Waterhouse foram promissores no sentido de filtrar efeitos agudos da atividade muscular na Tc. Por essa razão, decidimos aplicá-lo nos dados do experimento descrito no próximo capítulo.

CAPÍTULO 7 - PARTIÇÃO DO RITMO CIRCADIANO DE TC

7.1. Resumo

A identificação anatômica do oscilador circadiano que controla o ritmo de Tc é controversa. Enquanto existem evidências sólidas sobre os NSQ serem o oscilador circadiano que controla o ritmo de atividade locomotora (Capítulo 3), os resultados de experimentos que investigaram se esses núcleos também controlam o ritmo de Tc são conflitantes. Mesmo que o oscilador responsável pelo ritmo de Tc esteja nos NSQ, é possível que ele seja distinto daquele que controla o ritmo de atividade locomotora, pois os NSQ são compostos por múltiplos osciladores. Utilizar protocolos experimentais que provocam a dissociação interna de osciladores dos NSQ em animais neurologicamente intactos podem trazer informações valiosas a respeito do controle do ritmo circadiano de Tc. Por esse motivo, submetemos os tuco-tucos à condição de claro constante, que induz um fenômeno denominado "partição de ritmo". Nesse fenômeno, o ritmo circadiano dissocia-se em dois componentes rítmicos, de forma que são visualizados dois blocos de atividade por ciclo de aproximadamente 24 horas. Essa dissociação ocorre devido à dessincronização interna de dois osciladores dos NSQ. A maior parte dos tuco-tucos estudados apresentou partição tanto do ritmo de Tc quanto do ritmo de atividade locomotora, exibindo uma notável diversidade de padrões rítmicos. Na maioria dos animais os ritmos de Tc e de atividade locomotora apresentaram exatamente o mesmo padrão temporal, sugerindo que esses dois ritmos são controlados pelos mesmos osciladores. No entanto, em um animal o padrão do ritmo de Tc foi diferente daquele observado do ritmo de atividade locomotora, sugerindo que o controle desse ritmo pode ser mais complexo.

7.2. Introdução

7.2.1. Identificação do oscilador circadiano que controla o ritmo de Tc

As primeiras suspeitas de que o oscilador que controla o ritmo circadiano de Tc poderia ser diferente daquele que controla o ritmo de atividade/repouso surgiram a partir da observação de que humanos mantidos em condições constantes por muitos dias passam a apresentar ritmos de Tc e de atividade/repouso com períodos distintos entre si. Enquanto o

ritmo de Tc expressa período próximo de 24 horas, o período do ritmo de atividade/repouso passa a expressar um período de mais de 30 horas (Aschoff, 1965, Aschoff e Wever, 1981). Observações similares também foram realizadas em macacos-de-cheiro (*Saimiri sciureus*) (Moore-Ede et al., 1982). Esse fenômeno, conhecido com dessincronização interna espontânea, levou alguns cronobiólogos a levantarem a possibilidade da existência de ao menos dois osciladores no sistema circadiano, um responsável pelo ritmo de atividade locomotora e outro pelo ritmo de Tc (Aschoff e Wever, 1981; Moore-Ede et al. 1982).

Com a identificação dos núcleos supraquiasmáticos (NSQ) como o oscilador responsável pelo ritmo de atividade locomotora (Capítulo 3), iniciou-se uma série de experimentos que investigaram se o ritmo circadiano de Tc persistia após a lesão desses núcleos. Os resultados desses experimentos, porém, têm sido conflitantes. Enquanto alguns indicam que o ritmo de Tc é abolido após a destruição dos núcleos (Abe et al., 1979; Eastman et al., 1984; Refinetti et al., 1994; Saleh et al., 1977; Stephan e Nunez, 1977), outros apontam a persistência desse ritmo após as lesões, enquanto o ritmo de atividade locomotora desaparece (Fuller et al., 1981, Nakayama et al., 1979 *apud* Kittrel, 1991, Powell et al., 1978; Satinoff e Prosser, 1988). Em uma revisão sobre o assunto, Kittrel (1991) aponta que as diferenças metodológicas desses estudos podem estar por trás dos resultados contrastantes. Essas diferenças vão desde as condições de iluminação nas quais os animais foram mantidos até os métodos estatísticos utilizados para detecção da ritmicidade. Além disso, uma das grandes limitações desses trabalhos é a dificuldade de garantir que a lesão tenha atingido toda a estrutura, e ao mesmo tempo não tenha danificado tecidos vizinhos. Nesse sentido, argumenta-se que naqueles experimentos que relataram a persistência do ritmo de Tc, as lesões podem não ter sido completas. Já no caso dos experimentos em que o ritmo foi abolido, não ficou comprovado se tecidos adjacentes aos NSQ, eventualmente envolvidos no controle do ritmo circadiano de Tc, possam ter sido destruídos (Kittrel, 1991).

Experimentos que acessam o ritmo de Tc após o transplante dos NSQ são raros. Na realidade, o único que chegou ao nosso conhecimento é um estudo no qual NSQ de fetos são implantados em ratos idosos com ritmos deteriorados (Li e Satinoff, 1998). Nesse caso, o ritmo de Tc é restaurado após o transplante. No entanto, os animais que receberam o transplante tinham o cérebro intacto, e não é possível garantir que o controle do ritmo foi exercido pelo tecido transplantado e não por alguma estrutura do animal receptor.

Devido a essa série de resultados inconclusivos, até hoje não há provas concretas de que os NSQ sejam, de fato, o oscilador circadiano da Tc, ao contrário do que ocorre para o

ritmo de atividade locomotora. No entanto, tampouco há evidências concretas da evidência de que esse oscilador estaria fora dos NSQ (Kittrel, 1991). Atualmente sabemos que há conexões eferentes dos NSQ tanto para regiões do hipotálamo responsáveis pela regulação da temperatura, como a área pré-óptica, quanto para tecidos periféricos, como o tecido adiposo marrom, que como vimos no capítulo 6 é um dos maiores responsáveis pela termogênese independente de tremor em roedores (Bartness et al., 2001; Watts, 1991). Essas conexões seriam importantes para que a informação rítmica do oscilador seja transmitida e resulte na ritmicidade circadiana da Tc.

Com os avanços no conhecimento da estrutura multioscilatória dos NSQ, tem se tornado cada vez mais aceito o modelo parcimonioso de um oscilador central, composto por múltiplas subunidades oscilatórias, que controlam os principais ritmos circadianos do organismo, incluindo o de Tc (Cambras et al, 2007), ao invés de um controle descentralizado, exercido por múltiplos osciladores anatomicamente distintos.

7.2.2. A composição multioscilatória dos núcleos supraquiasmáticos

Os NSQ consistem em um conjunto de aproximadamente 20 mil células, divididas em duas estruturas bilaterais, de formato ovoide, localizados no hipotálamo, acima do quiasma óptico (Fig.7.1) (Abrahamson e Moore, 2001). Tradicionalmente, considera-se que os NSQ apresentam duas subdivisões principais, o NSQ dorso-medial (NSQdm) e o NSQ ventro-lateral (NSQvl) (Fig. 7.1C). Essas duas regiões diferem entre si tanto funcionalmente quanto em relação à constituição química de seus neurônios (Dunlap et al., 2004; Mohawk e Takahashi, 2011).

Cada neurônio dos NSQ apresenta, mesmo quando isolado *in vitro*, oscilação circadiana de variáveis como disparos neurais e de expressão gênica (Herzog et al., 1998; Mohawk e Takahashi, 2011). Nos NSQ intactos, esses neurônios estão acoplados, formando redes de neurônios sincronizados entre si. Esses neurônios estão organizados de tal forma que são formadas múltiplas redes neuronais, cada uma com suas propriedades oscilatórias, resultando em múltiplos osciladores dentro dos próprios NSQ (Mohawk e Takahashi, 2011). O fato dos NSQ conterem diversos osciladores abre uma nova possibilidade a respeito do controle do ritmo circadiano de Tc, que poderia, inclusive, explicar fenômenos como a dessincronização interna. É possível que o oscilador que controla o ritmo circadiano de Tc esteja nos NSQ, mas seja distinto daquele que controla o ritmo de atividade locomotora.

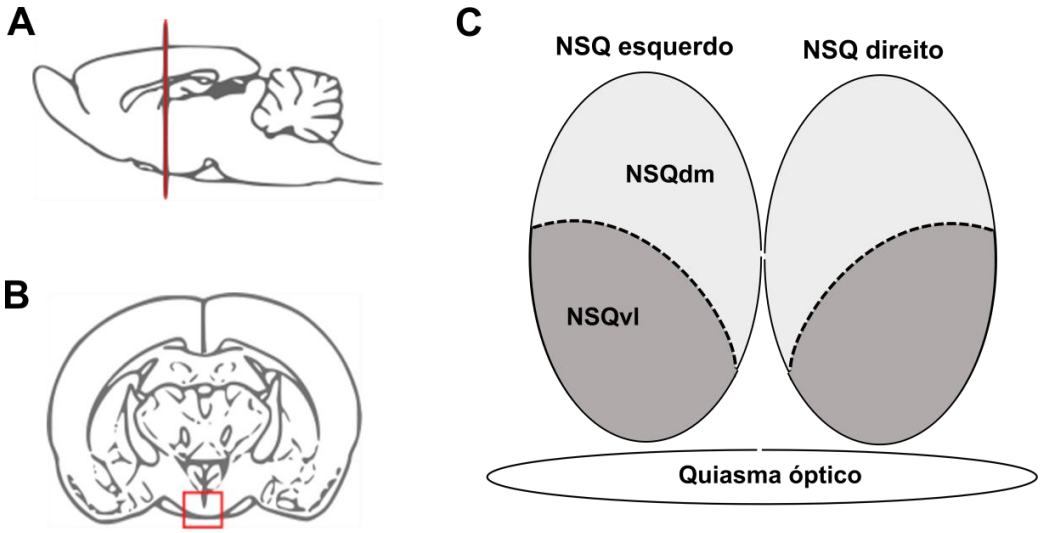

Figura 7.1. Localização e estrutura dos NSQ. **A -** Vista lateral de um encéfalo de roedor. A linha vermelha indica o local no qual o corte representado em B foi realizado. B - Corte coronal do encéfalo representado em A. O quadrado vermelho indica a região na qual os NSQ estão localizados. C - Esquema da estrutura dos NSQ, em um corte coronal. Cada núcleo (esquerdo e direito) é subdividido em NSQdm (cinza claro) e NSQvl (cinza escuro). (A e B modificados de Kishi e Elmquist, 2005)

Uma forma de investigar essa possibilidade é observar o padrão tanto do ritmo de Tc quanto de atividade locomotora sob condições em que sabidamente há dessincronização de osciladores dos NSQ. Essa dessincronização pode ser obtida, em laboratório, por diferentes protocolos experimentais cronobiológicos, que têm como vantagem permitir o estudo em animais neurologicamente intactos. Um dos protocolos mais utilizados para essa finalidade, é aquele que aplica ciclos de CE com período diferente de 24 horas, levando à "dessincronização interna forçada" dos ritmos (Cambras et al., 2007). No presente trabalho, porém, utilizamos um protocolo diferente, com o qual podemos obter um tipo específico de dessincronização de osciladores dos NSQ, a qual resulta no fenômeno de "partição" do ritmo circadiano.

7.2.3. A partição do ritmo de atividade locomotora

Em condições normais, o ritmo de atividade locomotora da maioria dos roedores caracteriza-se pela concentração da atividade em um único bloco (chamado de "α" ou "alfa") por ciclo de 24 horas (ou de aproximadamente 24 horas, caso o ritmo esteja em livre curso) (Fig. 7.2). Esse bloco de atividade é seguido por um bloco de repouso (denominado "ρ" ou "rô"). Em algumas condições, no entanto, pode haver a dissociação desse bloco único de

atividade diária em dois blocos mais curtos, separados aproximadamente 12 horas entre si (Fig. 7.2). Dizemos então que o ritmo se partiu em dois componentes (indicados como componentes 1 e 2 na figura 7.2). Logo após a separação, esses componentes expressam períodos diferentes entre si. A partir de um determinado momento, no entanto, eles atingem uma nova relação de fase estável e voltam a expressar um mesmo período (Pittendrigh e Daan, 1976b).

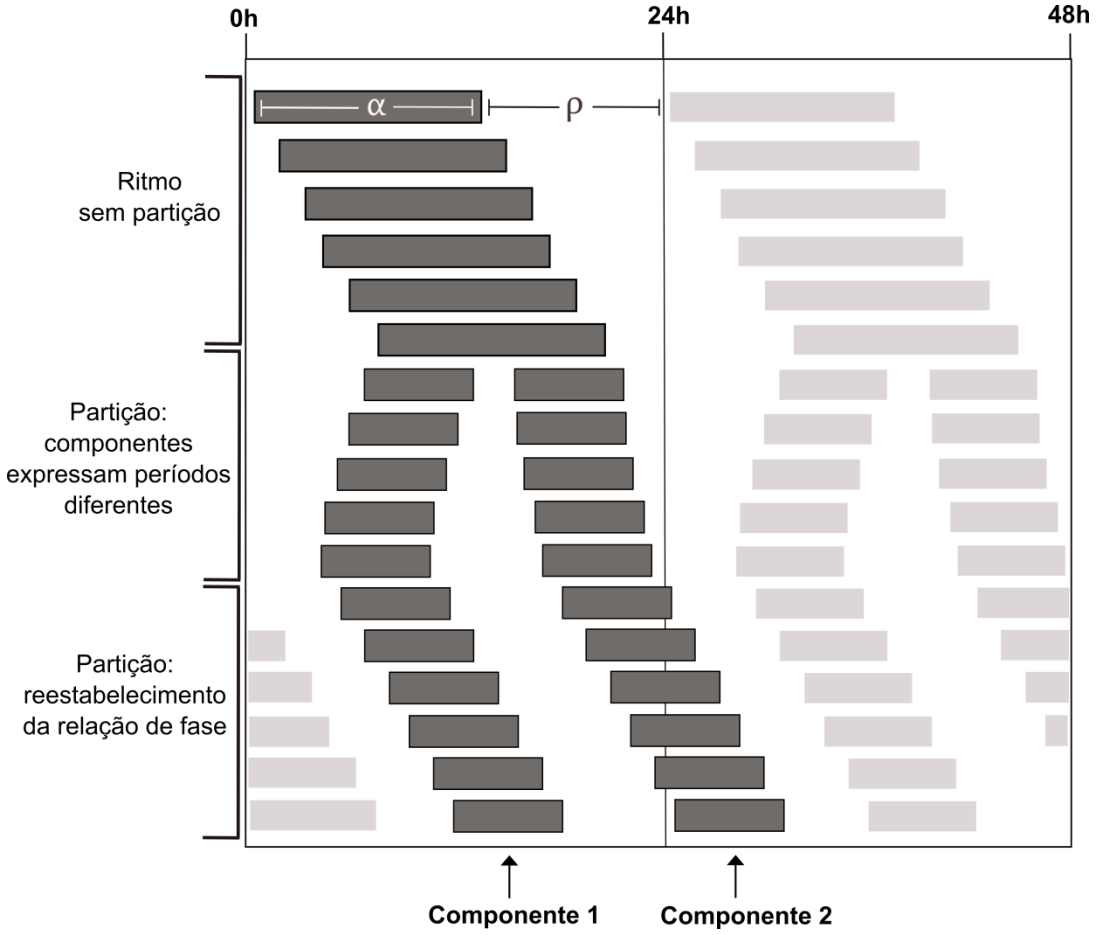

Figura 7.2. Esquema hipotético da partição de um ritmo de atividade locomotora, representado por um actograma em duplicata. No início do registro, toda atividade locomotora concentra-se em um único bloco (α), seguido de um bloco de repouso (ρ), a cada ciclo. Esse bloco dissocia-se então em dois, de forma que passam a ser visualizados dois componentes rítmicos (componente 1 e componente 2). Inicialmente, cada componente expressa um período diferente. No entanto, a partir de um determinado momento, é estabelecida uma nova relação de fase entre eles e os dois componentes passam a expressar o mesmo período.

O primeiro registro desse fenômeno, denominado partição do ritmo (também conhecido pelo seu nome em inglês, *splitting*) foi feito em esquilos do Ártico (*Spermophilus undulatus*, Sciuridae). No estudo realizado por Swade e Pittendrigh (Pittendrigh, 1960), esses esquilos foram mantidos em claro constante (CC) e observou-se que os ritmos de alguns indivíduos se partiam. Relatos similares foram feitos para outras espécies mantidas em

condições específicas de iluminação. No caso de roedores noturnos essa condição normalmente é o CC. Estudos detalhados a respeito da partição do ritmo de atividade locomotora em hamsters (*M. auratus*) descrevem a existência de diversos padrões de partição. Esses padrões diferem quanto a alterações nos valores de α e/ou de τ previamente à partição, pela dissociação abrupta ou gradual dos componentes e pelas características do reestabelecimento da relação de fase entre os componentes (Earnest e Turek, 1982; Pittendrigh e Daan, 1976b). Essa diversidade de padrões de partição foi raramente relatada para outras espécies. No entanto, estudos prévios de nosso laboratório apontaram que os tuco-tucos também apresentam, assim como os hamsters, grande variabilidade nos padrões de partição do seu ritmo de atividade locomotora (Valentinuzzi et al., 2009).

7.3.4. Mecanismo da partição de ritmos circadianos

A observação do fenômeno de partição serviu de base para que Pittendrigh e Daan (1976b) fizessem a proposição de que o ritmo de atividade locomotora é na verdade controlado por dois osciladores sincronizados entre si. Os autores deram a esses osciladores os nomes de *Evening* (E) e *Morning* (M). Cada um deles controlaria um componente da atividade, sendo que em roedores noturnos o oscilador E controlaria o componente do início da atividade e o oscilador M o componente do fim. O modelo de Pittendrigh e Daan sugere que a condição de CC altera diferencialmente propriedades de cada um desses osciladores, como seus períodos, causando a dissociação dos componentes E e M. Na maior parte dos casos, os dois osciladores eventualmente voltam a um estado de sincronização estável, porém em antifase. Ou seja, os componentes ficam separados 180º (aproximadamente 12 horas) entre si. Mais recentemente, modelagens matemáticas demonstraram que as diferenças nos parâmetros desses dois osciladores e na força de acoplamento entre eles podem explicar o surgimento dos diferentes padrões de partição observados em hamsters (Oda e Friesen, 2002)

A publicação do modelo de Pittendrigh e Daan lançou a investigação da identificação anatômica dos osciladores E e M. Como os NSQ são uma estrutura bilateral, suspeitou-se que cada núcleo (direito e esquerdo) pudesse ser um desses osciladores. Trabalhos com lesões unilateriais dos NSQ (Pickard e Turek, 1982) e estudos de expressão gênica *in vivo* (de la Iglesia *et al*., 2000) indicam que, de fato, sob condições prolongadas de claro constante e na

presença de partição da atividade, cada núcleo (direito e esquerdo) pode oscilar em antifase, e a lesão de um deles abole o fenômeno.

7.3.5. Partição de outros ritmos circadianos

Em roedores, há registros de partição dos ritmos circadianos de ingestão de água (Boulos e Terman, 1979; Shibuya *et al*., 1980), alimentação (Boulos e Terman, 1979), secreção de hormônio luteinizante (de la Iglesia *et al*., 2003), receptividade sexual (Swann e Turek , 1982; Swann e Turek , 1985) e auto-estimulação cerebral (Boulos e Terman, 1979) em condições de CC. Todos estes estudos pretendem verificar se o mesmo oscilador circadiano que controla o ritmo de atividade locomotora controla cada um desses ritmos. Apesar do ritmo de Tc ser amplamente estudado na cronobiologia, pelo nosso conhecimento apenas um estudo investigou a sua partição, paralelamente à atividade locomotora, em CC. Esse estudo, realizado por Pickard e colaboradores (1984) envolveu seis hamsters (*M. auratus*), dos quais dois apresentaram partição tanto do ritmo de atividade em roda quanto do ritmo de Tc. Os autores sugerem que esses resultados são uma evidência de osciladores comuns para os ritmos de Tc e de atividade locomotora. Salientam, no entanto, que o número de animais que apresentaram partição de seus ritmos é muito pequeno para que generalizações possam ser feitas.

7.3.6. Investigação da partição do ritmo de Tc: hipóteses a respeito do oscilador circadiano

Ao observar o padrão do ritmo circadiano de Tc de animais sob CC e compará-lo com o padrão do ritmo de atividade locomotora podemos fazer algumas assunções iniciais a respeito do oscilador responsável pela ritmicidade da Tc. Se houver partição, com o mesmo padrão, dos dois ritmos, temos uma evidência de que ritmo de Tc é controlado diretamente pelos mesmos osciladores E e M do ritmo de atividade locomotora. Se o ritmo de atividade locomotora se partir e o ritmo de Tc não, existem duas possibilidades: 1) O ritmo circadiano de Tc é controlado por um oscilador diferente daqueles que controlam o ritmo de atividade locomotora (esse oscilador pode ou não estar localizado nos NSQ); 2) apenas um dos osciladores circadianos que controla o ritmo de atividade locomotora está envolvido no controle do ritmo de Tc.

7.3. Objetivos

O experimento descrito neste capítulo teve o objetivo de estudar o rimo circadiano de Tc de tuco-tucos mantidos sob CC e compará-lo ao ritmo de atividade locomotora. Ao investigar se o ritmo de Tc apresenta partição, nessa condição luminosa, pretendemos estudar, utilizando animais neurologicamente intactos, a questão do controle do ritmo circadiano de Tc em tuco-tucos.

7.4. Métodos

Nove tuco-tucos (#46, #52, #69, #99, #100, #101, #102, #104 e #106) foram submetidos às seguintes condições: 1) CE 12:12 (início da fase de claro às 07h00) por 13 dias; 2) CC (200-300 lux) por 92 (#69, #99, #100, #102, #104 e #106), 125 (#101) ou 145 (#46 e #52) dias; 3) CE 12:12 por 14 dias. O animal #106 morreu após 105 dias em CC.

A constatação da partição foi feita principalmente através da análise visual dos actogramas, mas em alguns casos foi utilizado também o teste periodograma qui-quadrado. Além dos actogramas construídos a partir dos dados brutos, também construímos actogramas utilizando dados de Tc tratados pelo método de Weinert-Waterhouse, descrito no capítulo 6. Na descrição dos resultados, também trataremos por "α" os blocos de Tc elevada que aparecem nos actogramas, além dos blocos de atividade locomotora.

7.5. Resultados

7.5.1. Animais cujos ritmos não apresentaram partição

Dos nove animais envolvidos no experimento, apenas dois (#69 e #106) não apresentaram partição dos ritmos circadianos de Tc e de atividade locomotora (Fig. 7.3). Em um desses animais (#69), houve encurtamento de α, seguido de um brusco encurtamento de τ. Esse encurtamento ocorreu após 15 dias em CC e a partir de então o período se manteve estável até o animal ser novamente exposto ao ciclo de CE. No outro animal que não apresentou partição (#106), o período se tornou mais longo após aproximadamente 40 dias em CC. Nas duas semanas que precederam a sua morte (que ocorreu após 105 dias em CC), esse tuco-tuco se tornou arrítmico.

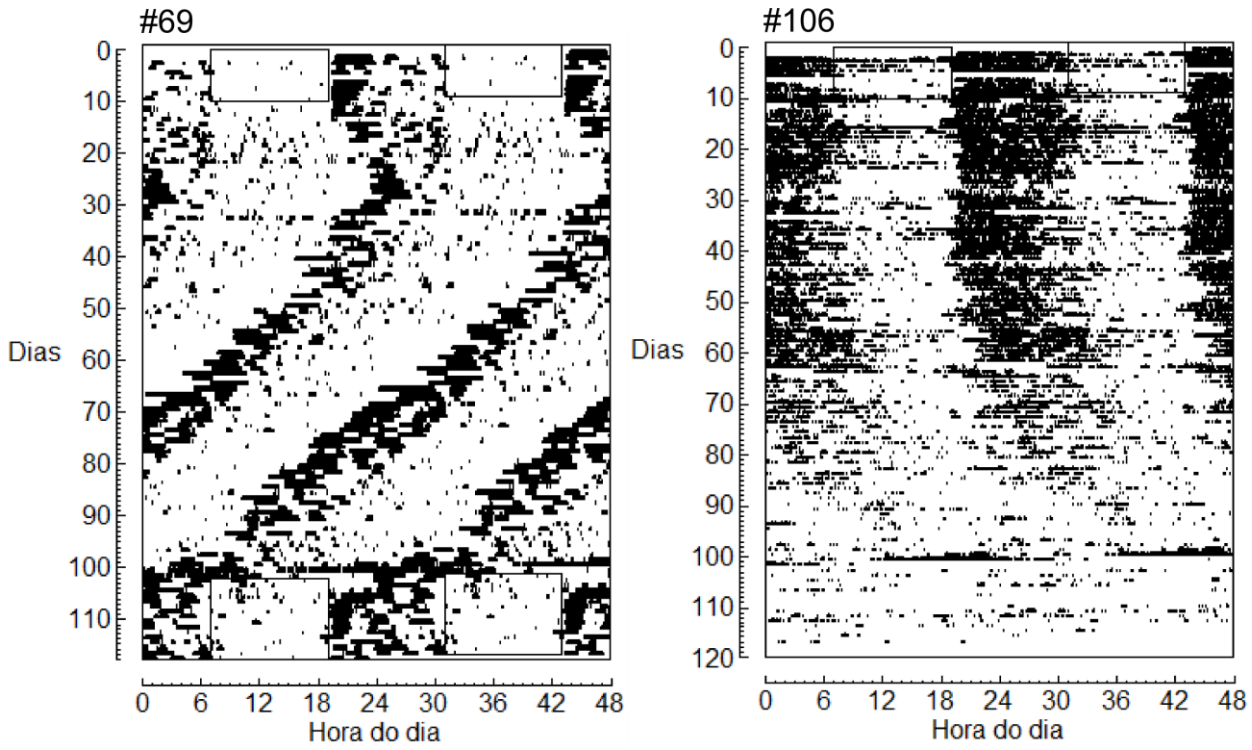

Figura 7.3. Actogramas em duplicata da Tc dos dois animais cujos ritmos de Tc e de atividade locomotora não apresentaram partição. Os retângulos representam a fase de claro durante o ciclo de CE. A região sem retângulos do actogramas são aquelas nas quais os animais estavam sob CC.

7.5.2. Animais cujos ritmos de Tc e de atividade locomotora apresentaram o mesmo padrão de partição

A partição dos ritmos circadianos de Tc e de atividade locomotora ocorreu em sete tuco-tucos. Desses, em seis (#46, #99, #100, #101, #102 e #104) os padrões apresentados pelos dois ritmos foram idêntico, como observado nos actogramas (Fig. 7.4). Os resultados do teste Periodograma Qui-quadrado (Fig. 7.5) também foram muito similares para os dois ritmos, em todos os seis animais. Em geral, os gráficos obtidos por esse teste mostram dois picos significativos, sendo que o valor do período correspondente ao menor deles é metade do período equivalente ao outro pico. Isso indica a existência de dois componentes rítmicos que se expressam com o mesmo período, e têm uma relação de fase entre eles equivalente à metade desse período, como pode ser observado nos actogramas.

Dentre esses animais, observamos uma grande variabilidade de padrões. Em três animais (#46, #100 e #104) a partição ocorreu de forma gradual. Um indivíduo(#100) apresentou encurtamento do período antes da divisão em dois componentes rítmicos. Após a partição, no entanto, os dois novos componentes apresentaram um τ mais longo. Já em outro animal (#104) o período se alongou previamente à partição, mas os dois novos componentes

apresentaram τ mais curtos do que o prévio. No terceiro animal (#46), os ritmos se partiram somente a partir do dia 120 e não houve mudança no τ que precedeu a partição, que por sua vez foi expresso pelos dois novos componentes rítmicos.

Dos três animais nos quais a partição ocorreu de forma abrupta (#101, #102 e #104), em um indivíduo (#102) ela ocorreu imediatamente após a transição do CE para o CC. Os dois componentes persistiram por aproximadamente 15 dias, quando um dos componentes de dividiu em mais dois, dos quais um se refundiu com o outro componente que surgiu após a transição para CC. O outro novo componente, por sua vez, se partiu em mais dois. Dessa forma, por 40 dias pudemos observar a presença de três componentes no ritmo desse animal. Após esse tempo, dois desses componentes se refundiram.

No animal #99 a partição foi abruta e precedida pelo encurtamento de α. Após a partição o α. dos dois componentes se expandiram. No animal #101, a partição ocorreu apenas 15 dias após o início do CC, precedida de encurtamento de α. O τ não se alterou nem antes nem depois da partição.

7.5.3. Diferença entre os padrões dos ritmos de Tc e de atividade locomotora em um indivíduo

O indivíduo (#52), ao contrário dos outros animais, apresentou diferenças no padrão do ritmo de Tc em relação ao do ritmo de atividade locomotora. Nesse tuco-tuco, até o dia 61 havia uma diminuição marcada de τ nos dois ritmos, acompanhada do encurtamento de α, que desapareceu completamente no dia 62. Ao mesmo tempo, um novo componente emergiu com uma diferença de fase de 12 horas, evidenciando a ocorrência da partição. Esse novo componente foi visualizado tanto no ritmo de Tc quanto no de atividade locomotora por aproximadamente 10 dias. No entanto, a partir do dia 72, ele se tornou muito tênue, enquanto o componente presente antes da partição ressurgiu. Curiosamente, o ritmo de Tc apresentou, ainda, um terceiro componente, com um τ de 25,2 horas, que não foi detectado (nem visualmente e nem pelo teste Periodograma Qui-uadrado) no ritmo de atividade locomotora (Fig. 7.6). Esse componente desapareceu por volta do dia 105, quando se fundiu ao primeiro componente.

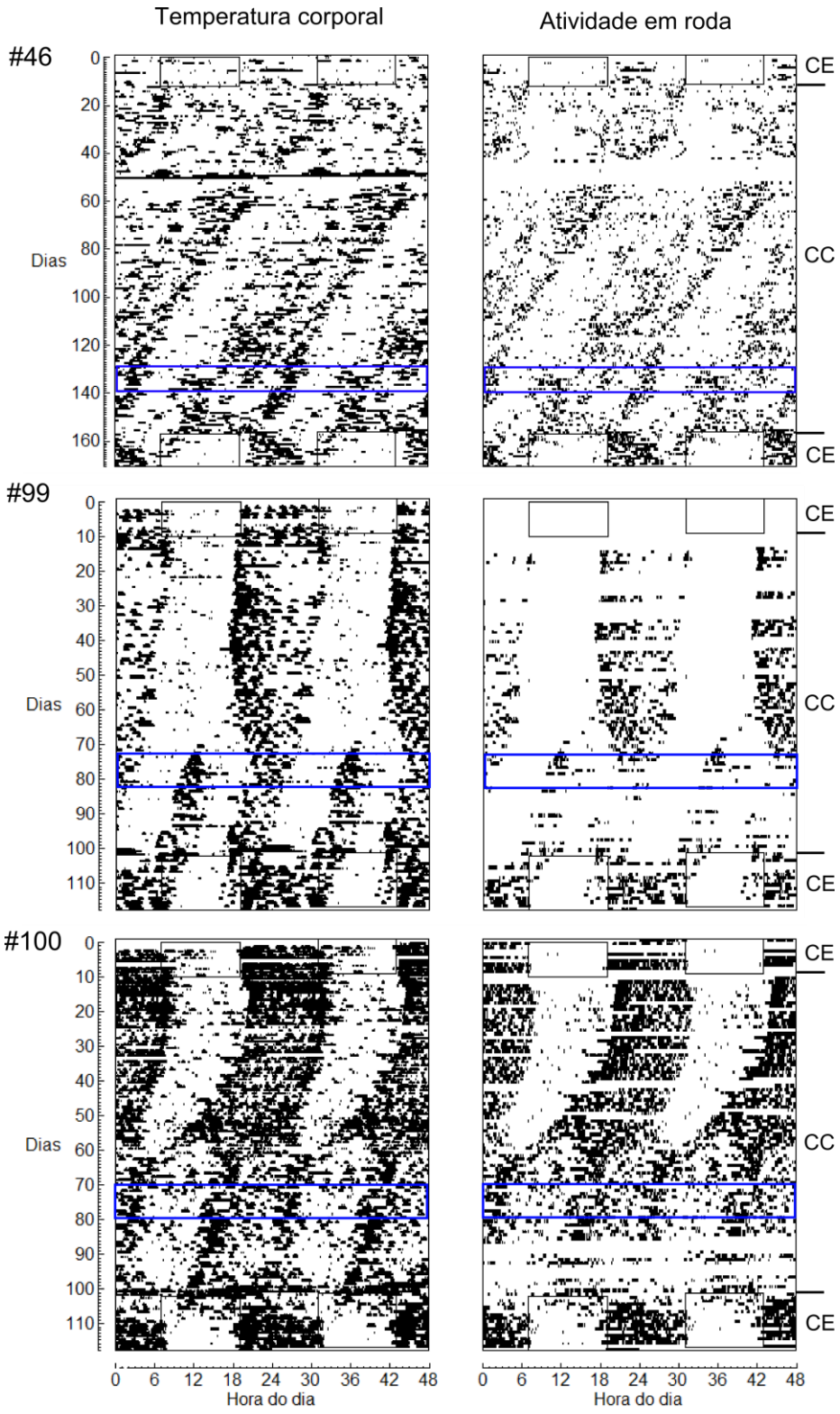

Figura 7.4. Actogramas em duplicata da Tc e da atividade em roda de seis animais cujos ritmos de Tc e de atividade locomotora apresentaram partição. Os retângulos representam a fase de claro durante o ciclo de CE. A região sem retângulos do actogramas são aquelas nas quais os animais estavam sob CC. Os retângulos azuis marcam os trechos que foram utilizados para a aplicação do teste Periodograma Qui-Quadrado (Fig. 7.5.)

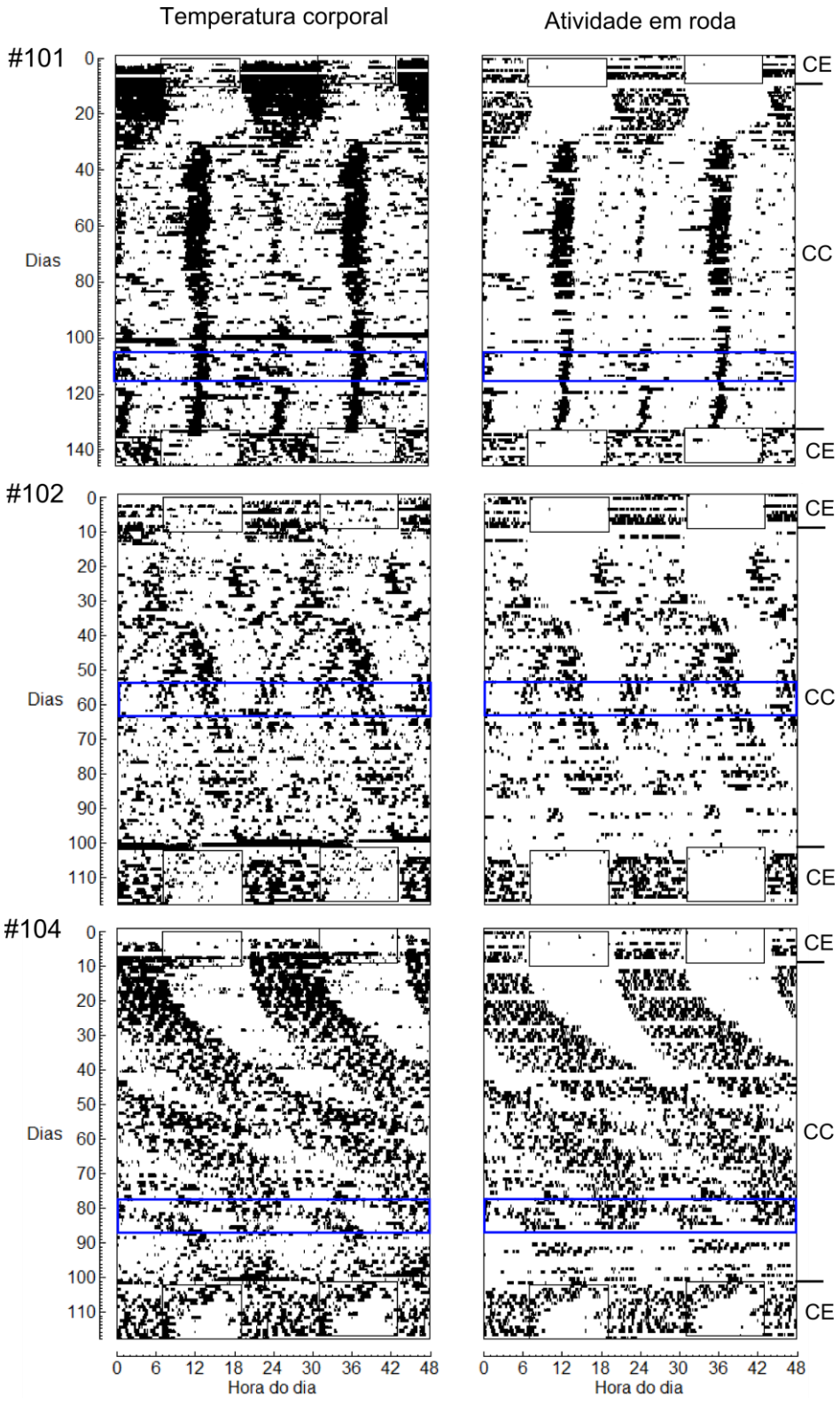

Figura 7.4. Continuação.

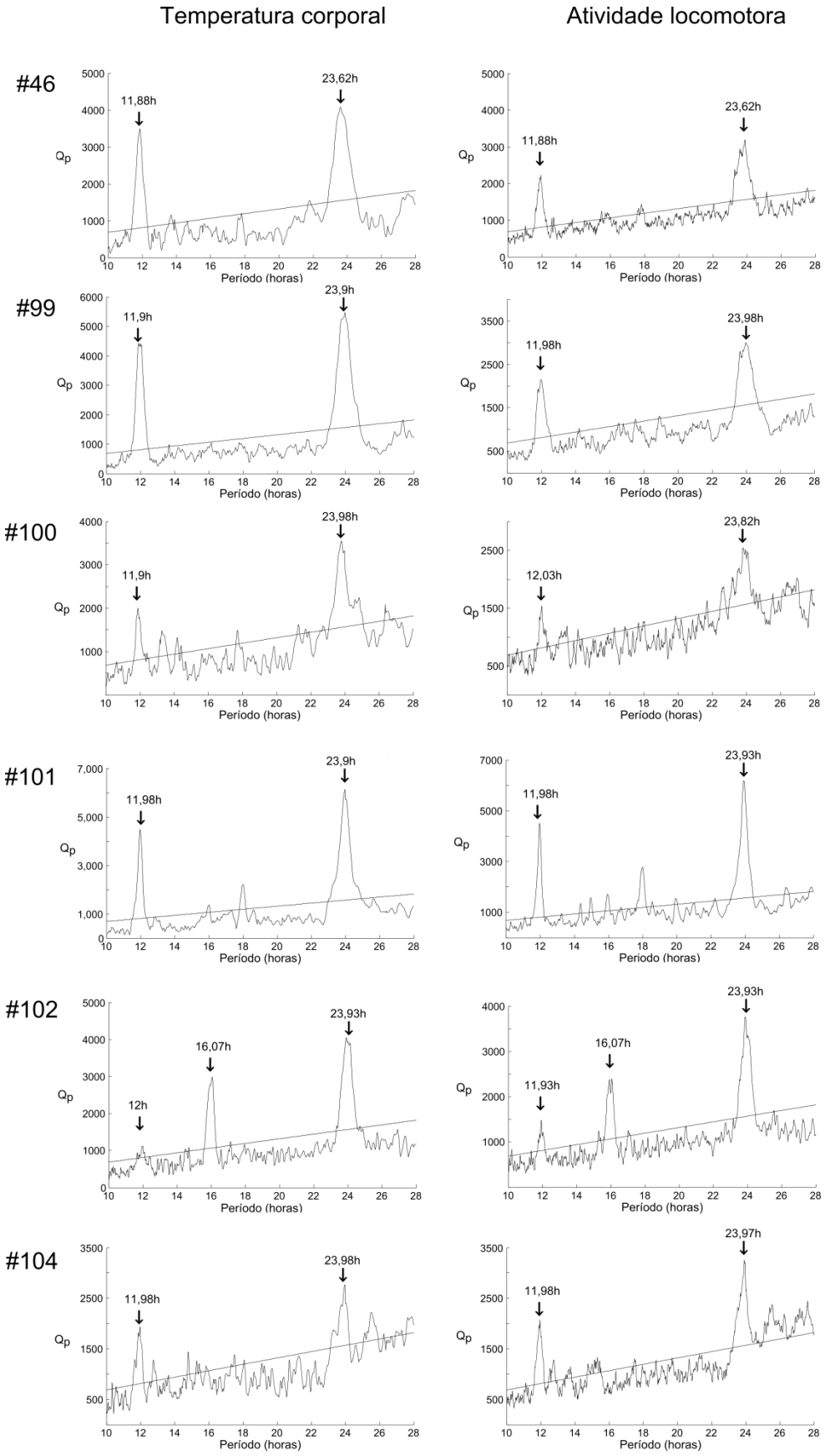

Figura 7.5. Gráficos do teste Periodograma Qui-Quadrado para os ritmos de Tc (esquerda) e de atividade em roda (direita), realizados utilizando-se os trechos marcados pelos retângulos azuis na figura. 7.4. As setas indicam os períodos dados como significativos pelo teste e que também foram identificados visualmente nos actogramas.

7.5.4. Actogramas dos dados tratados pelo método de Weinert-Waterhouse

Além dos actogramas com os dados brutos de Tc, construímos também actogramas dos dados de Tc tratados pelo método de Weinert-Waterhouse (Fig. 7.7). Com isso, tínhamos o objetivo de observar o ritmo circadiano de Tc sem os efeitos agudos causados pela atividade locomotora, facilitando, assim a distinção entre os dois ritmos. No entanto, enfrentamos alguns problemas quanto à apresentação dos dados tratados nos actogramas. Isso porque houve diminuição da amplitude dos ritmos após o tratamento, exigindo que utilizássemos uma faixa de limites (Fig. 2.3) muito estreita de valores de Tc para representação no actograma, o que dificultou a visualização dos gráficos. Aperfeiçoamentos na aplicação do método de Weinert-Waterhouse e na própria construção dos actogramas serão feitas no futuro para contornar esse problema.

7.6. Discussão

Os resultados aqui apresentados demonstram que o ritmo circadiano de Tc exibe partição na maioria dos indivíduos de *Ctenomys* aff. *knighti* mantidos em CC. Em todos os casos em que o ritmo de Tc se partiu, o mesmo fenômeno foi observado no ritmo de atividade locomotora. Nossos dados reforçam a constatação feita em um estudo prévio de nosso laboratório de que os ritmos dos tuco-tucos apresentam uma notável diversidade de padrões de partição (Valentinuzzi, 2009). Esses padrões assemelham-se aos descritos tanto para os hamsters (Earnest e Turek, 1982; Pittendrigh e Daan, 1976b) quanto para mamíferos diurnos, como o esquilo do Ártico (Pittendrigh, 1960) e o mussaranho-arborícola *Tupaia belangeri* (Tupaiidae) (Hoffmann, 1971; Meijer et al., 1990).

Na maioria dos indivíduos, as características dos ritmos de Tc e de atividade locomotora em CC foram idênticas, independente do tipo de padrão de partição apresentado. Esse fato sugere que os dois ritmos são controlados pelos mesmos osciladores, E e M, que se dissociam quando há exposição contínua à luz. Uma vez que os dois componentes partidos de atividade locomotora são considerados controlados, respectivamente, pelos osciladores localizados nos NSQ direito e esquerdo, nossos resultados podem ser acrescentados à lista de evidências que sugerem que o controle do ritmo circadiano de Tc ocorre nos NSQ.

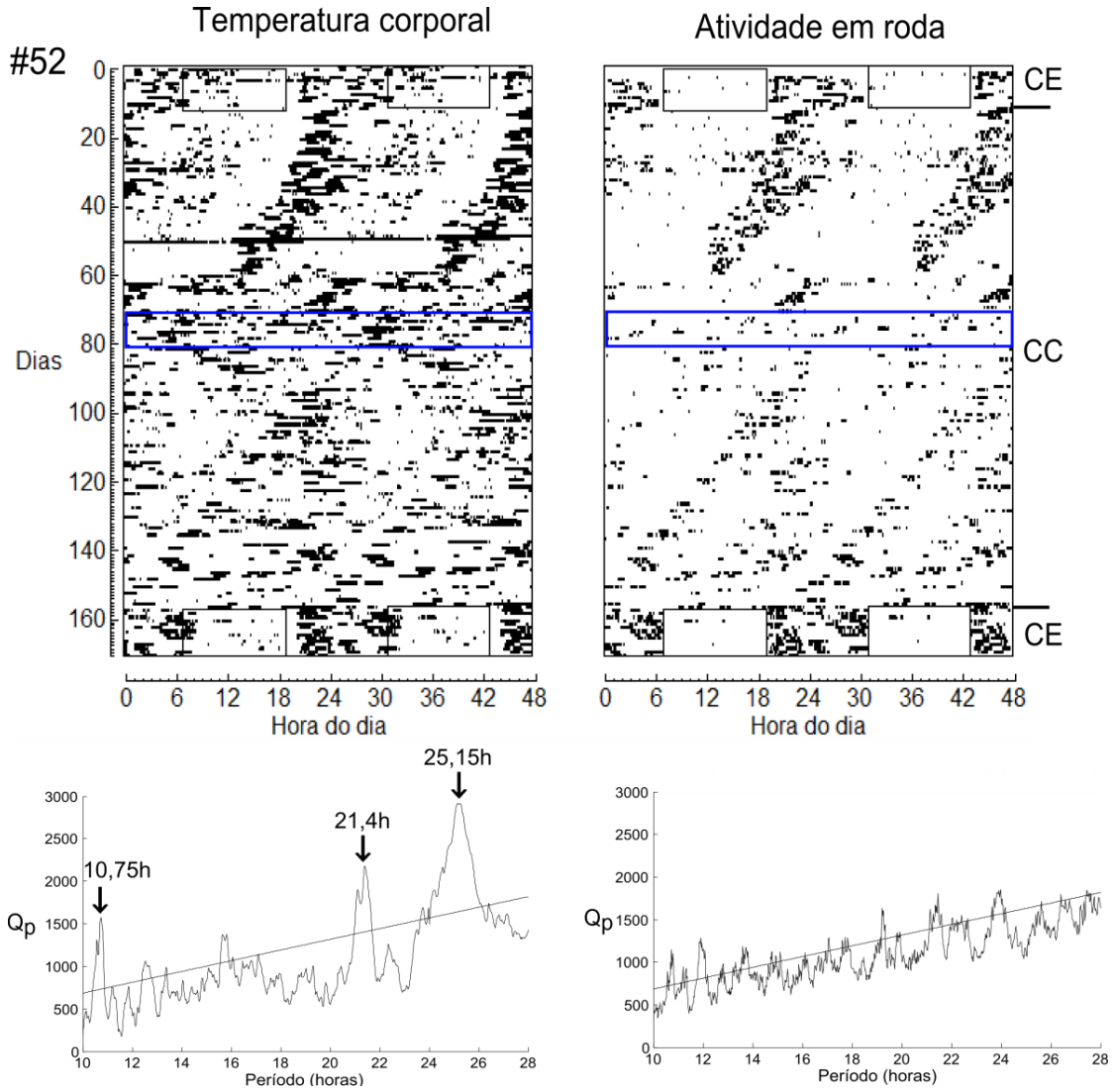

Figura 7.6. Painel superior: Actogramas em duplicata da Tc (esquerda) e da atividade em roda (direita) do animal #52. Os retângulos representam a fase de claro durante o ciclo de CE. A região sem retângulos do actogramas são aquelas nas quais os animais estavam sob CC. Os retângulos azuis marcam os trechos que foram utilizados para a aplicação do teste Periodograma Qui-Quadrado. **Painel inferior:** Gráficos do teste Periodograma Qui-Quadrado para os ritmos de Tc (esquerda) e de atividade em roda (direita), realizados utilizando-se os trechos marcados pelos retângulos azuis na figura. 7.4. As setas indicam os períodos dados como significativos pelo teste e que também foram identificados visualmente nos actogramas. O gráfico do Períodograma do ritmo de atividade em roda não acusou nenhum período significativo para o ritmo de atividade em roda durante os dias testados.

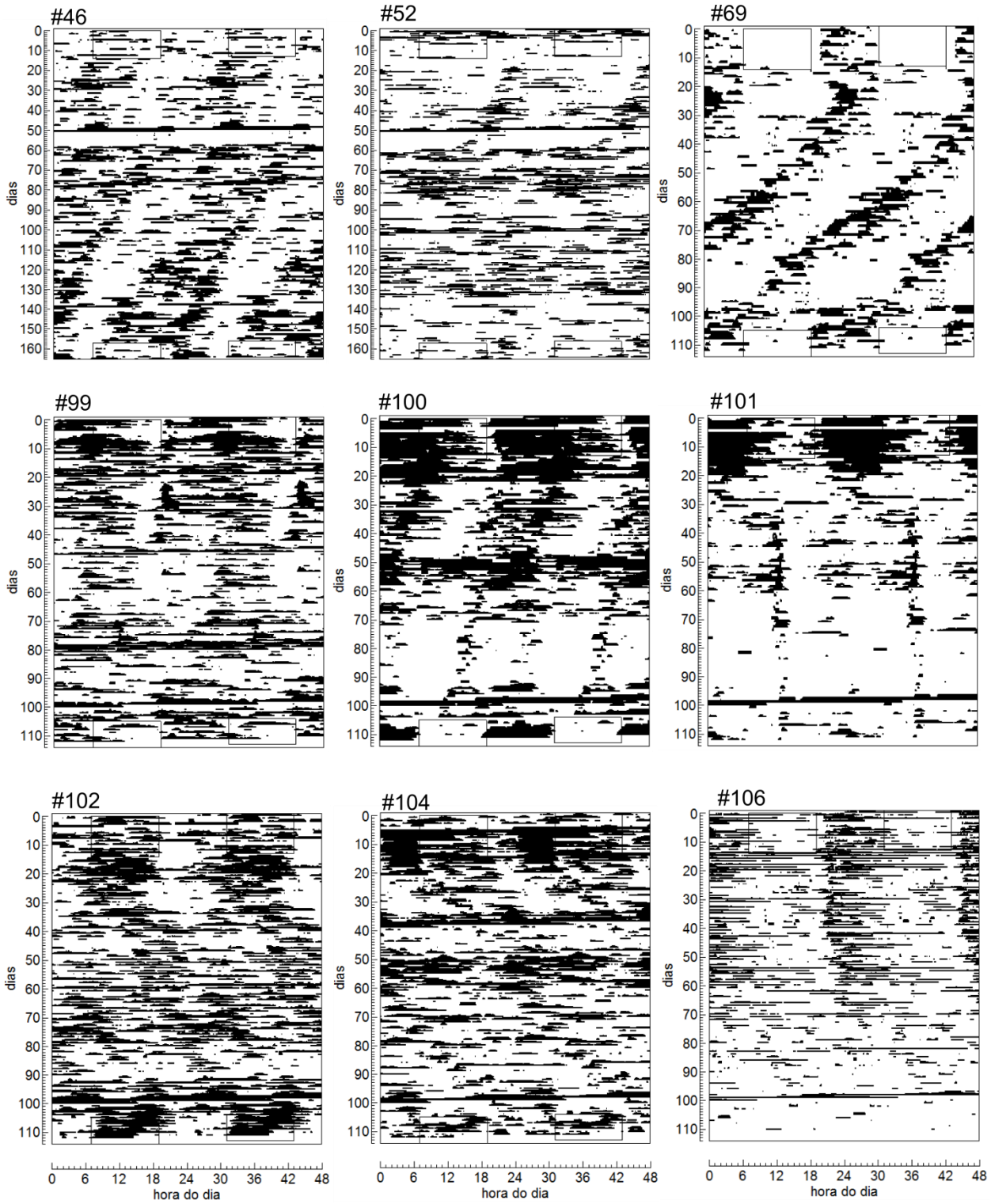

Figura 7.7. Actogramas em duplicata dos dados de Tc tratados pelo método de Weinert-Waterhouse (Capítulo 6) dos nove tuco-tucos envolvidos no experimento. Os retângulos representam a fase de claro durante o ciclo de CE. A região sem retângulos do actogramas são aquelas nas quais os animais estavam sob CC.

Não podemos ignorar, no entanto, o fato de um tuco-tuco (#52) ter apresentado um componente extra no ritmo de Tc, que não foi identificado no ritmo de atividade locomotora. O surgimento desse novo componente indica que pode haver mais um oscilador envolvido no controle do ritmo circadiano de Tc. Embora não possamos descartar a possibilidade desse terceiro oscilador circadiano se encontrar em outra região do organismo, é possível que ele se localize dentro dos próprios NSQ.

Uma especulação a esse respeito pode ser feita com base nos resultados de estudos sobre "dessincronização interna forçada". Um desses trabalhos sugere que diferenças nos padrões dos ritmos de Tc e de atividade locomotora, observadas durante a execução do protocolo experimental, pode estar relacionada à dessincronização dos NSQvl e NSQdm, sendo que os autores sugerem que o ritmo de Tc deva ser controlado pelo NSQdm (Cambras al., 2007). Sabe-se que a condição de CC pode levar à dessincronização das células dos NSQ *in vitro* e que isso pode explicar alguns dos padrões rítmicos observados em animais mantidos nessas condições (Ohta et al., 2005). Embora a exposição dos tuco-tucos a CC normalmente resulte na dissociação dos osciladores E e M (ou seja, dos NSQ direito e esquerdo), com a emergência de dois componentes rítmicos durante a partição, é possível que em alguns casos a "desorganização" dos NSQ seja maior, e que outros osciladores também se dissociem. Podemos hipotetizar que no animal #52 tenha ocorrido a dissociação de mais um dos múltiplos osciladores dos NSQ, resultando na emergência do componente extra. Esse novo oscilador dissociado estaria envolvido no controle da Tc, mas não da atividade locomotora e estaria possivelmente relacionado ao NSQdm, segundo as indicações dos estudos com dessincronização forçada (Cambras et al., 2007).

CONCLUSÕES

Neste trabalho, verificamos que, ao menos em condições de laboratório, a Tc de *Ctenomys* aff. *knighti* apresenta ritmicidade circadiana. A endogenicidade desse ritmo é comprovada pela sua persistência em condições constantes, com período sempre diferente de 24 horas. Quando os animais são expostos a um ciclo de CE, há sincronização do ritmo de Tc, por arrastamento. Nessa situação, todos os tuco-tucos apresentam um padrão rítmico típico de um animal noturno, com valores de Tc mais elevados concentrados na fase de escuro. Os resultados dessa caracterização cronobiológica sugerem que a variabilidade interindividual de padrões rítmicos da Tc apresentados pelos tuco-tucos é muito menor do que a apresentada por outros roedores subterrâneos (Goldman et al., 1997; Lovegrove e Heldmaier, 1994; Lovegrove a Muir, 1996) à semelhança do que havia sido previamente relatado para o ritmo de atividade locomotora (Valentinuzzi et al., 2009).

O ritmo circadiano de Tc mostrou-se fortemente associado, no tempo, ao ritmo de atividade locomotora. Esse fato nos motivou a investigar qual é a participação dos efeitos agudos da atividade locomotora na ritmicidade da Tc. Em um primeiro momento, estudamos como a atividade em roda modula a amplitude do ritmo de Tc e constatamos que, ao contrário do que já foi relatado para outros roedores, a amplitude do ritmo de Tc em tuco-tucos é pouco afetada pela retirada da roda. Uma análise comportamental revelou que mesmo na ausência da roda de atividade os animais exibem comportamentos que podem causar aumentos agudos de Tc. Esse fato pode explicar, ao menos em parte, a razão da amplitude apresentar apenas pequenas diferenças quando o ritmo de Tc é medido na presença ou na ausência da roda de atividade.

Como a remoção da roda não permitiu que uma análise quantitativa dos efeitos agudos da atividade locomotora na Tc fosse realizada, utilizamos um método estatístico para quantificar e filtrar esses efeitos. Mesmo após a remoção dos aumentos agudos da Tc decorrentes da atividade locomotora, ainda é possível observar um ritmo circadiano de Tc, evidenciando a existência independente desse ritmo. Constatamos, ainda, que a sensibilidade da Tc à atividade locomotora varia ao longo do dia, sendo essa dependência devida, provavelmente, aos ritmos circadianos de produção e de dissipação de calor, que apresentam valores máximos em horários diferentes do dia. Nesse sentido, observamos que a mesma quantidade de atividade locomotora leva a um maior aumento de Tc no início da fase de claro, enquanto no meio da fase de claro a elevação da Tc é praticamente nula.

Por fim, o ritmo de Tc exibiu, na maioria dos animais expostos a CC, os mesmos padrões de partição que o ritmo de atividade locomotora. Esse fato sugere que os dois ritmos são controlados pelos mesmos osciladores circadianos, localizados nos NSQ. Contudo, a emergência de um componente rítmico exclusivo do ritmo de Tc em um dos animais sugere que o controle desses ritmos pode ser ainda mais complexo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abe K, Kroning J, Greer M, Critchlow V (1979) Effects of destruction of the suprachiasmatic nuclei on the circadian rhythms in plasma corticosterone, body temperature, feeding and plasma thyrotropin. Neuroendocrinology 29 (2):119-131

Abraham E, del Valle HF, Roig F, Torres L, Ares JO, Coronato F, Godagnone R (2009) Overview of the geography of the Monte Desert biome (Argentina). Journal of Arid Environments 73 (2):144-153

Abrahamson EE, Moore RY (2001) Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. Brain Research 916 (1-2):172-191

Aldemir H, Atkinson G, Cable T, Edwards B, Waterhouse J, Reilly T (2000) A comparison of the immediate effects of moderate exercise in the early morning and late afternoon on core temperature and cutaneous thermoregulatory mechanisms. Chronobiology International 17 (2):197-207

Aschoff J (1960) Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 25:11-28

Aschoff J (1965) Circadian rhythms in man. Science 148:1427-1432

Aschoff J (1982) The circadian rhythm of body temperature as a function of body size. In: Taylor CR, Johansen K, Bolis L (eds) A Companion to Animal Physiology. Cambridge University Press, New York, pp 173-188

Aschoff J (1983) Circadian control of body temperature. Journal of Thermal Biology 8 (1-2):143-147

Aschoff J, Heise A (1972) Thermal conductance in man: its dependence on time of day and ambient temperature. In: Itoh S, Ogata K, Yoshimura H (eds) Advances in Climatic Physiolology. Springer-Verlag, New York, pp 334-348

Aschoff J, Klotter K, Wever R (1965) Circadian vocabulary. In: Circadian clocks. North-Holland Pub. Co. , Amsterdam, pp 10-19

Aschoff J, Wever R (1981) The circadian system of man. In: Aschoff J (ed) Handbook of behavioral neurobiology, vol 4. Plenum Publishing Corporation, Londres, pp 311-331

Ayada K, Tadano T, Endo Y (2002) Gnawing behavior of a mouse in a narrow cylinder: a simple system for the study of muscle activity, fatigue, and stress. Physiology & Behavior 77 (1):161-166

Baker HD, Ryder EA, Baker NH (1975) Temperature measurement in engineering, vol 2. Omega Press, Stamford

Bartness TJ, Song CK, Demas GE (2001) SCN efferents to peripheral tissues: implications for biological rhythms. Journal of Biological Rhythms 16 (3):196-204

Begall S, Daan S, Burda H, Overkamp GJF (2002) Activity patterns in a subterranean social rodent, *Spalacopus cyanus* (Octodontidae). Journal of Mammalogy 83 (1):153-158

Ben-Shlomo R, Ritte U, Nevo E (1995) Activity pattern and rhythm in the subterranean mole rat superspecies *Spalax ehrenbergi*. Behavior genetics 25 (3):239-245

Bicego KC, Barros RCH, Branco LGS (2007) Physiology of temperature regulation: comparative aspects. Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology 147 (3):616-639

Bloch M (1964) Rhythmic diurnal variation in limb blood flow in man. Nature 202:398-399

Boulos Z, Terman M (1979) Splitting of circadian rhythms in the rat. Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology 134 (1):75-83

Buffenstein R (2000) Ecophysiological responses of subterranean rodents to underground habitats. In Life Underground: the biology of subterranean rodents. In: Lacey EA, Patton JL, Cameron

GN (eds) Life Underground: the biology of subterranean rodents. The University of Chicago Press, Chicago, pp 62-110

Burda H, Sumbera R, Begall S (2007) Microclimate in burrows of subterranean rodents - Revisited. In: Begall S, Burda H, Schleich CE (eds) Subterranean rodents: news from underground. Springer-Verlag, Heidelberg, pp 21-23

Busch C (1989) Metabolic rate and thermoregulation in two species of tuco-tuco, *Ctenomys talarum* and *Ctenomys australis* (Caviomorpha, Octodontidae). Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology 93 (2):345-347

Cabanac A, Briese E (1992) Handling elevates the colonic temperature of mice. Physiology & Behavior 51 (1):95-98

Cabanac M (2011) The place of behavior in physiology. In: Comprehensive Physiology. John Wiley & Sons, Inc.

Cambras T, Weller JR, Anglès-Pujoràs M, Lee ML, Christopher A, Díez-Noguera A, Krueger JM, De La Iglesia HO (2007) Circadian desynchronization of core body temperature and sleep stages in the rat. Proceedings of the National Academy of Sciences 104 (18):7634

Comparatore VM, Cid MS, Busch C (1995) Dietary preferences of two sympatric subterranean rodent populations in Argentina. Revista Chilena de Historia Natural 68:197-206

Daan S (2010) A history of chronobiological concepts. Protein Reviews 12:1-35.

Darwin C, Darwin F (1880) The power of movement in plants. Kessinger Publishing, Whitefish

de Castro JM (1978) Diurnal rhythms of behavioral effects on core temperature. Physiology & Behavior 21 (6):883-886

de la Iglesia H, Meyer J, Caprino Jr A, Schwartz W (2000) Antiphase oscilations of the left an right suprachiasmatic nuclei. Science 290:799-801

de la Iglesia HO, Meyer J, Schwartz WJ (2003) Lateralization of circadian pacemaker output: activation of left- and right-sided luteinizing hormone-releasing hormone neurons involves a neural rather than a humoral pathway. The Journal of Neuroscience 23 (19):7412-7414

De Vries J, Strubbe JH, Wildering WC, Gorter JA, Prins AJA (1993) Patterns of body temperature during feeding in rats under varying ambient temperatures. Physiology & Behavior 53 (2):229-235

DeCoursey PJ (1960) Phase Control of Activity in a Rodent. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 25:49-55

Decoursey PJ, Pius S, Sandlin C, Wethey D, Schull J (1998) Relationship of circadian temperature and activity rhythms in two rodent species. Physiology & Behavior 65 (3):457-463

Dunlap JC, Loros JJ, DeCoursey PJ (2004) Chronobiology: Biological timekeeping. Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts

Earnest DJ, Turek FW (1982) Splitting of the circadian rhythm of activity in hamsters: Effects of exposure to constant darkness and subsequent re-exposure to constant light. Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology 145 (3):405-411

Eastman CI, Mistlberger RE, Rechtschaffen A (1984) Suprachiasmatic nuclei lesions eliminate circadian temperature and sleep rhythms in the rat. Physiology & Behavior 32 (3):357-368

Eberli P, Gebhardt-Henrich SG, Steiger A (2011) The influence of handling and exposure to a ferret on body temperature and running wheel activity of golden hamsters (*Mesocricetus auratus*). Applied Animal Behaviour Science 131 (3–4):131-137

Enright J (1970) Ecological Aspects of Endogenous Rhythmicity. Annual Review of Ecology and Systematics 1:221-238

Flôres D (2011) Sincronização fótica de um roedor subterrâneo: um estudo cronobiológico de campo e de laboratório do tuco-tuco (*Ctenomys* cf. *knighti*). Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo,

Foster RG, Kreitzman L (2005) Rhythms of life: The biological clocks that control the daily lives of every living thing. Yale University Press, New Haven

Fuller CA, Lydic R, Sulzman FM, Albers HE, Tepper B, Moore-Ede MC (1981) Circadian rhythm of body temperature persists after suprachiasmatic lesions in the squirrel monkey. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology 241 (5):R385-R391

Geiser F (2004) Metabolic rate and body temperature reduction during hibernation and daily torpor. Annual Review of Physiology 66:239-274

Goldman BD, Goldman SL, Riccio AP, Terkel J (1997) Circadian Patterns of Locomotor Activity and Body Temperature in Blind Mole-Rats, *Spalax ehrenbergi*. Journal of Biological Rhythms 12 (4):348-361

Golombek DA, Ortega G, Cardinali DP (1993) Wheel running raises body temperature and changes the daily cycle in golden hamsters. Physiology & Behavior 53 (6):1049-1054

Haim A, Zisapel N (1999) Daily rhythms of nonshivering thermogenesis in common spiny mice *Acomys cahirinus* under short and long photoperiods. Journal of Thermal Biology 24 (5-6):455-459

Halberg F, Halberg E, Barnum C, Bittner JJ (1959) Physiologic 24-hour periodicity in human beings and mice, the lighting regimen and daily routine. In: Photoperiodism and related phenomena in plants and animals, vol 55. American Association for the Advancement of Science, Washington, DC, pp 803-878

Harri M, Lindblom J, Malinen H, Hyttinen M, Lapvetelainen T, Eskola S, Helminen HJ (1999) Effect of access to a running wheel on behavior of C57BL/6J mice. Comparative Medicine 49 (4):401-405

Herzog ED, Takahashi JS, Block GD (1998) Clock controls circadian period in isolated suprachiasmatic nucleus neurons. Nature neuroscience 1 (8):708-713

Himms-Hagen J (1985) Brown adipose tissue metabolism and thermogenesis. Annual review of nutrition 5 (1):69-94

Hochachka PW, Somero GN (2002) Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological evolution. Oxford University Press, Oxford

Hoffmann K (1971) Splitting of the circadian rhythm as a function of light intensity. In: Menaker M (ed) Biochronometry. National Academy Press, Washington, DC, pp 134-150

IUPS Thermal Commission (2001) Glossary of terms for thermal physiology. The Japanese Journal of Physiology 51 (2):245-280

Kas MJH, Edgar DM (1999) A nonphotic stimulus inverts the diurnal–nocturnal phase preference in *Octodon degus*. The Journal of Neuroscience 19 (1):328-333

Khansari DN, Murgo AJ, Faith RE (1990) Effects of stress on the immune system. Immunology Today 11 (0):170-175

Kittrell EMW (1991) The suprachiasmatic nucleus and temperature rhythms. In: Klein DC, Moore RY, SM R (eds) Suprachiasmatic Nucleus: The Mind's Clock. Oxford University Press, Oxford, pp 233-245

Lacey EA, Patton JL, Cameron GN (2000) Life underground: the biology of subterranean rodents. University of Chicago Press, Chicago

Li H, Satinoff E (1998) Fetal tissue containing the suprachiasmatic nucleus restores multiple circadian rhythms in old rats. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology 275 (6):R1735-R1744

Lovegrove B, Heldmaier G (1994) The amplitude of circadian body temperature rythms in three rodents (*Aethomys namaquensis*, *Tallomys paedulcus* and *Cryptomys damarensis*) along an arboreal-subterranean gradient. Journal of Zoology 42:65-78

Lovegrove B, Muir A (1996) Circadian body temperature of the solitary cape mole rat *Georychus capensis*. Physiology & Behavior 60 (3):991-998

Luna F, Antenucci CD, Bozinovic F (2009) Comparative Energetics of the Subterranean *Ctenomys* Rodents: Breaking Patterns. Physiological and Biochemical Zoology 82 (3):226-235

Luna F, Antinuchi CD (2007) Energetics and thermoregulation during digging in the rodent tuco-tuco (*Ctenomys talarum*). Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology 146 (4):559-564

Luna F, Antinuchi CD, Busch C (2002) Digging energetics in the South American rodent *Ctenomys talarum* (Rodentia, Ctenomyidae). Canadian Journal of Zoology 80 (12):2144-2149

MacMillen RE, Trost CH (1967) Nocturnal hypothermia in the Inca dove, *Scardafella inca*. Comparative Biochemistry and Physiology 23 (1):243-253

Mansberg H, Hendler E (1963) A precision multichannel body temperature measurement system. In: Hardy J (ed) Temperature: its measurement and control in science and industry. Part 3: biology and medicine., vol 3. Reinhold Publishing Corporation., New York, pp 13-19

Marques MD, Golombek D, Moreno C (2003) Adaptação temporal. In: Marques N, Menna-Barreto L (eds) Cronobiologia: Princípios e aplicações. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo,

McNab BK (1966) The metabolism of fossorial rodents: a study of convergence. Ecology 47 (5):712-733

Meijer J, Daan S, Overkamp G, Hermann P (1990) The two-oscillator circadian system of tree shrews (*Tupaia belangeri*) and its response to light and dark pulses. Journal of Biological Rhythms 5 (1):1-16

Minors DS, Waterhouse JM (1984) The use of constant routines in unmasking the endogenous component of human circadian rhythms. Chronobiology International 1 (3):205-216.

Mohawk JA, Takahashi JS (2011) Cell autonomy and synchrony of suprachiasmatic nucleus circadian oscillators. Trends in neurosciences 34 (7):349-358

Moore-Ede M, Sulzman F, Fuller C (1982) The clocks that time us: physiology of the circadian timing system. Commonwealth Fund Publications. Harvard University Press.,

Moore RY, Eichler VB (1972) Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. Brain Research 42 (1):201-206.

Moore RY, Lenn NJ (1972) A retinohypothalamic projection in the rat. The Journal of Comparative Neurology 146 (1):1-14

Mrosovsky N (1990) Rheostasis: the physiology of change. Oxford University Press, New York

Nevo E (1979) Adaptive convergence and divergence of subterranean mammals. Annual Review of Ecology and Systematics 10:269-308

Oda GA, Friesen WO (2002) A model for "splitting" of running-wheel activity in hamsters. Journal of Biological Rhythms 17 (1):76-88

Oosthuizen MK, Cooper HM, Bennett NC (2003) Circadian rhythms of locomotor activity in solitary and social species of African mole-rats (family: Bathyergidae). Journal of Biological Rhythms 18 (6):481-490

Page TL (1989) Masking in invertebrates. Chronobiology International 6 (1):3-11

Pickard G, Kahn R, Silver R (1984) Splitting of the circadian rhythm of body temperature in golden hamster. Physiology & Behavior 32:763-766.

Pittendrigh CS (1954) On temperature independence in the clock system controlling emergence time in *Drosophila*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 40 (10):1018-1029

Pittendrigh CS (1960) Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 25:159-184. doi:10.1101/sqb.1960.025.01.015

Pittendrigh CS, Daan S (1976a) A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. IV. Entrainment: pacemaker as clock. Journal of Comparative Physiology A 106:291 -331

Pittendrigh CS, Daan S (1976b) A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents: V. Pacemaker structure: A clock for all seasons. Journal of Comparative Physiology A 106 (3):333-355.

Pough FH, Janis CM, Heiser JB (2005) Vertebrate life. Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River

Powell E, Pasley J, Brockway B, Scheving L, Lubanovic W, Halberg F (1978) Suprachiasmatic dinuclear lesion alters circadian temperature rhythm's amplitude and timing in light-dark synchronized rats. Journal of Thermal Biology 3 (2):97-98

R Development Core Team (2010). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL http://www.R-project.org.

Ralph MR, Foster RG, Davis FC, Menaker M (1990) Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. Science 247 (4945):975-978

Redlin U, Nuesslein B, Schmidt I (1992) Circadian changes of brown adipose tissue thermogenesis in juvenile rats. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology 262 (3):R504-R508

Reebs SG, Mrosovsky N (1989) Effects of Induced Wheel Running on the Circadian Activity Rhythms of Syrian Hamsters: Entrainment and Phase Response Curve. Journal of Biological Rhythms 4 (1):39-48

Refinetti R (1997) Phase relationship of the body temperature and locomotor activity rhythms in free-running and entrained rats. Biological Rhythm Research 28:19-24

Refinetti R (1999) Amplitude of the daily rhythm of body temperature in eleven mammalian species. Journal of Thermal Biology 24 (5-6):477-481

Refinetti R (2010) The circadian rhythm of body temperature. Frontiers in Bioscience 15:564-594

Refinetti R, Kaufman CM, Menaker M (1994) Complete suprachiasmatic lesions eliminate circadian rhythmicity of body temperature and locomotor activity in golden hamsters. Journal of Comparative Physiology A 175 (2):223-232

Refinetti R, Menaker M (1992a) The circadian rhythm of body temperature. Physiology and Behavior 51:613-637

Refinetti R, Menaker M (1992b) The circadian rhythm of body temperature of normal and tau-mutant golden hamsters. Journal of Thermal Biology 17 (2):129-133

Rezende EL, Cortés A, Bacigalupe LD, Nespolo R, F., Bozinovic F (2003) Ambient temperature limits above-ground activity of the subterranean rodent *Spalacopus cyanus*. Journal of Arid Environments 55:63-74

Riccio AP, Goldman BD (2000) Circadian rhythms of body temperature and metabolic rate in naked mole-rats. Physiology & Behavior 71:15-22

Roberts WW, Mooney RD, Martin JR (1974) Thermoregulatory behaviors of laboratory rodents. Journal of Comparative and Physiological Psychology 86 (4):693-699.

Rolfe DF, Brown GC (1997) Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. Physiological Reviews 77 (3):731-758

Rosi MI, Cona MI, Videla F, Puig S, Monge SA, Roig VG (2003) Diet selection by the fossorial rodent *Ctenomys mendocinus* inhabiting an environment with low food availability (Mendoza, Argentina). Studies on Neotropical Fauna and Environment 38 (3):159-166

Rotenberg L, Marques N, Menna-Barreto L (2003) Desenvolvimento da cronobiologia. In: Marques N, Menna-Barreto L (eds) Cronobiologia: conceitos e aplicações. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, pp 23-44

Saleh MA, Winget CM (1977) Effect of suprachiasmatic lesions on diurnal heart rate rhythm in the rat. Physiology & Behavior 19 (4):561-564

Satinoff E, Prosser RA (1988) Suprachiasmatic nuclear lesions eliminate circadian rhythms of drinking and activity, but not of body temperature, in male rats. Journal of Biological Rhythms 3 (1):1-22

Schleich CE, Vielma A, Glösmann M, Palacios AG, Peichl L (2010) Retinal Photoreceptors of Two Subterranean Tuco-tuco Species (Rodentia, *Ctenomys*): Morphology, Topography, and Spectral Sensitivity. The Journal of Comparative Neurology 518:4001-4015

Schmidt-Nielsen K (1972) How animals work. Cambridge University Press, Cambridge

Schmidt-Nielsen K (1997) Animal physiology: adaptation and environment. Cambridge University Press, New York

Schmidt-Nielsen K, Schmidt-Nielsen B, Jarnum SA, Houpt TR (1956) Body Temperature of the Camel and its Relation to Water Economy. American Journal of Physiology 188:103-112

Sherwin C (1998) Voluntary wheel running: a review and novel interpretation. Animal Behaviour 56 (1):11-27

Shibuya C, Melnyk R, Mrosovsky N (1980) Simultaneous splitting of drinking and locomotor activity rhythms in a golden hamster. Naturwissenschaften 67 (1):45-47

Sikes RS, Gannon WL, The Animal Care And Use Committee Of The American Society Of Mammalogists (2011) Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research. Journal of Mammalogy 92 (1):235-253

Silver R, LeSauter J, Tresco PA, Lehman MN (1996) A diffusible coupling signal from the transplanted suprachiasmatic nucleus controlling circadian locomotor rhythms. Nature 382 (6594):810-813

Sokolove PG, Bushell WN (1978) The chi square periodogram: Its utility for analysis of circadian rhythms. Journal of Theoretical Biology 72 (1):131-160

Stein BR (2000) Morphology of subterranean rodents. In: Lacey EA, Patton JL, GN C (eds) Life underground: the biology of subterranean rodents. University of Chicago Press, Chicago, pp 19-61

Stephan FK, Nunez AA (1977) Elimination of circadian rhythms in drinking, activity, sleep, and temperature by isolation of the suprachiasmatic nuclei. Behavioral Biology 20 (1):1-16

Stephan FK, Zucker I (1972) Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. Proceedings of the National Academy of Sciences 69 (6):1583-1586

Swann J, Turek FW (1982) Cycle of lordosis behavior in female hamsters whose circadian activity rhythm has split into two components. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology 243 (1):R112-R118

Swann JM, Turek FW (1985) Multiple circadian oscillators regulate the timing of behavioral and endocrine rhythms in female golden hamsters. Science 228 (4701):898-900

Tanaka H, Yanase M, Kanosue K, Nakayama T (1990) Circadian variation of thermoregulatory responses during exercise in rats. American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology 258 (4):R836-R841

Thomas O (1919) On small mammals from "Otro Cerro", North-Eastern La Rioja, collected by Sr. L. Budin. Annals and Magazine of Natural History 9 (3):489-500

Tobler I, Herrmann M, Cooper HM, Negroni J, Nevo E, Achermann P (1998) Rest-activity rhythm of the blind mole rat *Spalax ehrenbergi* under different lighting conditions. Behavioural brain research 96 (1-2):173-183

Tomotani BM, Flôres DEFL, Tachinardi P, Paliza JD, Oda GA, Valentinuzzi VS (2012) Field and laboratory studies provide insights into the meaning of day-time activity in a subterranean rodent (*Ctenomys* aff. *knighti*), the tuco-tuco. PLoS ONE, no prelo

Urrejola D, Lacey EA, Wieczorek JR, Ebensperger LA (2005) Daily activity patterns of free-living cururos (*Spalacopus cyanus*). Journal of Mammalogy 86 (2):302-308

Valentinuzzi VS, Oda GA, Araújo JF, Ralph MR (2009) Circadian Pattern of Wheel-Running Activity of a South American Subterranean Rodent (*Ctenomys* cf *knightii*). Chronobiology International 26 (1):14-27

Van Der Veen DR, Le Minh N, Gos P, Arneric M, Gerkema MP, Schibler U (2006) Impact of behavior on central and peripheral circadian clocks in the common vole *Microtus arvalis*, a mammal with ultradian rhythms. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103 (9):3393-3398

Vassallo AI, Kittlein MJ, Busch C (1994) Owl predation on two sympatric species of tuco-tucos (Rodentia: Octodontidae). Journal of Mammalogy 75 (3):725-732

Watts AG (1991) The efferent projections of the suprachiasmatic nucleus: anatomical insights into the control of circadian rhythms. In: DC K, RY M, Reppert SM (eds) Suprachiasmatic nucleus: the mind's clock. Oxford University Press, Oxford, pp 77-106

APÊNDICE 1 – DESENVOLVIMENTO DO PROTOCOLO CIRÚRGICO

A elaboração do protocolo para cirurgias de implante dos sensores intraperitoneais em tuco-tucos teve início em 2009, baseada em metodologias utilizadas em ratos de laboratório. Desde então, consultas a veterinários, estudos teóricos e observações resultantes da nossa experiência vêm contribuindo para a adaptação dos procedimentos às particularidades da nossa espécie. Neste apêndice descreveremos algumas das modificações que realizamos no protocolo cirúrgico e conferiram maior sucesso às cirurgias. Com isso, temos o objetivo de compartilhar informações que possam ser úteis a outros pesquisadores que realizem cirurgias em tuco-tucos ou outros roedores selvagens.

A1.1. Compilação de dados sobre as cirurgias em *Ctenomys* realizadas em nosso laboratório

Ao longo dos anos nos quais desenvolvemos o protocolo cirúrgico, mantivemos registros de todas as cirurgias realizadas. Esses registros envolvem não apenas as cirurgias realizadas para o implante dos sensores utilizados nos experimentos desta dissertação (G2 E-Mitter), mas também de implante e retirada dos *data loggers "iButton"*, (descritos no Capítulo 2) e de implante de um transmissor que registra, além da Tc e da atividade locomotora, batimentos cardíacos (G2 HR E-Mitter, Mini Mitter, Bend, OR). A tabela A1.1 reúne as informações das 48 cirurgias realizadas entre julho de 2009 e agosto de 2011. Dentre essas cirurgias, 22 foram bem sucedidas (consideramos a cirurgia bem sucedida quando o animal se recuperou do procedimento e sobreviveu, com bom estado de saúde por, pelo menos, um mês após a cirurgia). Quando olhamos exclusivamente para as cirurgias realizadas com o sensor utilizado neste projeto, observamos uma taxa de sucesso maior (12 cirurgias bem sucedidas de um total de 19).

Utilizaremos os dados da tabela A1.1 para justificar algumas das modificações no protocolo. No entanto, reconhecemos que existem muitos fatores que podem influenciar o sucesso ou insucesso da cirurgia, os quais interagem de forma complexa. Dessa forma, a atribuição do insucesso a apenas um fator é uma simplificação que serviu somente como fio condutor para a realização das adaptações.

Tabela A1.1. Compilação dos dados das cirurgias realizadas em *Ctenomys* aff. *knighti* de julho de 2009 a agosto de 2011. Abreviações: NA-Dado não disponível; N – Não; S-Sim; APG – Ácido poliglicólico (número entre parênteses indica o diâmetro do fio).

Animal	Sexo	Mês	Ano	Peso (g)	Procedimento	Tipo de sensor	Fio de sutura	Sedativo	Dose de Ketamina[1]	Sucesso	Complicações	Causa provável da morte
#21	♀	Julho	2009	153	Implante	iButton	Algodão	Xilazina	100	N	Desconhecida	Desconhecida
#27	♀	Julho	2009	155	Implante	iButton	Algodão	Xilazina	100	S	N	N
#25	♀	Julho	2009	153	Implante	iButton	Algodão	Xilazina	100	S	Deiscência de sutura	N
#26	♂	Julho	2009	130	Implante	iButton	Algodão	Xilazina	100	N	Infecção	N
#15	♂	Julho	2009	118	Implante	iButton	Algodão	Xilazina	100	S	N	N
#29	♀	Julho	2009	133	Implante	iButton	Algodão	Xilazina	100	N	Hipotermia	Anestesia
#07	♀	Julho	2009	140	Implante	iButton	Algodão	Xilazina	100	S	N	N
#24	♀	Julho	2009	131	Implante	iButton	Algodão	Xilazina	100	S	N	N
#10	♂	Julho	2009	160	Implante	iButton	Algodão	Xilazina	100	N	Dor	Desconhecida
#40	♂	Julho	2009	150	Implante	iButton	Algodão	Xilazina	100	S	N	N
#27	♀	Agosto	2009	162	Retirada	iButton	Algodão	Xilazina	100	S	N	N
#25	♀	Agosto	2009	153	Retirada	iButton	Algodão	Xilazina	100	N	Retirou pontos	Abertura da incisão
#26	♂	Agosto	2009	123	Retirada	iButton	Algodão	Xilazina	100	N	Hipotermia	Anestesia
#15	♀	Agosto	2009	104	Retirada	iButton	NA	Xilazina	100	N	Infecção prévia	Eutanásia[2]
#7	♀	Agosto	2009	149	Retirada	iButton	Algodão	Xilazina	100	S	N	N
#24	♀	Agosto	2009	139	Retirada	iButton	Algodão	Xilazina	100	S	Dor	N
#40	♂	Agosto	2009	156	Retirada	iButton	Algodão	Xilazina	100	S	N	N
#46	♀	Fevereiro	2010	176	Implante	G2 E-Mitter	Catgut e Nylon	Xilazina	100	S	N	N
#44	♂	Fevereiro	2010	212	Implante	G2 E-Mitter	Catgut e Nylon	Xilazina	100	N	Retirou pontos	Anestesia
#45	♀	Fevereiro	2010	152	Implante	G2 E-Mitter	Catgut e Nylon	Xilazina	100	S	N	N
#51	♂	Fevereiro	2010	174	Implante	G2 E-Mitter	Catgut e Nylon	Xilazina	100	S	N	N
#50	♀	Maio	2010	133	Implante	G2 E-Mitter	NA	Xilazina	100	N	Retirou pontos	Anestesia
#52	♀	Junho	2010	150	Implante	G2 E-Mitter	Catgut	Xilazina	100	S	N	N
#51	♂	Agosto	2010	160	Retirada	G2 E-Mitter	NA	Xilazina	100	N	Animal errado	Eutanásia
#85	♀	Dezembro	2010	168	Implante	iButton	Catgut	Xilazina	100	N	Desconhecida	Anestesia
#86	♂	Dezembro	2010	206	Implante	iButton	Catgut	Xilazina	100	N	Retirou pontos	Anestesia
#69	♂	Fevereiro	2011	177	Implante	G2 E-Mitter	APG 4-0	Xilazina	100	S	N	N
#67	♀	Fevereiro	2011	136	Implante	iButton	APG 4-0	Xilazina	100	N	Dor	Desconhecida

#90	♂	Fevereiro	2011	153	Implante	iButton	APG 4-0	Xilazina	100	N	Desconhecida	Anestesia
#95	♀	Março	2011	130	Implante	G2 E-Mitter	APG 4-0	Xilazina	100	N	Desconhecida	Anestesia
#75	♀	Março	2011	140	Implante	G2 E-Mitter	APG 4-0	Xilazina	90	N	Desconhecida	Anestesia
#94	♂	Março	2011	174	Implante	iButton	APG 4-0	Acepromazina	80	N	Desconhecida	Anestesia
#93	♂	Março	2011	178	Implante	iButton	APG 4-0	Acepromazina	100	N	Deiscência de sutura	N
#65	♀	Março	2011	131	Implante	iButton	APG 4-0	Acepromazina	80	N	Deiscência de sutura	N
#65	♀	Abril	2011	120	Retirada	iButton	APG 4-0	Acepromazina	80	N	Não anestesiou	Eutanásia
#93	♂	Abril	2011	184	Retirada	iButton	APG 4-0	Acepromazina	100	N	Abertura da incisão do músculo	Abertura da incisão
#98	♂	Julho	2011	190	Implante	G2 E-Mitter	APG 4-0	Acepromazina	100	S	N	N
#97	♂	Julho	2011	195	Implante	G2 E-Mitter	APG 4-0	Acepromazina	150	S	N	N
#103	♂	Julho	2011	153	Implante	G2 E-Mitter	APG 5-0	Acepromazina	150	N	Dor	Íleo paralítico
#64	♀	Julho	2011	140	Implante	G2 E-Mitter	APG 6-0	Acepromazina	100	N	Abertura da incisão do músculo	Eutanásia
#100	♀	Julho	2011	128	Implante	G2 E-Mitter	APG 4-0	Acepromazina	200	S	N	N
#102	♂	Julho	2011	116	Implante	G2 E-Mitter	APG 4-0	Acepromazina	200	S	N	N
#101	♀	Agosto	2011	153	Implante	G2 E-Mitter	APG 6-0	Acepromazina	200	S	N	N
#104	♂	Agosto	2011	220	Implante	G2 E-Mitter	APG 6-0	Acepromazina	200	S	N	N
#99	♀	Agosto	2011	147	Implante	G2 E-Mitter	APG 4-0	Acepromazina	200	S	N	N
#105	♀	Agosto	2011	133	Implante	G2 HR E-Mitter	NA	Acepromazina	200	N	Hipotermia	Anestesia
#106	♀	Agosto	2011	135	Implante	G2 HR E-Mitter	APG 6-0	Acepromazina	200	S	N	N

[1]Em mg/Kg

[2]A eutanásia foi realizada com overdose de anestésico

A1.2. Anestesia

A maior causa das mortes pós-cirúrgicas foi relacionada a aspectos da anestesia (48%). Consideramos morte por anestesia todos os casos nos quais não houve intercorrência durante a cirurgia (como sangramentos excessivos) e o animal não se recuperou completamente da sedação. O protocolo anestésico utilizado inicialmente consistia na combinação de ketamina (100mg/Kg), um anestésico dissociativo, e xilazina (10mg/Kg), substância com propriedades sedativas, analgésicas e miorrelaxantes (Guimarães e Mázaro, 2004). No total, 32 cirurgias foram realizadas com essa combinação, com a ocorrência de 9 mortes atribuídas à anestesia. Esse grande número de mortes nos fez questionar a continuidade do uso desse protocolo anestésico em *Ctenomys*. É possível que nossa espécie seja mais sensível a essa combinação em comparação aos roedores de laboratório, resultando em um maior número de mortes.

Sabe-se que os efeitos colaterais da administração de xilazina incluem depressão respiratória e cardiovascular (Wixson e Smiler, 1997). Caso os tuco-tucos sejam muito sensíveis a esses efeitos, poderiam causar sua morte. Além disso, a xilazina também diminui a motilidade gastrointestinal, e isso poderia levar à condição de íleo paralítico (na qual os movimentos da parede intestinal cessam) (Hunt et al., 1986). Identificamos que alguns dos animais apresentaram íleo paralítico após a cirurgia, o que pode ter sido a causa de algumas mortes. Por esses motivos, decidimos substituir a xilazina pela acepromazina (20mg/Kg), fármaco com propriedades tranquilizantes. Em um primeiro momento, utilizamos a acepromazina combinada com uma dose de 100mg/Kg de ketamina. No entanto, notamos que muitos animais necessitavam que a anestesia fosse suplementada (com 1/3 da dose de ketamina por suplementação) para que um plano anestésico adequado fosse atingido. Dessa forma, aumentamos a dose de ketamina para 200mg./Kg, diminuindo a necessidade de suplementação. Ao todo foram realizadas 16 cirurgias utilizando-se a combinação ketamina/acepromazina, com a ocorrência de 2 mortes causadas por anestesia, incidência menor do que a observada com a combinação ketamina/xilazina.

A1.3. Preparação do campo cirúrgico

Por serem animais selvagens e comerem alimentos frescos, que não podem ser desinfetados, a pelagem dos tuco-tucos não é extremamente limpa e é comum haver ectoparasitas. Por esse motivo, é necessário que haja um cuidado extra para evitar contaminações. Nesse sentido, além de realizarmos tricotomia e desinfecção da área em que será

feita a incisão (com álcool 70% e iodo), também preparamos um campo cirúrgico utilizando gaze e esparadrapos (Fig. A1.1). Esse campo impede que as mãos do cirurgião e o fio de sutura toquem diretamente a pelagem do animal, evitando contaminações.

Figura A1.1. Fotografia de um tuco-tuco anestesiado , apresentando o campo cirúrgico. A pele é exposta apenas no do local onde a incisão será feita.

A1.4. Incisão

A incisão for realizada utilizando-se um bisturi. O corte foi feito cerca de um centímetro abaixo do esterno, sobre a línea alba (local de junção dos músculos abdominais) pois as incisões realizadas nesse local causam pouquíssimo sangramento. No caso da implantação sensores G2 E-Mitter o corte tinha aproximadamente 1 cm. Era necessário ter cautela com o corte da parede muscular, para que o bisturi não atingisse nenhum órgão. Para evitar danos, o músculo era erguido com uma pinça, para afastá-lo dos órgãos.

A1.5. Sutura

A1.5.1. Fios de sutura

A pele e musculatura dos tuco-tucos têm espessura muito menor quando comparadas àquelas de ratos (observações pessoais). Por essa razão, tivemos a necessidade de utilizar fios de sutura de menor diâmetro (5-0 ou 6-0). Inicialmente realizamos as suturas com fios de algodão

ou nylon, ambos não-absorvíveis. A desvantagem de utilizar esses fios é a necessidade de se retirar os pontos após a cicatrização, em experimentos de longa duração. Nesse caso, como a maioria dos tuco-tucos se torna inquieta e agressiva com a manipulação, esse procedimento é estressante e pode requerer a aplicação de anestésicos. Dessa forma, partimos para a utilização de fios absorvíveis. Em um primeiro momento, utilizamos fios do tipo "*catgut*". Esses fios são feitos de fibras de origem animal e podem causar reações alérgicas. De fato, notamos que os tuco-tucos coçavam com frequência as incisões suturadas com fio *catgut*. Em casos extremos, os animais arrancavam os pontos com os dentes. Por esse motivo, testamos outro tipo de fio absorvível, feitos a partir de um material sintético denominado ácido poliglicólico. Notamos diminuição dos casos nos quais os animais coçavam ou retiravam os pontos quando realizávamos a sutura com esses fios.

A1.5.2. Tipo de sutura

Como ocasionalmente os animais cortavam os pontos com os dentes, passamos a realizar somente sutura do tipo interrompida. Nesse tipo de sutura é dado um nó e o fio cortado a cada ponto. Apesar de esse método consumir mais tempo e material de sutura, ele é extremamente vantajoso, pois caso o animal retire um dos pontos, os outros pontos, separados, ainda mantêm a incisão fechada. No caso a sutura contínua, na qual o mesmo trecho de fio é utilizado para fechar toda a incisão, o corte de um dos nós pode levar a uma abertura completa do corte.

A1.6. Prevenção contra hipotermia

A hipotermia é comum, particularmente em pequenos animais, durante a administração de anestésicos e da realização de cirurgias abdominais (Guimarães e Mázaro, 2004). Observamos essa ocorrência diversas vezes em tuco-tucos, principalmente nas cirurgias iniciais. Em alguns casos essa complicação foi severa e levou os animais à morte. Por essa razão, passamos a adotar algumas medidas para manter os animais aquecidos durante a cirurgia e no pós-operatório. Em um primeiro momento utilizamos lâmpadas incandescentes. Contudo, a iluminação incomodava os animais, que estavam particularmente sensíveis à luz durante a recuperação da anestesia. Passamos, então, a utilizar uma manta elétrica térmica, colocada sob o animal durante a cirurgia e sob a gaiola durante o pós-operatório. Essa manta era mantida ligada até o animal se recobrar

completamente da anestesia. Com a adoção dessa medida, diminuímos consideravelmente o número de ocorrências de hipotermia.

A1.7. Cuidados pós operatórios

Após a cirurgia os animais eram colocados em gaiolas desinfetadas com álcool 70%,. Na fase de recuperação da anestesia, a maior parte dos tuco-tucos ficava hiperativa e desorientada. Quando os animais, nesse estado, tentam se alimentar, correm o risco de sufocamento. Por esse motivo, evitamos fornecer alimentos nas primeiras horas após a cirurgia. Além disso, na fase de recuperação da anestesia observamos, com maior frequência, animais tentando cortar os pontos da sutura. Por essa razão, um colar elizabeteano foi colocado nos animais até que eles se recuperassem completamente da anestesia (Fig A1.2).

Na maior parte dos pós-operatórios, os animais apresentavam postura e comportamento normal já no primeiro dia seguinte ao procedimento cirúrgico. No entanto, quando observávamos que o animal exibia postura e comportamentos indicativos de dor, administrávamos analgésico (flunixina meglumina, 2,5mg/Kg) e antibiótico (enrofloxacino, 10mg/Kg)

.

Figura A1.2. Fotografia de um tuco-tuco com um colar elizabeteano. Esse colar, construído artesanalmente a partir de uma garrafa plástica, impede o animal de morder os pontos e abrir a incisão.

A1.8. Referências bibliográficas

Guimarães M, Mázaro R (2004) Princípios éticos e práticos no uso de animais de experimentação. Universidade Federal de São Paulo, São Paulo

Hunt JM, Edwards G, Clarke KW (1986) Incidence, diagnosis and treatment of postoperative complications in colic cases. Equine Veterinary Journal 18 (4):264-270

Wixson S, Smiler K (1997) Anesthesia and analgesia in rodents. In: Kohn DF, Wixon S, White W, Benson G (eds) Anesthesia and analgesia in laboratory animals, vol 2. Academic Press

APÊNDICE 2 – AUMENTO DA TC EM RESPOSTA À ELEVAÇÃO DA TA

Durante a execução do experimento descrito no capítulo 7, houve um problema técnico que gerou um resultado acidental interessante. Em duas ocasiões diferentes, o ar condicionado do biotério onde eles eram mantidos parou de funcionar. As duas falhas ocorreram durante a realização do experimento 7. A primeira delas aconteceu quando os animais #46 e #52 estavam em CC, no dia 51 do experimento. Na segunda vez, os animais #69, #99, #100, #101, #102, #104 e #106, estavam no biotério, e a falha ocorreu no dia 100 do experimento. Essas falhas do ar condicionado levaram à elevação da Ta dentro das caixas de isolamento em mais de 7°C, por mais de 24 horas. Quando analisamos os registros da Tc dos tuco-tucos, notamos que, durante as horas nas quais o ar condicionado estava quebrado, esta também estava muito acima dos seus valores típicos, chegando a 40°C em alguns animais (Fig. A2.1). Uma vez que o problema foi solucionado e a temperatura do biotério voltou a ser controlada, a Tc dos animais voltou a seus valores típicos.

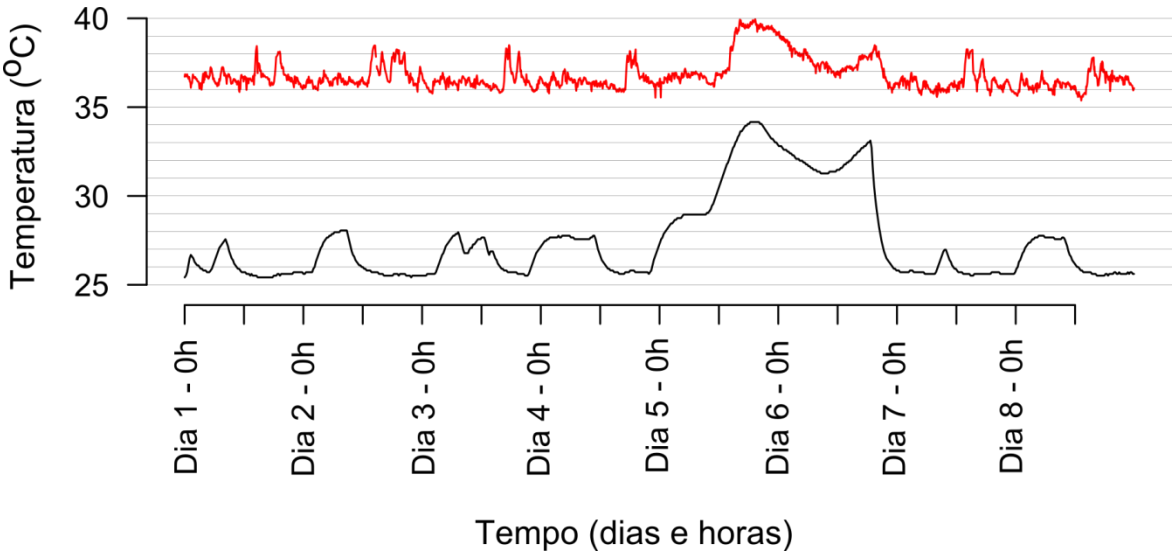

Figura A2.1. Relação entre Tc (vermelho) e a Ta (preto) Ta variou dentro e fora da zona termoneutra. Gráfico representativo de um tuco-tuco (#52), quando a Ta variou dentro e fora da zona termoneutra. Nos primeiros quatro dias representados no gráfico, a Ta oscilou entre 25 e 28°C e a Tc se manteve entre 36 e 38°C, independente da Ta. No meio do dia 5, Ta do laboratório começou a subir até alcançar, no fim desse dia, mais de 34°C. Nesse momento a Tc do animal também se elevou, alcançando 40°C. A Tc acompanhou o padrão da Ta até esta voltar aos seus valores normais, no final do dia 6.

Esse acontecimento sugere que a partir de uma determinada Ta (em torno de 30^{o}C) os tuco-tucos não mais defendem um valor para a sua Tc, e esta passa a variar de acordo com a Ta. Esse resultado é similar ao relato de Busch (1989) para duas outras espécies de *Ctenomys*, cuja Tc medida em Ta acima de 35^{o}C era cerca de 4^{o}C mais alta do que a medida quando o valor de Ta estava dentro da zona termoneutra dos animais.

A2.1. Evidência de compensação de τ a variações de Tc

Muitos processos fisiológicos e bioquímicos são sensíveis a mudanças de temperatura. Em geral, eles são acelerados com a elevação da temperatura e desacelerados com a sua diminuição. A taxa de consumo de oxigênio em animais, por exemplo, pode duplicar ou até triplicar quando a temperatura se eleva em 10^{o}C (Schmidt-Nielsen, 1997). Para calcular o efeito do aumento de temperatura nas taxas de qualquer processo bioquímico é utilizado um coeficiente denominado **Q_{10}**. Grosso modo, Q_{10} é a razão entre duas taxas medidas com 10^{o}C de diferença. Dessa forma, se uma taxa duplica com o aumento de 10^{o}C, tem Q_{10} igual a 2. Se triplica, tem Q_{10} igual a 3 e assim por diante. As taxas da maior parte dos processos fisiológicos e bioquímicos têm Q_{10} entre 2 e 3 (Hochachka e Somero, 2002).

Tendo em conta que as oscilações circadianas são geradas no âmbito da transcrição e tradução gênica cíclica (Dunlap et al., 2004), é inevitável pensar no que aconteceria se as reações bioquímicas envolvidas nesta geração respondessem da mesma forma que outros processos às mudanças de temperatura. Se os mecanismos de geração do ritmo circadiano tivessem Q_{10}=2, por exemplo, um aumento de 10^{o}C faria o oscilador ficar duas vezes mais rápido, o que poderia resultar, especulativamente, em um τ próximo de 12 horas. Isso certamente comprometeria a sincronização com ciclos ambientais e a alocação de determinado processo fisiológico em uma fase específica do ciclo. O que se observa, no entanto, é que o período dos ritmos circadianos pouco varia frente a mudanças de temperatura, apresentando Q_{10} de aproximadamente 1. Essa compensação é considerada a terceira propriedade fundamental na caracterização de um ritmo circadiano, como visto no cap3.3, sendo essencial para que o oscilador circadiano seja um temporizador confiável (Pittendrigh, 1954).

Estudos a respeito de compensação à temperatura em ectotermos podem ser realizados através da manipulação da Ta. Em mamíferos, no entanto, a dificuldade é maior, uma vez que o oscilador circadiano está sujeito à Tc, que raramente varia mais de alguns graus. Por esse motivo,

os trabalhos sobre compensação à temperatura em mamíferos são realizados *in vitro* ou em animais que hibernam ou entram em torpor (Menaker, 1961; Revel, 2007; Ruby et al., 1999).

Como é possível visualizar na figura A2.1, durante a falha do ar condicionado a Tc acompanhou Ta, não exibindo, portanto, o padrão rítmico ditado pelo oscilador circadiano. Por esse motivo, não pudemos visualizar a ritmicidade no momento em que a Tc estava elevada. Contudo, pudemos avaliar os ritmos após o seu reestabelecimento. Esperava-se que, caso o oscilador fosse "apressado" durante o episódio de elevação da Tc, ou seja, tivesse o período encurtado, o ritmo voltaria a ser expresso em uma fase diferente quando reestabelecido. No entanto, fica claro pela Fig.A2.2 que a fase e o período dos ritmos de Tc e atividade locomotora continuaram os mesmos após o reestabelecimento da Ta. No caso dos animais que apresentaram partição dos ritmos, o mesmo padrão rítmico decorrente do fenômeno voltou a ser observado após a falha ter sido reparada (Fig A2.2). Nesse sentido, nossos dados sugerem que os ritmos circadianos dos tuco-tucos apresentam compensação de seu período a variações de temperatura.

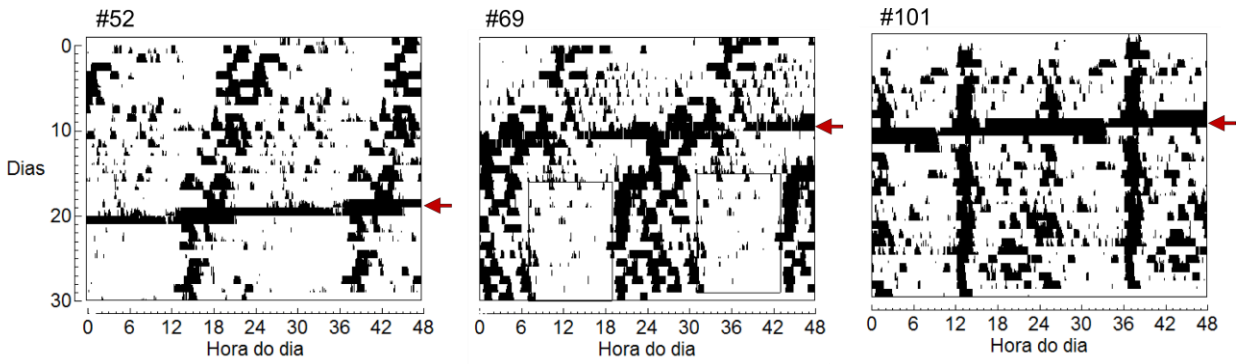

Fig. A2.2. Actogramas em duplicata da Tc em três animais antes e depois da falha do ar-condicionado. As setas indicam o dia no qual a falha ocorreu e a Tc se elevou. Todos os animais estavam em CC. O animal #69 foi transferido para CE no dia 16. O retângulo indica os horários da fase de claro durante esse ciclo. Os registros completos desses animais durante o experimento, bem como os registros dos outros animais nos quais a Tc se elevou com a falha do ar condicionado encontram-se no Capítulo 7.

Nós especulamos que essa elevação da Tc observado em laboratório, decorrente do aumento da Ta pode, também, ocorrer na natureza. Sabe-se que esse tipo de hipertermia ocorre e é tolerado, em campo, por alguns roedores de deserto, como os esquilos *Ammospermophilus leucurus* (Sciuridae). Esse esquilo forrageia de forma vigorosa, por curtos intervalos de tempo, sob sol forte e altos valores de Ta. Nesses intervalos, a Tc se eleva a até 43^{o}C. Esses episódios de

forrageamento são intercalados por momentos de repouso dentro das tocas, durante os quais os valores de Tc diminuem rapidamente (Chappel e Bartholomew, 1981a). Os tuco-tucos também saem, diariamente, à superfície durante as horas de claro (Tomotani et al., no prelo). Embora a Ta raramente exceda os 30^{o}C, no horário de suas saídas, o sol forte do deserto e a pelagem escura dos tuco-tucos podem resultar em um estresse térmico muito maior para o animal (Chappel e Bartholomew, 1981b). Dessa forma, é possível que sua Tc também se eleve durante as excursões à superfície. Caso isso ocorra, é especialmente vantajoso que seus ritmos apresentem compensação à temperatura.

A2.2. Referências bibliográficas

Busch C (1989) Metabolic rate and thermoregulation in two species of tuco-tuco, *Ctenomys talarum* and *Ctenomys australis* (Caviomorpha, Octodontidae). Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology 93 (2):345-347

Chappell MA, Bartholomew GA (1981a) Activity and thermoregulation of the antelope ground squirrel Ammospermophilus leucurus in winter and summer. Physiological Zoology 54 (2):215-223

Chappell MA, Bartholomew GA (1981b) Standard Operative Temperatures and Thermal Energetics of the Antelope Ground Squirrel Ammospermophilus leucurus. Physiological Zoology 54 (1):81-93

Dunlap JC, Loros JJ, DeCoursey PJ (2004) Chronobiology: Biological timekeeping. Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts

Hochachka PW, Somero GN (2002) Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological evolution. Oxford University Press, Oxford

Menaker M (1961) The free running period of the bat clock; seasonal variations at low body temperature. Journal of Cellular and Comparative Physiology 57 (2):81-86. doi:10.1002/jcp.1030570204

Pittendrigh CS (1954) On temperature independence in the clock system controlling emergence time in *Drosophila*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 40 (10):1018-1029

Revel FG, Herwig A, Garidou M-L, Dardente H, Menet JS, Masson-Pévet M, Simonneaux V, Saboureau M, Pévet P (2007) The circadian clock stops ticking during deep hibernation in the European hamster. Proceedings of the National Academy of Sciences 104 (34):13816–13820

Ruby NF, Burns DE, Heller HC (1999) Circadian Rhythms in the Suprachiasmatic Nucleus are Temperature-Compensated and Phase-Shifted by Heat Pulses In Vitro. J Neurosci 19 (19):8630-8636

Schmidt-Nielsen K (1997) Animal physiology: adaptation and environment. Cambridge University Press, New York

Tomotani B, Flôres D, Tachinardi P, Paliza J, Oda G, Valentinuzzi VS (2012) Field and laboratory studies provide insights into the meaning of day-time activity in a subterranean rodent (Ctenomys aff. knighti), the tuco-tuco. PLoS ONE, no prelo