Barbara Mizumo Tomotani

Pós-efeitos da sincronização em campo e a
fase de atividade do roedor subterrâneo tuco-
tucu (Rodentia: Ctenomyidae)

Aftereffects of field entrainment and the activity
phase of the subterranean rodent tuco-tuco
(Rodentia: Ctenomyidae)

Versão Corrigida

São Paulo

2011

Barbara Mizumo Tomotani

Pós-efeitos da sincronização em campo e a
fase de atividade do roedor subterrâneo tuco-
tucu (Rodentia: Ctenomyidae)

Aftereffects of field entrainment and the activity
phase of the subterranean rodent tuco-tuco
(Rodentia: Ctenomyidae)

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

2011

Tomotani, Barbara Mizumo

Pós-efeitos da sincronização em
campo e a fase de atividade do roedor
subterrâneo tuco-tuco (Rodentia:
Ctenomyidae)

78 páginas

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

1. Exposição à luz
2. Arena experimental
3. *Ctenomys*

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

Versão corrigida, a versão original encontra-se disponível no Instituto de
Biociências da USP.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a). Mirian David Marques

Prof(a). Dr(a). Patrícia Izar

Profa. Dra. Gisele Akemi Oda

Orientadora

Aos meus pais Lilian (*in memoriam*) e Rui
e ao meu irmão João Vitor.

“In the Underdark he had known fairly constant temperatures and unvarying darkness. Here, though, the world surprised him at every turn. Already he had noticed that the periods of daylight and darkness were not constant; the sun set earlier every day and the temperature – changing from hour to hour, it seemed – had steadily dipped during the last few tendays. Even within those periods of light and darkness loomed inconsistencies. Some nights were visited by a silver-glowing orb and some days held a pall of gray instead of a dome of shining blue”.

Sojourn (The Legend of Drizzt, book III)

R.A. Salvatore, 1991

Agradecimentos

Agradeço a minha família que me apoiou muito durante esse mestrado, mesmo sem entender muito bem o porquê de eu ir até a Argentina estudar ratos.

Agradeço as minhas orientadoras Gisele Akemi Oda e Verónica Sandra Valentinuzzi por todos os ensinamentos, conselhos, apoio, “brincas” e paciência infinita. Sou muito grata por tudo que vocês fizeram por mim, eu aprendi muito com esse trabalho e devo tudo a vocês!

Aos meus amigos e companheiros de trabalho Danilo Flôres (Sapuca) e Patrícia Tachinardi (Paty), que participaram de todas as etapas desse trabalho: desde o planejamento, passando pelas longas horas de observação e telemetria, até a análise e discussão dos resultados. Definitivamente este trabalho não teria saído sem vocês. Agradeço também por todos os bons momentos na Argentina, com direito a Frutigram e chocolates.

A José Demetrio Paliza, pela construção da arena experimental, biotério e dos equipamentos necessários para o desenvolvimento deste trabalho. Além de ter ajudado na captura e manutenção dos animais bem como nas observações e rádio-telemetria.

A Rodrigo Brincalepe Salvador por ter sido tão paciente e me agüentado durante esses anos, me dando apoio psicológico para superar todos os problemas. Sem contar na atuação como meu “revisor de textos particular”, na confecção de bandeirinhas para a rádio-telemetria, no levantamento de caracteres para a descrição dos tucos, entre muitas outras coisas.

A Mirian Marques por todos os ensinamentos sobre cronobiologia, evolução e ciência, por todas as incríveis discussões e por todo o apoio.

Agradeço a todos os alunos, pesquisadores e funcionários do CRILAR por terem nos recebido tão bem em Anillaco. Em especial agradeço a: Lucía Krapovickas por toda a ajuda com captura e manutenção dos animais; Ariana Aranda Rickert pela identificação das espécies vegetais; Ivana Ameloti pela ajuda com todos os dados abióticos (coleta e análise); Sebastián Frachia pela ajuda com a captura de tuco-tucos; Eugénio Sanchez (Charly) por ter ajudado na construção da arena e do biotério; David Gorla por todo o apoio.

A Martin Ralph e John Araújo por todo o apoio e pela ajuda com equipamentos e planejamento de experimentos.

A Gabriel Francescoli por todas as valiosas informações sobre o estudo de tuco-tucos.

A José Carlos Motta Júnior, Fábio Monteiro de Barros e Marco Antonio Monteiro Granzinolli por terem me ensinado a trabalhar com rádio-telemetria.

A Diego Golombek e Juan Chiesa por terem nos recebido em seu laboratório e ajudado com os equipamentos de registro.

A Antoni Diez-Noguera por toda a ajuda com o programa El Temps.

A Roelof Hut, Noga Kronfeld-Schor, Serge Daan, Carolina Escobar, José Eduardo Pereira Wilken Bicudo, André Frazão, Patrícia Izar e Eleonora Trajano por todas as críticas, sugestões e incentivos. Agradeço novamente a Roelof Hut por permitir a reprodução de uma figura de seu artigo nesta dissertação (Figura 19).

A José Guilherme Chaui-Berlinck e Roseli Silva Santos por terem tido toda a paciência do mundo comigo!

Aos meus grandes amigos da graduação: Jana, André, Ludi, Mari Durigan, Márcio, Day, Carol, Mari Koga, Mari Winandy, Marcelo, Marina, Salsicha, Léo, Zeh, Joice e Atique. Meus companheiros de RPG: João, Hammer, Carla, Psycho, Musgo, Sumô, Karen e Maíra. Aos jogadores de DS: Pinta, Cláudia, Kique, Giappo, Barca e Xandão. Aos meus amigos artistas: Aline, Karina, Cini, Ciro e Sandro. Muito obrigada por todos os bons momentos!

Aos meus amigos cronobiólogos Cíntia, Jéssica e Oscar, e também a Tat Kawamoto (Tatee) por todas as discussões fantásticas.

Agradeço ao CNPq pela bolsa de mestrado (processo 130021/2009-1) e ao financiamento fornecido pelas agências CONICET (PIP-11420090100252) e FAPESP (2008/55035-5, 2010/50222-1), que permitiram as viagens e compras dos equipamentos.

Finalmente agradeço ao departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB-USP) e ao Centro Regional de Investigaciones Científicas y Transferencia Tecnológica (CRILAR) por permitirem a realização do meu trabalho.

Sumário

Introdução.....	1
Capítulo 1: Conceitos e metodologias básicas de cronobiologia.....	9
Capítulo 2: Caracterização do padrão de exposição à luz de tuco-tucos em campo.....	16
Capítulo 3: Pós-efeitos da sincronização em campo	33
Capítulo 4: Diurnos ou noturnos?.....	41
Capítulo 5: Caracterização dos dados abióticos e da disponibilidade de alimento em campo	48
Capítulo 6: Outro modelo	55
Conclusões.....	61
Referências Bibliográficas.....	62
Resumo	69
Abstract	70
Anexos.....	71

Introdução

1. Cronobiologia

O movimento da Terra em relação ao Sol e à Lua faz com que existam diversos ciclos ambientais na natureza com periodicidades distintas: ciclos diários, como o ciclo claro/escuro, sazonais, como as estações do ano, e ainda ciclos apresentando outros períodos, como o ciclo das marés. A existência desses ciclos altamente previsíveis afeta inúmeros processos comportamentais ou fisiológicos dos organismos e possivelmente atua como um agente de seleção natural (Moore-Ede *et al.*, 1984; Enright, 1970; Page, 1985).

Todos os organismos conhecidos apresentam ritmos biológicos, que são quaisquer eventos biológicos que se repetem periodicamente no tempo, como a alternância diária entre atividade e inatividade. A existência desses ritmos possibilita que os organismos tenham a capacidade de previsão e antecipação, de forma que determinadas funções ocorram em momentos apropriados do dia e do ano (Enright, 1970).

No caso dos ritmos diários, a correspondência do período de 24 horas do ritmo com ciclos, por exemplo, o ritmo de atividade/inatividade com o ciclo claro/escuro, fez com que, por muito tempo, se acreditasse que essa alocação temporal de funções fosse uma simples resposta fisiológica direta aos estímulos cíclicos do ambiente, o que seria a explicação mais intuitiva. Ou seja, os animais seriam capazes de reagir a determinados estímulos ambientais e, assim, um animal diurno estaria ativo durante o dia devido à presença de luz e repousaria à noite por causa da escuridão.

Atualmente, entretanto, já se sabe que grande parte dos ritmos, em especial os ritmos diários, é **endógena**, ou seja, os ritmos são gerados pelo organismo e não são uma simples reação aos ciclos ambientais. Essa endogenicidade dos ritmos biológicos é comprovada pela sua persistência mesmo na ausência de todas as pistas ambientais cíclicas e apresenta uma importância evolutiva: ela permite que os organismos preparem-se fisiologicamente para desafios ambientais cíclicos (Enright, 1970; Daan, 1981; Moore-Ede *et al.*, 1984).

Notavelmente, quando as pistas ambientais são removidas, os ritmos persistem com um período diferente daquele do ciclo ambiental. Nessas condições, quando

expressam seu período próprio, diz-se que os ritmos estão em **livre-curso**. Por exemplo, ritmos diários persistem em condições constantes com um período próximo a 24 horas e, portanto, são denominados “**circadianos**” (circa = cerca de) (Halberg, 1959 *apud* Moore-Ede *et al.*, 1984).

O fato de o ritmo circadiano persistir em condições constantes e com um período diferente de 24h é indicativo da existência de alguma estrutura no organismo que seja responsável pela geração e controle da ritmicidade. E, de fato, os organismos apresentam estruturas chamadas de “**osciladores circadianos**” que apresentam um período intrínseco, denominado Tau (τ), diferente, mas em torno de 24h, e que é espécie-específico (Moore-Ede *et al.*, 1984). Nos mamíferos, os osciladores encontram-se centralizados nos *núcleos supraquiasmáticos* do hipotálamo (Moore, 1983; Menaker *et al.*, 1997).

Para que um ritmo endógeno seja completamente funcional em condições naturais, ele deve estar **sincronizado** com os ciclos ambientais. Assim, apesar dos ritmos em livre-curso apresentarem períodos diferentes dos períodos dos ciclos ambientais, em condições naturais eles encontram-se com suas fases sincronizadas e com o período exatamente igual a 24h. Portanto, a adaptação temporal consiste na harmonização entre os ritmos biológicos e os ciclos ambientais (Marques *et al.*, 1999).

2. Roedores subterrâneos na cronobiologia

Os ritmos biológicos são importantes por conferir aos animais a capacidade de se antecipar aos desafios cíclicos do ambiente; mas e no caso de animais que vivem em ambientes cujos ciclos são muito menos evidentes, como aquele dos animais subterrâneos? Será que nesses casos esses animais igualmente apresentariam ritmos e estes também seriam importantes para sua sobrevivência? E, uma vez que os ciclos aos quais animais subterrâneos estão expostos são distintos dos ciclos aos quais estão expostos os animais de superfície, como ocorreria a sincronização dos ritmos de subterrâneos? Roedores subterrâneos pertencentes a diversos grupos revelaram-se sistemas interessantes para a investigação dessas questões.

Tipicamente, o ambiente dos roedores subterrâneos é relatado como permanentemente escuro e com pouca variação na temperatura. Além disso, ele também seria hipóxico, hipercápnico, com pouca ventilação e baixa produtividade resultando em

pouco alimento, além de ser um ambiente que requer um alto custo energético para se deslocar (escavação). Argumenta-se, por outro lado, que esses ambientes promoveriam uma maior proteção contra predadores e contra grandes flutuações ambientais (Buffenstein, 2000; Burda *et al.*, 2007). Uma vez que seu ambiente parece ser “altamente protegido e pouco variável”, é tentadora a idéia de que roedores subterrâneos não apresentariam ritmos e que raramente estariam expostos às variações cíclicas ambientais.

Por exemplo, os roedores subterrâneos sociais conhecidos como rato-toupeira-pelado (naked mole-rat, *Heterocephalus glaber*, Bathyergidae) já foram relatados como arrítmicos e sua arritmicidade foi tentativamente relacionada à suposta irrelevância dos ciclos no ambiente subterrâneo (Alcock, 2005). Entretanto, quando estudados individualmente em laboratório, uma grande parte dos animais apresentou ritmos robustos de atividade/inatividade, com a fase de atividade ocorrendo na fase de escuro, e também se constatou que esse ritmo é sincronizado pelo ciclo claro/escuro. Por outro lado, quando todos os indivíduos foram estudados em suas colônias, observou-se um ritmo menos evidente, sendo quase arrítmicos em alguns casos, mas levemente diurnos em outros. Curiosamente, nesse último caso, os machos dispersores que abandonam a colônia em determinado momento de sua vida, são rítmicos e claramente noturnos. Assim, é provável que esses roedores tenham sistemas circadianos funcionais e utilizem informações do ciclo claro/escuro em campo, mas talvez apenas em circunstâncias especiais e somente alguns indivíduos o façam (Ricio & Goldman, 2000; DeCoursey, 2004b).

Outro roedor subterrâneo estudado foi o rato-toupeira-cego (*blind mole-rat*, *Spalax ehrenbergi*, Spalacidae), no qual também se constatou uma grande variabilidade individual com a existência de indivíduos arrítmicos e rítmicos (com a maioria diurna). No caso desta interessante espécie, apesar da existência de indivíduos arrítmicos, os animais em laboratório apresentam ritmos circadianos (atividade/inatividade e temperatura) passíveis de sincronização por ciclo claro/escuro. Além disso, eles possuem fotorreceptores funcionais aferentes do oscilador circadiano apesar de terem olhos extremamente reduzidos e cobertos pela pele. Assim, existe a possibilidade de que mesmo nesses animais subterrâneos seja importante a manutenção da sincronização com os ciclos ambientais (Ben-Schlomo *et al.*, 1995; Goldman *et al.*, 1997).

Nosso grupo de estudo realizou, anteriormente, a caracterização rítmica em laboratório de uma espécie solitária de roedor subterrâneo, conhecida popularmente por tuco-tuco (gênero *Ctenomys*), encontrada na região de Anillaco, La Rioja. Seu ritmo foi caracterizado em laboratório utilizando-se protocolos cronobiológicos tradicionais que, em contraste com o que foi observado nos ratos-toupeira, mostrou, em todos os indivíduos, a presença de um ritmo robusto e preciso de atividade/inatividade, tanto em um ciclo claro/escuro, com a atividade ocorrendo na fase de escuro, quanto em escuro constante, onde mostraram um ritmo circadiano em livre-curso sempre com período maior do que 24 horas (Valentinuzzi *et al.*, 2009).

Enquanto esse trabalho com os tuco-tucos de La Rioja em laboratório mostrou que a espécie apresenta um ritmo preciso e com a fase de atividade correspondente a um animal noturno, em campo a situação era outra. Apenas duas referências anteriores descreveram trabalhos com animais em campo, mas com outra espécie de tuco-tuco (*Ctenomys talarum*, de Buenos Aires). Esses trabalhos não chegaram a um consenso sobre como seria o ritmo em campo, com relatos de animais diurnos, mas também de arritmicidade (Luna & Antinuchi, 2003; Cutrera *et al.*, 2006). Outros trabalhos recentes com animais do Uruguai mostram que os animais são diurnos na natureza (Francescoli, 2010, comunicação pessoal), mas a existência de animais arrítmicos não necessariamente pode ser descartada. Assim, essas questões ainda abertas, juntamente com o modo de vida peculiar desses roedores, tornam os tuco-tucos sistemas interessantes para o estudo dos ritmos biológicos.

3. Os tuco-tucos

Os tuco-tucos são roedores subterrâneos pertencentes ao gênero *Ctenomys*, único na família Ctenomyidae, ainda que alguns autores o coloquem na família Octodontidae e não formando uma família à parte. É um dos gêneros de roedores com maior número de espécies, de variados tamanhos corporais, além de ser um dos gêneros com a maior variabilidade cariotípica dentre os mamíferos. Sua distribuição alcança desde o Peru até a Terra do Fogo, com representantes na Bolívia, Chile, Argentina, Paraguai, Uruguai e Brasil (na região Sul), ocupando uma grande diversidade de habitats, do nível do mar até mais de 5000 metros de altitude. As relações filogenéticas, bem como a taxonomia desses animais, são complexas, existindo muitas lacunas quanto ao conhecimento das

espécies e quanto às relações evolutivas. Contam com mais de 60 espécies, sendo que a maior parte descrita encontra-se na Argentina (Bidau, 2006).

Os animais escavam galerias subterrâneas em locais abertos não-florestais, formando habitações com condições ambientais relativamente controladas. Os estudos mostram que as formas de escavar, a alimentação e os hábitos sociais são semelhantes nas diversas espécies, a não ser por pequenas diferenças locais (Oliveira & Bonvicino, 2006; Busch *et al.*, 2000). O sistema de túneis em *Ctenomys* é relativamente simples e permanente quando comparado a outros roedores subterrâneos como o coruro (*Spalacopus cyanus*, Octodontidae) (Reig, 1970). Estudos com *Ctenomys talarum* mostram que nestes animais solitários, assim como em vários outros grupos de roedores subterrâneos, os machos apresentam área de uso (*home range*) consideravelmente maior do que as fêmeas (Cutrera *et al.*, 2006). Muito provavelmente, nas espécies de *Ctenomys* em geral, o tamanho do sistema de túneis varie com a disponibilidade de alimento e composição do solo, além das diferenças entre os sexos, gerando variações intra-específicas. (Oliveira & Bonvicino, 2006; Busch *et al.*, 2000).

Os tuco-tucos apresentam típicas adaptações morfológicas relacionadas ao hábito subterrâneo, como caudas muito sensíveis, orelhas reduzidas e maior desenvolvimento da musculatura dos membros anteriores. As garras dos membros anteriores são bem desenvolvidas e os membros posteriores apresentam uma franja característica de pêlos curtos e rígidos nas bordas (Reig, 1970; Pearson, 1984; Cutrera *et al.*, 2006; Oliveira & Bonvicino, 2006). Por outro lado, a grande redução dos olhos observada em diversas espécies de roedores subterrâneos, incluindo olhos praticamente ausentes no caso do rato-toupeira-cego (*Spalax ehrenbergi*), parece ser mais atenuada nos tuco-tucos, que apresentam olhos relativamente grandes (Pearson, 1984).

4. *Ctenomys* cf. *knighti*

Os tuco-tucos encontrados na área de estudo deste trabalho foram primeiramente identificados como *Ctenomys knighti* Thomas, 1919 por especialistas da família. Entretanto existe uma grande possibilidade de se tratar de uma espécie nova visto que a região nunca foi estudada e existem diferenças entre a morfologia dos animais e a descrição morfológica original feita por Thomas (1919) além da área de ocorrência ser bem distante daquela do holótipo (observações pessoais). Análises de cariótipo foram

realizadas pelo *Grupo de Investigaciones de la Biodiversidad (GIB) IADIZA-CCT Mendoza-CONICET* e o número cromossômico também 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 da população de tuco-tucos ainda está em discussão e com a possibilidade de se tratar de uma espécie nova, no presente trabalho os animais são tratados por *Ctenomys cf. knighti* (Anexo 1).

5. Estudos cronobiológicos no laboratório e no campo

Os estudos em laboratório são imprescindíveis para a caracterização dos ritmos biológicos, pois permitem a investigação sistemática de diversos aspectos dos osciladores biológicos. Características básicas dos osciladores como o período endógeno só podem ser estudadas quando se remove quaisquer fatores que possam interferir no ritmo, como todos os sincronizadores, ou seja, em condições constantes, o que só é possível em laboratório. Em laboratório também é possível realizar experimentos com equipamentos especializados para o registro contínuo de variáveis rítmicas. Assim, diversos estudos foram capazes de registrar minuciosamente os padrões de atividade de camundongos (*Mus musculus*; Muridae), hamsters (*Mesocricetus auratus*; Cricetidae), dentre outros, por meses consecutivos. Nessas espécies, que acabaram se tornando modelos cronobiológicos laboratoriais, foram observados ritmos de atividade/inatividade bastante evidentes (Pittendrigh & Daan, 1976a).

Da mesma forma que os padrões de atividade, os mecanismos de sincronização foram extensivamente estudados em condições controladas de laboratório, nas quais é possível manipular isoladamente os fatores ambientais que sincronizam os ritmos. Com isso foram possíveis décadas de estudos sistemáticos do sistema de temporização circadiano. A importância de tais experimentos laboratoriais no estudo da sincronização é inquestionável. Por outro lado, as condições de laboratório às quais os organismos são submetidos costumam ser muito artificiais, podendo resultar em diferenças marcantes

com o que existe na natureza. Isso é bastante evidente naqueles organismos que vivem naturalmente em condições especiais, como os animais subterrâneos.

Como forma de melhor entender a sincronização pelo ciclo claro/escuro em condições naturais, DeCoursey (1986) realizou um trabalho com ritmos em esquilos voadores (*Glaucomys volans*, Sciuridae) simulando em laboratório as tocas onde os animais permaneciam abrigados durante o dia. Neste trabalho, foi demonstrado que esses animais noturnos percebem quase diariamente a informação luminosa ao sair de suas tocas, sincronizando-se assim com o ambiente. Os animais alternavam dias com um ritmo em livre-curso com dias de exposição à luz, e este breve episódio era suficiente para re-sincronizar o ritmo de atividade/inatividade com o ciclo claro/escuro. Com este experimento, foi simulada em laboratório a sincronização de um animal que não se expõe ao claro/escuro todos os dias. Outro trabalho importante no estudo da sincronização foi realizado por Hut e col. (1999), dessa vez em condições semi-naturais. Os pesquisadores mediram o ritmo de atividade/inatividade e exposição à luz em esquilos (*Spermophilus citellus*, Sciuridae) em uma área cercada externa. Os estudos revelaram que esses animais se expõem à luz praticamente ao longo de todas as horas de claro do dia, exceto nos crepúsculos. No caso desses roedores diurnos, a sincronização seria explicada por essa grande exposição diária à luz, de uma forma distinta daquela proposta por DeCoursey (1986) com os esquilos voadores.

Apesar de não permitirem um controle fino de todas as variáveis, os estudos em condições naturais são importantes, pois permitem a investigação dos aspectos da adaptação temporal, quando o animal encontra-se dentro de seu contexto ambiental temporal. O estudo da sincronização do ritmo de atividade/inatividade do tuco-tuco de Anillaco (*Ctenomys cf. knighti*) teve como ponto de partida o laboratório, com a caracterização do ritmo de atividade/inatividade em diversas condições (claro/escuro, escuro constante e claro constante) (Valentinuzzi *et al.*, 2009). O trabalho mostrou que o ciclo claro/escuro é um sincronizador importante para os tuco-tucos apesar de seu modo de vida subterrâneo. Entretanto, a sincronização em condições naturais dos tuco-tucos seria melhor explicada se houvesse uma abordagem complementar de campo. Assim, para compreender como ocorre a sincronização dos ritmos do tuco-tuco, deveríamos recorrer a trabalhos realizados em condições mais naturais possíveis, com o objetivo de caracterizar como é o padrão temporal diário de exposição à luz dos tuco-tucos e, com isso, tentar explicar sua sincronização pelos ciclos claro-escuro, de forma similar àquela

proposta por DeCoursey (1986) e Hut e col. (1999). Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo inicial investigar o padrão temporal de exposição à luz de tuco-tuco em campo. Tais resultados são importantes para uma melhor compreensão de se e como tais animais se sincronizam pelo ciclo claro/escuro em campo. O desenvolvimento dessa etapa do trabalho, entretanto, revelou novos caminhos de investigação relacionados com o intrigante fenômeno da “troca de nicho temporal”, que exploramos nesta dissertação.

O Capítulo 1 desta dissertação trata de metodologias e conceitos básicos da Cronobiologia que são importantes para os experimentos dos capítulos subsequentes e para a discussão dos resultados. O Capítulo 2 descreve o experimento que investigou a exposição dos tuco-tucos à luz por meio de observações contínuas. Os resultados intrigantes dessa parte mostraram a existência de um componente diurno na atividade dos tuco-tucos, em campo, sugerindo a ocorrência de troca de nicho temporal em tuco-tucos, na transição entre laboratório e campo. O Capítulo 3 descreve os experimentos que mostram que o componente diurno da atividade desaparece em condições constantes, mas um componente noturno é evidenciado. Isso demonstra que o oscilador não se modifica na transição campo-laboratório. O Capítulo 4 discute os resultados obtidos nos Capítulos 2 e 3 frente ao conhecimento existente dos animais que apresentam mudança na fase de atividade em diferentes situações e discute os mecanismos envolvidos na definição da fase de atividade. O Capítulo 5 mostra os dados das variáveis ambientais em campo durante os dias de observação, possíveis candidatos à modulação da expressão dos ritmos, em campo. E, por fim, o Capítulo 6 traz uma discussão sobre uma possível explicação para a atividade diurna dos tuco-tucos em campo relacionada à disponibilidade de alimento em campo.

Capítulo 1: Conceitos e metodologias básicas de Cronobiologia

Uma vez que os experimentos descritos nesta dissertação envolvem conceitos e metodologias básicas de Cronobiologia, este primeiro capítulo apresentará aqueles que serão importantes para a compreensão dos experimentos e das discussões subseqüentes.

1. Registro e representação gráfica

Os roedores (ordem Rodentia), de modo geral, são organismos comumente estudados, na Cronobiologia. Grande parte dos experimentos cronobiológicos foi realizada utilizando-se ratos ou camundongos, mas diversas outras espécies também já foram investigadas. A popularidade dos estudos com roedores está relacionada às vantagens desses animais que, além da relativa facilidade de manutenção e a boa adaptação às condições de laboratório, incluem a possibilidade de estudo em rodas de atividade. Primeiramente utilizada para averiguar ritmos de atividade/inatividade por Curt Richter em 1922 (Moran & Schulkin, 2000), as rodas de atividade fornecem um registro automatizado, e com poucos ruídos, da atividade diária. O registro consiste na contagem automatizada do número de revoluções da roda em determinado intervalo de tempo. Esse número de revoluções atualmente pode ser registrado por um computador e marcado em um gráfico em relação ao momento do registro (Fig. 1). Atualmente também podem ser utilizados sensores de movimento que registram a movimentação geral do animal, mas as rodas de atividade ainda são utilizadas.

Figura 1: Ilustração esquemática do sistema de roda de atividades ligada a um computador que coleta as informações.

As rodas de atividade (e os sensores de movimento) propiciam o registro do ritmo de atividade/inatividade dos roedores. O ritmo de atividade/inatividade fornece uma informação indireta das propriedades do oscilador circadiano. Estudos no nível celular, por outro lado, podem acessar diretamente as variáveis do oscilador, mas tendem a ser muito invasivos, dificultando trabalhos de longa duração. Além disso, é mais difícil compreender padrões que envolvem o organismo como um todo. Assim, o ritmo de atividade/inatividade ainda é amplamente estudado em laboratório (DeCoursey, 2004a).

Os ritmos de atividade/inatividade em geral são representados na forma de actogramas, gráficos que consistem no “empilhamento” de vários dias de registros, sendo que cada dia é colocado em uma linha. Assim, o dia 1 é colocado na primeira linha, o dia 2 na segunda e assim por diante. Com base nessa representação gráfica, é possível visualizar e analisar com maior precisão o período e fase dos ritmos. A duplicação desse tipo de gráfico na horizontal, colocando dias consecutivos lado a lado (como visto na Figura 2) possibilita a melhor visualização do padrão. Tal modificação é especialmente interessante quando se lida com ritmos em livre-curso.

Figura 2. Representação esquemática de um gráfico do tipo “actograma” mostrando o ritmo de atividade/inatividade de um animal noturno sincronizado. O gráfico está duplicado na horizontal para facilitar a visualização dos dados. Consequentemente, cada linha no gráfico representa dois dias e as barras horizontais negras marcam o momento de atividade (sua ausência mostra o repouso). A porção cinza do fundo do gráfico mostra fases de escuro e a branca de claro.

O ciclo claro/escuro em laboratório, juntamente com a proporção de claro e escuro são representados por CE x:y (x horas de claro e y de escuro). Por exemplo, um ciclo claro/escuro de 12 horas de claro e 12 horas de escuro é representado como CE 12:12. Condições de escuro constante são representadas por EE.

2. Estrutura do Sistema Circadiano

Como mencionado no capítulo anterior, os organismos apresentam ritmos biológicos que são gerados por um oscilador circadiano com período próximo, mas não exatamente igual, a 24 horas. Mamíferos apresentam esse oscilador localizado na região do hipotálamo do cérebro, mais precisamente nos núcleos supraquiasmáticos. A informação temporal contida no ciclo claro/escuro é percebida e transmitida a esse oscilador circadiano por vias aferentes, sincronizando-o diariamente. Nos mamíferos, as aferências incluem os fotorreceptores na retina, que recebem e processam a informação luminosa, e o trato retino-hipotalâmico, uma via nervosa distinta da via de formação de imagens. A informação da ritmicidade do oscilador é transmitida ao restante do organismo por meio das vias eferentes que no mesmo organismo podem ser tanto nervosas quanto humorais (Moore-Ede *et al.*, 1982; Moore, 1983; Menaker *et al.*, 1997).

3. Mecanismos de sincronização

A simples existência de ritmos endógenos não é suficiente para garantir a capacidade de antecipação fisiológica aos seres vivos frente aos desafios ambientais cíclicos. Para tal, os ritmos diários, por exemplo, devem estar sincronizados com os ciclos ambientais que caracterizam os dias e as noites. Essa sincronização do ritmo endógeno pelas pistas ambientais cíclicas ocorre por meio de dois mecanismos distintos, denominados **arrastamento** e **mascaramento** (Aschoff, 1960; Enright, 1970; Moore-Ede *et al.*, 1982).

Enquanto a sincronização no arrastamento envolve o oscilador circadiano, no mascaramento a sincronização ocorre por meio de respostas diretas dos organismos aos ciclos ambientais, sem o envolvimento do oscilador. Além disso, quaisquer respostas que modifiquem ou modulem o ritmo sem envolver o oscilador também são

denominadas mascaramento. A Figura 3 é uma representação genérica desses dois mecanismos.

Figura 3: Esquema do sistema de temporização circadiano endógeno (que controla o ritmo de atividade/inatividade).

a) Arrastamento

Denomina-se arrastamento o mecanismo de sincronização no qual um ciclo ambiental desloca periodicamente a fase do oscilador, ajustando e impondo seu período e fase sobre ele (Fig. 3). Dessa forma, um ritmo endógeno com período diferente do ciclo ambiental passa a ter um período exatamente igual àquele do ciclo ambiental e ocorre o estabelecimento de uma relação de fase estável entre o ritmo e o ciclo. Os ciclos ambientais que arrastam o oscilador são denominados *Zeitgebers* (do alemão, “doadores do tempo”). O arrastamento só ocorre se o período do *Zeitgeber* for próximo ao período do ritmo endógeno (Pittendrigh & Daan, 1976b; Moore-Ede *et al.*, 1982; Marques *et al.*, 1999). Estudos realizados por Pittendrigh e Daan (1976b) mostram que a sincronização é mais estável quando o período do oscilador não é exatamente igual ao do ciclo ambiental.

Dentre os ciclos ambientais, o ciclo claro-escuro é considerado um dos *Zeitgebers* mais precisos, para diurnos e noturnos. O ciclo claro-escuro pode ser um importante sincronizador mesmo no caso de organismos que têm pouco acesso a ele, como os subterrâneos (Moore-Ede *et al.*, 1982, Roces & Núñez, 1996). No caso dos tuco-tucos, por exemplo, o ciclo claro/escuro atua como um *Zeitgeber* ao menos em laboratório (Vallentinuzzi *et al.*, 2009).

Quando se trata de osciladores arrastados, existem dois importantes fenômenos observados que devem ser levados em consideração, sobretudo em estudos de laboratório:

I. Um organismo que passou de condições cíclicas ambientais para condições constantes pode expressar, por vários dias, as propriedades rítmicas (período e fase) que apresentava enquanto estava exposto a tal ciclo, até finalmente expressar o livre-curso. Tal fenômeno é conhecido por **pós-efeito**. Assim, após serem liberados em condições constantes, antes de se observar o livre-curso, os animais apresentam alguns dias de pós-efeitos (Pittendrigh & Daan, 1976a).

II. Além destes, também existem os **ciclos transientes**, que são verificados quando há um deslocamento de fase abrupto do *Zeitgeber* que arrastava o oscilador. Os ciclos transientes sempre ocorrem até que o oscilador se re-sincronize com a nova fase do *Zeitgeber*. Quanto mais forte o *Zeitgeber*, mais rapidamente ocorre a re-sincronização (Moore-Ede *et al.*, 1982).

Outros ritmos de períodos maiores ou menores do que os ritmos circadianos, denominados, respectivamente, ritmos ultradianos (períodos muito menores do que 24 horas) ou infradianos (períodos muito maiores do que 24 horas), também podem ser endógenos e sincronizados, porém são muito menos estudados do que os ritmos circadianos (Moore-Ede *et al.*, 1982).

b) Mascaramento

Existem pistas ambientais que não atuam sobre o oscilador, mas que podem sincronizar e/ou alterar diretamente o ritmo observado, modulando os níveis de sua expressão final. Esse processo é conhecido como mascaramento. Nesse caso, o estímulo ambiental em questão não está impondo seu período e fase sobre o oscilador. Justamente por isso, sua remoção leva à re-expressão do ritmo em uma fase determinada pelo oscilador endógeno, que continuou se expressando sem ser sincronizado pelo estímulo (Moore-Ede *et al.*, 1982; Aschoff, 1988; Mrosovsky, 1999).

O mascaramento tem uma grande importância por permitir uma “flexibilização” no sistema quando os organismos são expostos a eventos imprevisíveis. Além disso, o mascaramento complementa a sincronização por arrastamento, promovendo um ajuste fino e confinando a fase de atividade à noite ou ao dia em animais diurnos e noturnos, respectivamente (Aschoff, 1988; Page, 1989; Mrosovsky, 1999).

O padrão de atividade dos animais do deserto fornece um exemplo de mascaramento. Muitos animais de deserto em determinadas horas do dia ficam inativos, devido ao calor intenso que pode consistir em uma temperatura não permissiva para determinadas espécies. Os roedores subterrâneos coruros (*Spalacopus cyanus*) são um bom exemplo. Estes animais não deixam seus túneis nas horas do dia quando as temperaturas externas são muito altas ou muito baixas, apresentando uma marcada sazonalidade quanto à atividade na superfície (Rezende *et al.*, 2003). Temos, como resultado, um ritmo com a fase de atividade nas horas de claro (animal diurno), como determinado pelo oscilador circadiano, mas essa mesma atividade é inibida nas horas de calor intenso.

A Figura 4 é um exemplo de actograma, mostrando como o arrastamento e o mascaramento podem ser identificados. Como mencionado anteriormente, muitas vezes os actogramas são duplicados horizontalmente para que a continuidade dos dias seja melhor visualizada. Além do arrastamento e mascaramento, o pós-efeito está representado nos dias 60 e 61, quando o animal hipotético passou de um ciclo claro/escuro para escuro constante, continuando a expressar período de 24h durante esses dias. Os ciclos transientes também foram representados após a inversão do ciclo claro/escuro, no dia 21.

Figura 4: Gráfico esquemático do tipo “actograma” representativo de um registro, por 70 dias, do ritmo de atividade/inatividade de um animal diurno. O gráfico está duplicado na horizontal para facilitar a visualização dos dados. Cada linha no gráfico representa dois dias e as barras horizontais negras marcam o momento de atividade (sua ausência indica o repouso). A porção cinza do fundo do gráfico mostra fases de escuro e a branca, de claro. Até o dia 10 o animal encontrava-se em escuro-constante; a partir do dia 11, ele foi transferido para um ciclo claro/escuro CE: 12:12 (com 12 horas de claro e 12 de escuro) e no dia 21 esse mesmo ciclo foi invertido. Note que o ritmo se reajustou em relação à mudança de fase do zeitgeber de forma gradual, apresentando ciclos transientes entre uma condição e outra. Isso é indicativo do arrastamento. Do dia 41 ao dia 50, o animal foi submetido a um ciclo de temperatura com 12 horas de temperatura mais alta e 12 de temperatura mais baixa, com a temperatura mais baixa durante a fase de escuro e mais alta na fase de claro, que mascarou seu ritmo. Ou seja, as temperaturas altas inibem a atividade do animal. Isso é constatado, pois, diferentemente da situação anterior, a mudança ocorreu bruscamente, sem ciclos transientes. A remoção do ciclo de temperatura no dia 51 fez a atividade do animal voltar (novamente de forma brusca) à fase que estava anteriormente.

Capítulo 2: Caracterização do padrão de exposição à luz de tuco-tucos em campo

Introdução

Esta etapa do experimento foi desenvolvida em conjunto com Danilo E.F.L. Flôres que, com base nos dados de exposição à luz em campo, estudou questões relativas ao mecanismo de arrastamento em seu mestrado.

Na natureza, os tuco-tucos não estão expostos à luz durante as horas de claro do dia visto que são animais que vivem em galerias subterrâneas. Assim, ciclos artificiais de iluminação, aos quais os animais são expostos continuamente a horas de claro e de escuro (fotoperíodos completos), não conseguem simular o que, possivelmente, ocorre em campo. Quando os tuco-tucos estão em seu ambiente, especulávamos que seu padrão de exposição à luz seria mais parecido com aquele observado em esquilos voadores, por DeCoursey (1986): um número pequeno de saídas dos túneis durante as horas de claro do dia que, talvez, não acontecesse todos os dias, considerando que os estudos em laboratório mostraram que esses animais são noturnos (Valentinuzzi *et al.*, 2009). Essa informação seria importante para investigar, posteriormente, a sincronização dos ritmos desses animais em condições naturais. Assim, o objetivo desta fase do trabalho foi realizar a caracterização do padrão de exposição à luz de tuco-tucos vivendo em seus próprios túneis.

Da mesma forma que no laboratório, a forma ideal para a obtenção de dados experimentais, em campo, é através da utilização de algum sistema que permita uma coleta e armazenamento automatizados de informações. Assim, o experimento que caracterizaria o padrão de exposição à luz foi planejado de forma que animais seriam liberados em uma arena experimental, portando sensores capazes de coletar e armazenar informações sobre intensidade luminosa e atividade locomotora e, posteriormente, os animais seriam recuperados juntamente com os sensores. O desenvolvimento desse aparelho ocupou boa parte do tempo de nosso projeto inicial e foi encomendado para uma empresa brasileira. Sucessivos testes desse equipamento em laboratório, realizados ao longo do trabalho, mostraram que ele não era eficiente nem para medir a atividade nem a intensidade luminosa. Dessa forma, sem podermos contar com sensores que

proporcionariam uma coleta automatizada restaram-nos duas alternativas complementares para a realização do trabalho em campo: rádio-telemetria aliada a observações contínuas.

Parte 1: Rádio-telemetria e atividade locomotora

A rádio-telemetria foi pensada como alternativa para o registro diário do ritmo de atividade locomotora do animal, em campo. Pensou-se em utilizar a técnica para determinar seu ritmo de atividade/inatividade, em campo, através das medidas de seus deslocamentos espaciais diários. Ou seja, a idéia deste experimento era localizar a posição do animal a cada hora por vários dias (no mínimo três consecutivos). Assim, determinando a posição do animal a cada hora seria possível averiguar o quanto ele se desloca por hora e inferir se ele está mais ativo de dia ou à noite.

Até então, o tamanho da área ocupada pelo animal também era desconhecido: a extensão dos túneis era conhecida por meio da escavação e medição prévia de alguns deles (máximo 10 metros). Porém, como túneis podem ser fechados e abandonados e galerias novas podem ser criadas, não se sabia se o animal ocuparia, exatamente, aquela área. Além disso, era desconhecido o quanto o animal poderia se afastar dos túneis, diariamente, no forrageamento ou outras atividades, especialmente durante a noite. Todas essas informações seriam importantes para os experimentos em arenas experimentais (parte 2 deste capítulo). Esta deveria ser adequada ao animal de forma a não incluir mais um fator que pudesse modificar o comportamento e prejudicar a interpretação dos resultados. Como a rádio-telemetria é uma técnica bastante utilizada em trabalhos que visam, por exemplo, a definição da extensão da “área de vida” de animais selvagens (Kenward, 2001), sua utilização poderia proporcionar informações interessantes sobre o quanto os animais se deslocariam, diariamente.

Material e métodos

a) Área de Estudo

O trabalho foi realizado na cidade de Anillaco, província de La Rioja, Argentina (26° 48' S; 66° 56' W; 1445 m de altitude). O local onde todos os trabalhos de campo foram realizados localizava-se muito próximo ao laboratório (aproximadamente 200 m).

Entretanto, é uma área onde tuco-tucos ocorrem naturalmente, uma vez que sete indivíduos já haviam sido previamente capturados e outros avistados ao longo do estudo. Por outro lado, a captura de animais utilizados no trabalho ocorreu em diversas localidades de Anillaco.

O clima da região é seco, com uma média de chuvas anuais variando de 100 a 200 mm, concentrada nos meses de verão, entre Dezembro e Fevereiro (Abraham *et al.*, 2009). A vegetação é típica de bioma de monte: predominam arbustos esparsos, que na maioria das vezes não ultrapassam 1,5 m de altura e as plantas locais são tipicamente espinhosas, esclerófilas ou áfilas. Na primavera e verão aparecem as plantas efêmeras, acompanhadas por diversas gramíneas (Morello, 1958). As famílias mais características da região são Zygophyllaceae, Fabaceae e Cactaceae (Abraham *et al.*, 2009). Em Anillaco, além da vegetação natural, também estão presentes plantações de uva, nozes e azeitonas, que muitas vezes também abrigam tuco-tucos, o que faz com que eles sejam considerados pragas pela maioria dos fazendeiros.

No local de trabalho também são frequentemente encontrados predadores potenciais de tuco-tucos: aves de rapina como o chimango (*Milvago chimango*, Falconidae) e o falcão de coleira (*Falco femoralis*, Falconidae), raposas (*Pseudoalopex* sp., muito provavelmente *P. griseus*, Canidae) e serpentes (observação pessoal).

b) Monitoramento

Para o monitoramento, foi utilizado o equipamento de rádio-telemetria fabricado pela empresa *Wildlife Materials International, Inc.*: transmissores do tipo Som-2007, um receptor TRX-1000WR e uma antena Folding 3-element Yagi Directional. Esse equipamento possibilita determinar, aproximadamente, a localização espacial do animal. O transmissor emite um sinal que é captado pelo receptor e antena e a direção de onde esse sinal é mais forte pode ser determinada, indicando a localização do animal. Se for determinada a posição do animal ao longo das 24 horas do dia, seria possível inferir se ele se desloca mais ou menos em determinados momentos do dia ou noite e, com isso, teríamos uma idéia de seu ritmo de atividade/inatividade.

O experimento foi realizado entre os dias 27/02/2010 e 03/03/2010, próximo ao local onde os demais experimentos de campo foram realizados. O local foi dividido em quadrados de 10 metros de lado, utilizando trena e bússola para demarcar a posição e, posteriormente, atribuiu-se coordenadas a cada vértice utilizando o programa *Google*

Earth (Google Inc., 2010). Cada vértice de cada quadrado marcado no mapa do *Google Earth* foi marcado no campo, utilizando-se bases plásticas numeradas. Estes pontos previamente georreferenciados foram os locais onde as triangulações (descritas abaixo) foram realizadas (aqui denominados: “pontos fixos de tomada de dados”) (Fig. 5).

Figura 5: Imagem de satélite criada no *Google Earth* (Google Inc., 2010) do local onde o experimento da rádio-telemetria foi realizado “CRILAR” refere-se ao centro de pesquisas onde estão localizados os laboratórios, os quadrados desenhados mostram a localização das casas dos pesquisadores e o círculo representa um reservatório de água. A porção clara é a área não construída que abriga naturalmente animais e onde todos os trabalhos foram realizados. A quadrícula com os pontos em vermelho indicam os pontos fixos de tomada de dados utilizados na rádio-telemetria.

A localização do animal é determinada por um procedimento denominado “triangulação”. A triangulação é realizada pela medição do sinal em três ou mais pontos marcados em campo (Fig. 5). Em cada ponto, são determinadas a direção onde o sinal é mais forte e o ângulo da direção do sinal com uma bússola. A localização do animal é feita a partir do ângulo (medido) e da coordenada do ponto fixo de tomada de dados (previamente obtida no *Google Earth*) de três ou mais medidas, que permitem determinar as coordenadas do local onde o animal se encontra. Ou seja, para cada ponto que indica a localização do animal em determinada hora são necessárias, no mínimo,

três medidas de ângulo e três respectivas coordenadas do local onde cada ângulo foi medido.

Os dados das três ou mais medidas de ângulo de sinal e respectivas coordenadas são incluídos no programa *LOCATE III* (Nams, 2006) que realiza os cálculos necessários e fornece as coordenadas da possível posição do animal (juntamente com o erro). Para esta determinação, o teste utilizado pelo programa é denominado *Maximum Likelihood Estimator* (Nams, 2006).

Nesse teste, foram utilizados três animais, duas fêmeas e um macho (Anexo 2): uma das fêmeas foi capturada na própria área de estudo e os demais foram trazidos de áreas adjacentes ao local de estudo. Cada animal, logo após ser capturado, foi levado ao laboratório e recebeu um transmissor afixado à sua nuca. Tentou-se realizar todo esse procedimento da forma mais rápida possível, para liberar o animal no máximo 1 hora após sua captura. O ideal seria esperar alguns dias antes de começar a monitorar os animais, mas, devido à curtíssima vida da bateria (cerca de 14 dias), o monitoramento se iniciou logo após a soltura dos animais.

Como a idéia desse experimento era a determinação do ritmo de atividade/inatividade, o procedimento descrito acima foi realizado a cada hora, para cada animal. No total, para cada animal, foram realizados três dias consecutivos (96 horas) de medição. Como controle do erro do método um quarto sensor que não fora afixado em um animal permaneceu enterrado em um ponto fixo, previamente referenciado.

Resultados

A Figura 6 mostra os dados obtidos com a rádio-telemetria. Os pontos das localizações fornecidos pelo programa *LOCATE III* foram colocados em um gráfico para a análise visual da movimentação do animal. Cada ponto está associado a duas barras de erro que foram determinadas a partir de elipses de erro fornecidas pelo programa. As elipses foram transformadas em circunferências e seus raios foram utilizados para associar barras de erros a cada um dos pontos. Foram produzidos gráficos cujos eixos mostram as coordenadas geográficas x (no eixo x) e y (no eixo y) em UTM (Sistema Universal Transverso de Mercator) relativas à posição estimada do

animal (ver Fig. 2). Foram excluídos os valores das áreas com erros acima de 1000 metros.

Como é possível ver pelo controle (primeiro gráfico da Fig. 6), o erro inerente do método é considerável. Apesar de o sensor ter permanecido no mesmo local um erro de aproximadamente 200 m² foi obtido. O erro pode ser devido a diversos fatores como a imprecisão do sinal, da presença de vegetação, das cercas ou fios de alta tensão próximos ao local de trabalho ou mesmo ser devido a um erro humano no momento de tomada de dados.

Os demais gráficos da Figura 6 mostram os dados dos animais monitorados neste experimento. Nessa figura estão representados todos os pontos sem distinção de horário. Até então não se sabia bem se os animais poderiam percorrer grandes distâncias ou se poderiam abandonar seus túneis e partir para outras áreas como parece ocorrer com outras espécies (Malizia, 1998). O resultado obtido não é preciso, mas sugere que os animais não se deslocam excessivamente, e não se afastam muito de onde estaria seu sistema de túneis, que também não parece ser muito extenso (Fig. 6).

Ainda que não seja possível saber a extensão exata da área de vida, os resultados sugerem que os animais deslocam-se pouco e não se afastam muito para forragear, nem durante o dia e nem à noite, ao menos nos intervalos em que foram realizadas as medidas. Assim, desde que um espaço mínimo seja respeitado, um estudo em arena experimental com condições semi-naturais não restringe os animais a uma área excessivamente pequena a ponto de comprometer os resultados. Por outro lado, apesar dos dados serem interessantes para se ter uma idéia da área ocupada pelo animal, eles não são informativos para o ritmo de atividade/inatividade. Caso o tuco-tuco ocupasse uma área grande e se deslocasse muito, erros inerentes do método não interfeririam na investigação do ritmo de atividade/inatividade, pois seria possível estimar sem maiores problemas a diferença do deslocamento durante dia e noite. Entretanto como os animais ocupam uma área pequena, os erros grandes, às vezes do tamanho da área ocupada pelo animal, impedem a investigação do quanto cada animal se desloca por hora. Dessa forma não é possível determinar em que fase os animais se deslocam mais, ou seja, qual a fase de atividade.

Figura 6: Gráficos mostrando os pontos de localização do controle (sensor parado, primeiro gráfico) e dos 2 animais (demais gráficos) medidos a cada hora, durante 3 dias. Todos os pontos obtidos ao longo do experimento estão juntos sem distinção de fase. Os eixos mostram as coordenadas geográficas em UTM (Sistema Universal Transverso de Mercator) “x” (no eixo x) e “y” (no eixo y) relativas à posição estimada do animal ou controle. Nota: apenas dois animais foram monitorados devido a uma falha no equipamento do terceiro animal.

Parte 2: Observações contínuas

A falta de um equipamento para medir a exposição à luz impossibilitava seu registro automatizado. Entretanto, a realização de observações contínuas durante as horas de claro do dia, ainda que mais trabalhosa do que o registro automatizado, também possibilitaria a obtenção do padrão de exposição à luz. Com este procedimento é possível registrar o momento e duração de todas as saídas durante as horas de claro do dia e relacionar essas saídas ao quanto o animal se expõe à luz, diariamente. Além disso, diferentemente do registro automatizado, a observação contínua permite que sejam caracterizados os comportamentos que levam esses animais a saírem de seus túneis e, conseqüentemente, se exporem à luz. De forma complementar também poderiam ser tomadas medidas das variáveis ambientais, como temperatura (resultados descritos no Capítulo 5).

Este tipo de estudo exige que um mesmo indivíduo seja acompanhado continuamente, pois o interesse, neste caso, está no padrão individual e não no populacional. Assim, é preciso garantir que o indivíduo estudado, em campo, possa ser facilmente identificado, observado e, caso seja necessário, capturado. Tais exigências são dificultadas pelas características dos animais: o porte pequeno, a coloração de tom semelhante ao solo e o hábito de vida subterrâneo, que torna difícil tanto a localização e identificação quanto a captura.

Outro problema do estudo em campo é a possibilidade de predação. Apesar da proteção que a vida abaixo da terra, teoricamente, proporciona, os roedores subterrâneos parecem ser parte importante da dieta de muitos animais, como aves de rapina (inclusive corujas), raposas, furões, gambás, tatus e serpentes (Vassalo *et al.*, 1994; Busch *et al.*, 2000). Portanto, para se estudar tuco-tucos, em campo, também é necessário garantir que os animais estejam protegidos de predadores e que seja possível recuperá-los.

Uma forma de manter certo controle sobre o experimento, solucionando os problemas apontados anteriormente, sem remover o animal, totalmente, de seu ambiente, como nos trabalhos em laboratório, é realizar um estudo em condições semi-naturais. Estudos em “arenas experimentais” foram, inclusive, relatados por Calisi e Bentley (2009) como uma das melhores formas de se estudar a fisiologia e o comportamento, quando a investigação não envolve interações ecológicas.

Os dados obtidos com a rádio-telemetria, descritos anteriormente mostraram que os tuco-tucos não se deslocam excessivamente. Portanto, a realização de um estudo em condições semi-naturais seria viável. Ou seja, os indivíduos podem ser estudados em uma arena experimental cercada que, além de facilitar a localização e identificação, mantém os animais protegidos de predadores e impedidos de fugir. Além disso, com a liberação de somente um animal por vez e devido ao tamanho da arena experimental, seria possível detectar todas as saídas.

Uma vez que os experimentos prévios em laboratório mostraram que os tuco-tucos são roedores noturnos, cujos ritmos são passíveis de sincronização pelo ciclo claro/escuro, era de se esperar saídas em algum momento das horas de claro do dia. Entretanto, considerando que são noturnos em laboratório, esperava-se que as saídas seriam muito breves e que muito provavelmente não ocorreriam todos os dias.

Material e métodos

a) Arena experimental

A arena experimental foi construída dentro da área de estudos (descrita na parte 1 deste capítulo), a aproximadamente 200 m de distância do centro de pesquisas. A área escolhida foi cercada com uma grade de arame que não permitia a passagem do animal. Media 10 m de comprimento por 5 m de largura, 1 m de altura e se estendia por mais 1 m para baixo da terra (Fig. 7). As dimensões foram baseadas na área de vida descrita para *Ctenomys talarum* (Cutrera *et al.*, 2006). E os estudos anteriores com rádio-telemetria (parte 1 desse capítulo) confirmaram que os animais não se deslocam excessivamente. Predadores aéreos eram evitados por um teto construído com a mesma grade de arame utilizada no restante da arena. A arena foi projetada para acomodar apenas um animal por vez, pois essa espécie de tuco-tuco é solitária. Além disso, seria difícil distinguir os indivíduos caso fosse liberado mais de um por vez mesmo local. Dentro dessa arena experimental, em todas as estações (mas em quantidades variadas) estavam presentes plantas nativas.

Figura 7. Fotografia (a) e esquema (b) da arena experimental construída para o experimento de campo.

b) Animais

Todos os indivíduos utilizados neste trabalho provêm de uma única localidade de dimensões bem restritas, para certificar-se que estamos lidando com uma única espécie.

Os animais são capturados sem a necessidade de iscas, utilizando-se armadilhas feitas de tubos plásticos de aproximadamente 25 cm de comprimento e 7,5 cm de largura. Uma extremidade é fechada com uma tela de arame de forma a não permitir a passagem do animal e a outra extremidade apresenta uma portinhola que se fecha quando o animal entra no tubo e pisa em uma plataforma. O risco do animal se machucar é mínimo.

As armadilhas são colocadas horizontalmente dentro de túneis abertos recentemente, identificados pela presença de montes com grande quantidade de terra recém removida, que, em geral, é mais úmida e escura. O lado da tela de arame permanece virado para fora do túnel e parcialmente descoberto. Ao detectar que o túnel foi aberto, os animais entram na armadilha com a intenção de fechá-lo e acabam presos. Como, às vezes, os animais preenchem as armadilhas com terra, mas não ficam presos, e devido aos possíveis riscos de deixá-los dentro das armadilhas por muito tempo (calor, frio ou predação), as armadilhas eram sempre checadas a cada uma ou duas horas.

A captura e manutenção de tuco-tucos em cativeiro, bem como os experimentos descritos neste trabalho, foram autorizados pela *Secretaria de Ambiente, Ministerio de Producción y Desarrollo Local*, registration n°062-08. O estudo também seguiu as recomendações da *American Society of Mammalogists for animal care and handling* (Sikes & Gannon, 2011).

c) Observações

O experimento consistiu na realização de observações contínuas onde o observador se posicionava a uma distância de, aproximadamente, dois metros da arena experimental, atrás de uma cerca, e observava ininterruptamente o animal enquanto houvesse luz natural. Essa distância parecia ser suficiente para que a presença do observador não interferisse no comportamento do animal. Todas as saídas foram anotadas, tomando-se o cuidado de marcar o momento da saída e a duração da mesma (Anexo 3). Também foi feita uma breve classificação do comportamento que o animal realizava quando saía de seus túneis.

Neste experimento, foram utilizadas três fêmeas adultas (de idade indefinida), uma de cada vez (Anexo 2). As observações foram realizadas em três estações, sendo uma fêmea observada em cada estação: verão de 2010 por 11 dias (1 a 11 de Março), inverno de 2010 por 11 dias (26 de Julho a 6 de Agosto) e verão de 2011 por 10 dias (1 a 10 de Março). Em cada estação, um animal era liberado dentro da arena experimental, onde ele imediatamente escavava seu próprio sistema de túneis. No ano de 2010 as observações do verão se iniciaram 12 dias após a liberação e no inverno elas se iniciaram quatro dias depois da liberação. No verão de 2011 as observações se iniciaram 6 dias após a liberação do animal.

As observações iniciavam-se ao nascer do sol e terminavam quando não havia mais luz natural (das 06:30h às 20:30h no verão e das 07:50h às 19:10h no inverno). Durante o verão de 2011 (e também durante o inverno de 2010, mas de forma menos sistemática) em todas as manhãs antes do início das observações, buscaram-se evidências de atividade noturna do animal (montes de terra próximos aos buracos que não estavam presentes durante o dia anterior).

Resultados

Como são animais noturnos em laboratório, inicialmente pensava-se que o número de saídas durante as horas de claro seria baixo. Entretanto os animais se expõem à luz diariamente e durante um tempo muito mais longo do que se imaginava. As saídas possuem uma duração variada, mas podem se estender até mesmo por horas. Ou seja, os resultados mostram que os animais surpreendentemente apresentaram-se muito ativos durante as horas de claro em campo (Fig. 8).

Figura 8: Padrão de exposição à luz de três indivíduos continuamente observados em campo durante as horas de claro do dia. Os gráficos indicam episódios de saídas dos túneis (marcações em preto) que levaram à consequente exposição à luz. Primeiro gráfico: animal observado no verão de 2010; Segundo: animal observado no inverno de 2010; Terceiro: animal observado no verão de 2011. A porção em cinza-escuro do gráfico representa a duração da noite (quando não ocorreram observações) e as linhas verticais mostram o crepúsculo astronômico (A) (quando o sol está a 18° abaixo do horizonte) e o crepúsculo civil (C) (quando o sol está a 6° abaixo do horizonte) de acordo com o endereço eletrônico *U.S. Naval Oceanography Portal* (www.usno.navy.mil).

Essa grande quantidade de saídas observada foi um resultado totalmente inesperado para um animal que é noturno em laboratório. A caracterização do tipo de atividade realizada quando o animal estava fora de seu túnel revelou que a exposição à luz ocorria principalmente para a execução de duas atividades que são muito relevantes para um roedor subterrâneo: a remoção de terra de seus túneis e o forrageamento (Fig. 9).

Forrageamento

Escavação

Figura 9: Fotografias e representação esquemática dos dois tipos de atividade realizados pelo animal durante as saídas: coleta de material vegetal próximo à entrada dos túneis (forrageamento) e remoção de terra de dentro dos túneis (escavação).

Foi classificado como forrageamento qualquer atividade na qual o animal saía de seu túnel e se dirigia às plantas próximas, ou ao material vegetal no solo, coletando-as e levando-as para dentro de seus túneis para alimentação ou confecção de ninho (Fig. 9). Na Tabela 1 estão marcadas as espécies de plantas presentes na arena experimental durante o trabalho no verão de 2011, destacando aquelas que o animal coletou e levou para os túneis.

Tabela 1: Espécies vegetais presentes na arena experimental durante o verão de 2011 e quais foram coletadas pelo animal. Identificação por Adriana Aranda Rickert.

Espécie	Família	Nome pop. (Brasil)	Coletada?
<i>Eupatorium</i> sp.	Asteraceae		sim
<i>Parthenium hysterophorus</i>	Asteraceae	losna-branca	sim
<i>Lepidium</i> sp.	Brassicaceae		
<i>Boerhavia diffusa</i>	Nyctaginaceae	erva-tostão	
<i>Petunia axillari</i> s	Solanaceae	petúnia-branca	sim
<i>Tríbulus terrestris</i>	Zygophyllaceae	videira da punctura	sim

A remoção de terra era facilmente distinguível do forrageamento (Fig. 9), ainda que as duas atividades pudessem ocorrer sequencialmente e, por vezes, o animal pudesse alternar entre os dois comportamentos. Durante os episódios de remoção de terra, o animal permanecia por um longo tempo chutando a terra para fora de seu túnel. Este é um comportamento típico já descrito para esses animais que, quando dentro de seus túneis, fragmentam o solo utilizando as garras e os dentes, posteriormente arremessando o solo solto por meio de fortes chutes (Fig. 9) (Camin *et al.*, 1995). Portanto, essa terra arremessada para fora provavelmente provém de uma escavação de dentro dos túneis que serviria para aumentar a extensão das galerias subterrâneas. Nesse sentido, os animais estão constantemente renovando seus túneis, abrindo novos caminhos e fechando antigos.

Os dados de escavação e forrageamento foram comparados entre si e em relação a cada estação (Fig. 10). Em todas as estações os episódios de escavação eram mais longos do que o forrageamento, o que não é estranho, visto que cada episódio isolado de escavação realmente toma mais tempo do que cada episódio isolado de forrageamento. As escavações poderiam durar até uma hora, enquanto que os episódios de forrageamento em geral duravam poucos minutos, com breves saídas para coleta de plantas. No inverno de 2010 ambas as atividades ocorreram por mais tempo do que nas duas observações de verão. E no verão de 2010 as duas atividades foram um pouco mais longas do que no verão de 2011.

Figura 10: Tempo total gasto pelos animais com cada tipo de atividade (escavação ou forrageamento) em cada uma das três observações que duraram o tempo indicado na Fig.8.

Os animais nunca saíam muito mais do que o tamanho de seu corpo para fora dos túneis (Fig. 9) e em todas as ocasiões se mostravam vigilantes, olhando atentamente ao redor, antes de iniciar qualquer atividade. Em alguns casos, mais de um buraco podia ser utilizado no mesmo dia e algumas vezes o animal alternava entre um ou outro buraco aberto. Nem sempre ao trocar de túnel, o anterior era fechado, podendo ser utilizado novamente no dia seguinte.

Foram observados três animais, um em cada estação, portanto alguns aspectos podem corresponder a uma variabilidade individual, entretanto especulamos que a variação do pico de saídas, dependendo da estação em que as observações foram realizadas, sugere a existência de uma variação sazonal. As saídas no inverno são concentradas no meio do dia, enquanto que no verão elas se concentram pela manhã. No caso das duas observações que ocorreram no verão (2010 e 2011), apesar da coincidência dos picos de saída, também podem ser observadas diferenças consideráveis em relação ao padrão de saídas, com a atividade muito mais concentrada na manhã em 2011 do que em 2010, sem se estender ao longo da tarde. No verão de 2010, essas saídas ocorreram em maior quantidade e espalhadas ao longo do dia. Mesmo assim, a concentração na manhã foi mantida. Já no inverno, a quantidade de saídas foi muito maior do que nos dois verões (Fig. 11).

Figura 11: Comparação do tempo gasto na superfície por cada animal durante as horas de claro do dia, em cada uma das estações (soma do tempo em que cada animal permaneceu fora de seu túnel, considerando todos os dias de observação em cada estação). A duração total corresponde àquela da Figura 8.

Além das observações da atividade dos três indivíduos em arena experimental, nós também temos indicações de que animais de vida livre, de forma similar, apresentam atividade durante as horas de claro do dia. Alguns animais foram observados saindo de seus túneis próximos à arena experimental e, em uma ocasião foi observado um tuco-tuco escavando por mais de 40 minutos (ver Anexo 4). As vocalizações, ouvidas ao longo das horas de claro do dia (Anexo 4), também indicam existência de atividade durante as horas de claro do dia.

Discussão

Com base nas observações, é possível afirmar que, devido à grande quantidade de escavações e forrageamento ocorrendo durante o dia, os animais apresentam uma atividade robusta ocorrendo durante as horas de claro do dia. Essa atividade observada corresponderia a um componente diurno da atividade total que, aparentemente, não existe no laboratório. Porém, as observações não permitiam determinar o que estaria acontecendo abaixo da terra e à noite, portanto, seria necessário um estudo complementar para dar continuidade a essa investigação.

O horário do pico de saídas dos dois verões foi exatamente o mesmo nos dois verões, concentrando-se na manhã entre 9:00h e 10:00h. Por outro lado, o horário do

pico de saídas do inverno foi bastante distinto, ocorrendo no meio do dia, entre 12:00h e 14:00.

A existência de uma coincidência tão precisa no pico dos dois verões é muito interessante e sugere que o fator ou condição ambiental responsável por esse horário tão preciso de saídas esteja presente nos dois anos estudados, por exemplo, a temperatura ambiente que variou pouco entre os dois anos (esse fator será melhor explorado no capítulo 5).

Capítulo 3: Pós-efeitos da sincronização em campo

Introdução

Os resultados apresentados no capítulo anterior mostram que os tuco-tucos apresentam uma grande quantidade de atividade na superfície durante as horas de claro do dia, na arena semi-natural. Tais resultados foram inesperados visto que os animais em condições de CE 12:12 do laboratório, são claramente noturnos, com sua atividade concentrada totalmente na fase de escuro. Entretanto, não sabíamos o quanto essa atividade observada durante as horas de claro e na superfície corresponderia à atividade diária total desses animais. As observações contínuas, justamente por inicialmente terem sido adotadas para averiguar a exposição à luz, não nos permitem conhecer a atividade subterrânea e nem aquela que pode estar ocorrendo durante a noite.

Este segundo capítulo trata dos experimentos realizados em laboratório para complementar as medidas na arena e traçar um perfil mais completo da fase de atividade em campo. Como os equipamentos que poderiam medir diretamente o ritmo de atividade/inatividade em campo não funcionaram e a rádio-telemetria foi pouco precisa era necessário pensar em alguma forma alternativa para obter informações sobre atividade durante a noite. A solução encontrada foi recorrer ao fenômeno chamado **pós-efeito**. Como explicado no capítulo 1, o pós-efeito é um fenômeno fundamental apresentado pelos osciladores circadianos e corresponde à manutenção do período e fase do oscilador arrastado durante os primeiros dias em condições constantes após a transferência de uma condição sincronizada (Pittendrigh & Daan, 1976a). Em laboratório o ritmo de atividade/inatividade dos tuco-tucos apresentam pós-efeitos da sincronização e estes são facilmente identificados (Valentinuzzi *et al.*, 2009) (Fig. 12). Assim seria de se esperar que tuco-tucos em condições naturais também apresentassem pós-efeito ao serem colocados em condições constantes, caso seu ritmo de atividade/inatividade estivesse sincronizado, previamente, em campo. O registro inicial em laboratório iria corresponder à sincronização em campo, com a manutenção, por alguns ciclos, do período (24h) e com a mesma fase de atividade. Percebeu-se então que essa propriedade dos osciladores poderia nos servir como marcadora da ocorrência de sincronização e da fase de atividade em campo.

Figura 12: Pós-efeitos do arrastamento em laboratório após ciclo claro/escuro. Actograma em duplo-gráfico de um animal em 21 dias de claro/escuro CE 12:12 (12 horas de claro e 12 horas de escuro) e posteriormente colocado em escuro constante (EE). O fundo branco do gráfico representa as horas de claro, enquanto que a porção cinza representa as horas de escuro. O período em livre-curso (τ) desse animal é de aproximadamente 24,18 h. Os dias de pós-efeito desse animal estão indicados no gráfico. Imagem modificada de Valentinuzzi e col. (2009).

Considerando que os tuco-tucos apresentam uma grande quantidade de atividade fora da terra durante as horas de claro do dia, existiam duas possibilidades:

Primeiramente os animais poderiam estar com seu ritmo sincronizado e ter sua atividade concentrada nas horas de claro do dia, o que os caracterizaria como diurnos em campo. Nesse caso, quando colocados em condições constantes, a fase de atividade do ritmo de atividade/inatividade ocorreria no momento correspondente à fase de claro do dia externo.

A segunda possibilidade era encontrar uma arritmicidade. Ou seja, os animais não teriam seus osciladores arrastados em campo e, dessa forma, a atividade observada durante as horas de claro seria apenas um fragmento do restante da atividade, que poderia ocorrer em qualquer momento das 24 horas do dia.

Em outras palavras, esperávamos que na natureza os animais fossem diurnos ou arrítmicos, em contraste com o laboratório onde são noturnos.

Material e métodos gerais

a) Animais e registro

Em todos os experimentos, a captura dos animais ocorreu da mesma forma que descrito no Capítulo 1. Os animais foram mantidos em gaiolas de acrílico (53 x 29 x 27 cm) com rodas de atividade (23 cm de diâmetro, 10 cm de largura, 1 cm entre as barras) ou em gaiolas de vidro (37 x 26 x 21 cm) com sensores de movimento (infravermelho) presos à tampa da gaiola. O número de revoluções da roda de atividades e o número de interrupções dos feixes de infravermelho do sensor de movimento foram registrados a cada 5 minutos por meio do programa *ArChron Data Acquisition System* (Simonetta System, Universidad Nacional de Quilmes, Buenos Aires). A confecção e análise de actogramas foi realizada com o software *El Temps* (A. Díez-Noguera, Universitat de Barcelona, 1999).

b) Condições constantes

Os animais recém capturados foram colocados em condições constantes do laboratório. O “escuro constante” na realidade consistiu em uma condição de luz vermelha constante de baixíssima intensidade (1~5 lux), necessária para a limpeza e alimentação. Essa iluminação era provida por duas lâmpadas vermelhas incandescentes (Philips 40/25W) conectadas a um dimmer (Teclastar Milano, 200W) que possibilitava regular sua intensidade. A temperatura também era mantida constante ($23 \pm 2^\circ\text{C}$).

A alimentação consistia em cenouras, batata doce, ração para coelhos, sementes de girassol, folhas verdes ou grama. Um ou mais itens eram fornecidos todos os dias em horários variados. Os tuco-tucos obtêm água diretamente dos alimentos, dessa forma, não foi preciso oferecer água. As gaiolas eram forradas com uma camada de papel picado e as limpezas ocorriam uma vez por semana.

Parte I. Transferência dos animais da arena semi-natural para condições constantes.

Material e métodos

Os mesmos animais utilizados no experimento descrito no capítulo anterior (capítulo 2, Parte 2: Observações diretas) foram transferidos da arena diretamente para as condições constantes, ao final das observações. Sua atividade locomotora foi monitorada por meio de sensores de movimento (infravermelho). Os animais foram mantidos nessas condições por 15 dias (animal do verão de 2010), 10 dias (animal do inverno de 2010) ou 5 dias (animal do verão de 2011). Esse número de dias foi suficiente para detectar sincronização e fase de atividade através dos pós-efeitos.

Resultados

Os pós-efeitos do arrastamento mostraram um ritmo robusto de atividade/inatividade, com período de 24 horas. Mas, surpreendentemente, a atividade expressa durante as horas de claro do dia em campo passava a não ser mais expressa em condições constantes. Além disso, também foi observada uma atividade robusta concentrada na fase correspondente à noite no campo (Fig. 13). Ou seja, o oscilador arrastado determinaria a expressão de uma atividade noturna. Esta atividade não mostrou sinais de ciclos transientes, o que seria esperado no caso de uma re-sincronização. Transientes indicariam que os tuco-tucos teriam atividade durante as horas de claro ou seriam arrítmicos, mas gradativamente se tornassem noturnos em laboratório.

Figura 13: Pós-efeitos de arrastamento, de animais transferidos da arena experimental para condições constantes. Cada figura representa os dados das observações em campo (copiados da Fig. 8 do Capítulo 2) e a atividade detectada por sensor de movimento (infravermelho) em condições constantes do laboratório, ambos em actogramas duplicados horizontalmente: Primeiro gráfico: verão de 2010; Segundo: inverno de 2010; Terceiro: verão de 2011. As setas verticais indicam o momento que o animal foi colocado no laboratório e a coleta de dados por sensor de movimento foi iniciada. O fundo cinza-claro representa o escuro constante (luz vermelha tênue) em laboratório, enquanto o fundo branco e cinza-escuro representa o ciclo claro-escuro natural em campo (dados dos crepúsculos astronômico e civil de acordo com U.S. Naval Oceanography Portal, www.usno.navy.mil). Diferenças no intervalo entre o fim das observações e o início do registro em laboratório são devidas ao tempo que foi necessário para recapturar cada animal.

Parte II. Transferência dos animais, diretamente do campo para condições constantes.

Uma vez que o experimento anterior lidou apenas com animais que estavam em condições semi-naturais, decidiu-se testar se os resultados observados poderiam estar relacionados com as condições semi-naturais da arena experimental. Além disso, a forma de medir os ritmos de atividade/inatividade poderia ser responsável por mudanças na fase de atividade. Rodas de atividade, por exemplo, são responsáveis por deslocar a fase de atividade, em laboratório, para algumas espécies (Blanchong *et al.*, 1999; Kas & Edgar, 1999). Assim, ao colocar um grupo em rodas de atividade e um grupo em sensores de movimento seria possível averiguar essa possibilidade. Finalmente, esta etapa permitia a medida em número maior de indivíduos.

Material e métodos

Dez animais foram capturados diretamente do campo e levados imediatamente para as condições constantes em laboratório. Essas capturas ocorreram entre os meses de Maio e Agosto (2010), tentando-se capturar animais em diferentes horas do dia.

Desses dez animais capturados, cinco foram acondicionados em gaiolas com rodas de atividade, enquanto que os outros cinco foram colocados em gaiolas com sensores de movimento. Dessa forma, também seria possível averiguar possíveis efeitos do método de registro sobre a fase de atividade.

Resultados

De forma muito semelhante aos animais trazidos diretamente da área cercada a condições constantes, os animais trazidos diretamente do campo apresentaram um ritmo robusto de atividade/inatividade, com período de 24 horas e com a fase de atividade ocorrendo no momento correspondente à noite em campo, mas sem sinais de atividade durante a fase correspondente ao dia (Fig. 14).

Além disso, a presença de rodas de atividade não foi responsável pela modificação da fase de atividade dos animais. As médias dos inícios e finais da atividade foram calculadas traçando-se uma reta média por todos os inícios ou finais da

atividade (utilizando-se o programa *El-Temps*). A média do horário de início da atividade do grupo com sensores de movimento foi 19 h 30 (± 16 min), enquanto que a média do horário de final da atividade 8 h 43 (± 24 min). No caso dos animais com acesso a rodas de atividade a média do horário de início da atividade foi 19 h 30 (± 17 min) e de final foi 8 h 48 (± 51 min). A comparação dos valores médios de inícios e fins da atividade entre os grupos com e sem roda não mostra diferenças significativas (Teste-T Student: início da atividade $p = 1$, final da atividade $p = 0,8$). Assim, diferentemente do que é relatado na literatura para outras espécies, o acesso às rodas de atividade não modifica a fase de atividade dos tuco-tucos.

Discussão

Ainda que os experimentos deste capítulo tenham sido realizados integralmente em laboratório, seu intuito foi investigar o que estava ocorrendo previamente em campo. Isso foi possível pois, após a transferência para condições constantes, os pós-efeitos do arrastamento em campo observados mostraram o que estava ocorrendo com o oscilador previamente em campo.

O pós-efeito tanto de animais em arenas experimentais quanto de animais selvagens foi similar: nos dois casos observou-se um período de 24 horas, indicativo de sincronização por ciclo diário. Portanto, como o pós-efeito se mostrou como um ritmo com período de 24 horas pode-se dizer que o oscilador do tuco-tuco encontra-se arrastado em campo. Além disso, a fase de atividade nos dois casos ocorreu no momento correspondeu à noite em campo.

Entretanto, não foram observados ciclos transientes imediatamente após a transição do campo para as condições constantes em nenhum dos 13 animais levados diretamente ao laboratório. A ausência de ciclos transientes indica que a fase do oscilador é a mesma em campo (pós-efeito, Fig. 13 e 14) e laboratório (em ciclo claro/escuro, Fig. 12), ou seja, o oscilador, nos dois casos, determina que a atividade se expresse durante a noite. Porém, as observações em campo revelaram que o animal expressa atividades robustas de escavação e forrageamento durante o dia em campo, que desaparecem na transição. Isso indica que essas importantes atividades não são temporalmente determinadas pelo oscilador circadiano. Esse fato será investigado nos capítulos seguintes.

Figura 14: Pós-efeito do arrastamento, de animais transferidos diretamente do campo para as condições constantes do laboratório. Os actogramas duplicados horizontalmente mostram os dados de 5 indivíduos em sensores de infravermelho (esquerda) e 5 indivíduos e rodas de atividade (direita). Em todos os casos a atividade estava concentrada na fase correspondente à noite em campo (das 19:00h às 07:00h). As setas verticais indicam o momento que o animal foi colocado no laboratório e começou o registro. O fundo cinza-claro representa o escuro constante do laboratório enquanto que o fundo branco e cinza-escuro representa o claro-escuro natural em campo (dados do crepúsculo civil de acordo com *U.S. Naval Oceanography Portal*, www.usno.navy.mil).

Capítulo 4: Diurnos ou noturnos?

1. Introdução

As observações descritas no Capítulo 1 revelaram que os tuco-tucos se expõem à luz durante saídas de seus túneis. Estas saídas podem durar de poucos minutos a horas e ocorrem de forma esparsa ao longo das horas de claro do dia. Tais resultados são distintos daqueles encontrados para esquilos (*Spermophilus citellus*), não subterrâneos, que estão expostos à luz de forma praticamente contínua (Hut *et al.*, 1999). O padrão de exposição à luz dos tuco-tucos é, como suspeitado, mais condizente com o encontrado nos esquilos voadores estudados por DeCoursey (1986). Mesmo assim, existe uma peculiaridade: enquanto nos esquilos voadores noturnos (*Glaucomys volans*) a exposição à luz era restrita a um pequeno intervalo do dia e não acontecia todos os dias, os tuco-tucos, por outro lado, apresentaram uma longa exposição à luz e durante todos os dias de observação.

Esse grande número de saídas que os animais realizam durante as horas de claro do dia é surpreendente. Os tuco-tucos são noturnos em condições de laboratório, mas o padrão observado indica, em campo, a existência de um componente diurno da atividade. Assim, apesar de não se ter conhecimento da atividade subterrânea e noturna, os dados de campo sugeriram, em um primeiro momento, que os tuco-tucos eram mais uma espécie cuja fase de atividade em campo é diferente daquela em laboratório.

2. Mudanças de Nicho Temporal

O fenômeno da mudança de “noturnalidade” para “diurnalidade” foi observado em outras espécies, como, por exemplo, o *spiny mouse* (*Acomys russatus*), um murídeo asiático. Este roedor de deserto (não subterrâneo) também se mostra ativo durante o dia em campo, mas é predominantemente noturno em laboratório (Kronfeld-Schor & Dayan, 2003; Levy *et al.*, 2007; Kronfeld-Schor & Dayan, 2008). Outro exemplo é o roedor subterrâneo social coruro (*Salacopus cyanus*), que também é diurno em vida livre, mas em laboratório apresenta um ritmo de atividade/inatividade com a fase de atividade ocorrendo durante a fase de escuro do ciclo. Nesse caso foi proposto que a

diferença de fase seria desencadeada pelas condições artificiais do cativeiro (Begall *et al.*, 2002; Rezende *et al.*, 2003; Urrejola *et al.*, 2005). Esses resultados são intrigantes, pois mostram que aquilo que se observa em campo nem sempre corresponde ao que se registra em laboratório.

As diferenças que podem existir entre campo e laboratório são reconhecidas e relatadas na literatura para diversas variáveis fisiológicas e comportamentais (Calisi & Bentley, 2009). Essa troca de nicho temporal poderia ser mais um exemplo dessas diferenças, desta vez envolvendo o estudo dos ritmos. Por isso, é importante realizar trabalhos que integrem abordagens cronobiológicas de campo e de laboratório. Com o recente aumento no número de espécies selvagens estudadas pela Cronobiologia (Menaker, 2006), é possível averiguar a generalidade dessas ocorrências e especular quais seriam os mecanismos responsáveis pelas trocas e por que elas ocorrem.

Apesar de parecer uma característica bastante óbvia, nem sempre é fácil determinar a fase de atividade de uma espécie. Estudos sistemáticos em campo são difíceis de serem executados, pois exigem observações em intervalos regulares, durante dias e noites consecutivos. Além dos problemas inerentes da coleta de dados, um número considerável de animais apresenta mudanças no nicho temporal, mesmo em condições naturais, o que torna mais difícil a caracterização de determinadas espécies em diurnas ou noturnas (Refinetti, 2008). Por exemplo, na época da migração, várias espécies de aves migratórias normalmente diurnas mudam seu padrão normal e concentram os vôos migratórios durante a noite (Berthold, 2001). Existem também evidências de animais que mudam sua fase de atividade devido a atividades humanas, como a caça, e concentram sua atividade nos momentos do dia em que são mais dificilmente localizados. Um exemplo deste caso é o coiote (*Canis latrans*; Canidae), que, após a diminuição da pressão de caça, voltou a apresentar atividade diurna (Kitchen *et al.*, 2000).

Vários trabalhos têm investigado as causas das mudanças de nicho temporal observadas na natureza, realizados com diversos grupos, como roedores e primatas. Por exemplo, os *Nile grass rats* (*Arvicanthis niloticus*; Muridae) sempre levantaram dúvidas sobre seus padrões de atividade em campo: alguns autores afirmavam que seriam diurnos e outros que seriam noturnos. Blanchong e col. (1999) e Blanchong e Smale (2000) estudaram de forma sistemática o padrão de atividade desses animais em laboratório e em campo e constataram que a população era diurna tanto em campo

quanto no laboratório. A controvérsia na literatura sobre as observações em campo poderia ser devido a confusões taxonômicas na identificação das espécies de *Arvicanthis* (Blanchong *et al.*, 1999). Por outro lado, foi descoberto que os animais tornavam-se noturnos, em laboratório, na presença de rodas de atividade. Estes estudos contribuíram para a investigação de que a atividade intensa, estimulada pela presença da roda de atividade, exerce retroalimentação sobre o passo do próprio oscilador que controla o ritmo de atividade/inatividade. Esse é um fenômeno conhecido e foi explorado por Redlin e Mrosovsky (2004).

Erkert e Cramer (2006) estudaram em laboratório o padrão incomum de atividade dos primatas dos gêneros *Aotus* (família Aotidae) e *Eulemur* (família Lemnidae), que modificavam sua atividade noturna dependendo da exposição a diferentes intensidades luminosas dos ciclos lunares. Esses autores observaram que em laboratório os animais apresentavam um ritmo endógeno de atividade passível de sincronização por um ciclo claro/escuro diário e com a atividade ocorrendo na fase de escuro. O padrão de atividade de *Eulemur fulvus* foi reproduzido, em laboratório, com a manipulação da intensidade luminosa durante a fase correspondente ao escuro, simulando diferentes fases da lua. Dessa forma, concluiu-se que os padrões de atividade desta espécie poderiam ser resultado do mascaramento da expressão da atividade por ciclos lunares. Nesse caso, condições de pouca iluminação inibiriam a atividade noturna, deslocando-a para momentos do dia com intensidade luminosa mais alta. Dessa forma, em noites de lua nova a atividade é deslocada para os crepúsculos.

3. Mecanismos de definição da noturnidade/diurnidade

Uma questão anterior às razões pelas quais a troca de nicho temporal ocorreria seria: “o que leva um animal diurno a ser diurno e um noturno a ser noturno?” Essa é uma questão que tem ganhado mais importância no estudo dos ritmos nos últimos anos (Smale, *et al.*, 2003; Refinetti, 2008). Assim, em que componente do sistema de temporização circadiano os animais diurnos seriam distintos dos noturnos: na aferência, no oscilador ou na eferência? A resposta poderia trazer pistas sobre as bases mecânicas responsáveis pelas mudanças no nicho temporal.

Smale e col. (2003), em uma revisão sobre essas questões, levantaram as possíveis diferenças anatômicas e moleculares entre animais diurnos e noturnos e fizeram comparações em diferentes níveis.

O oscilador central dos mamíferos, por exemplo poderia diferir de alguma forma entre diurnos e noturnos. Por exemplo, os núcleos supraquiasmáticos poderiam ter diferenças no tamanho, na forma e também nas conexões e organização dos neurônios que o compõem (ver também Cohen *et al.*, 2010).

As diferenças também poderiam residir nas eferências e, com isso, diurnos e noturnos seriam definidos na resposta diferenciada dos alvos da informação temporal oriunda dos núcleos supraquiasmáticos.

Por fim, poderiam existir diferenças nas aferências, por exemplo, nos fotorreceptores ou demais órgãos sensoriais que fariam com que animais permanecessem ativos em um momento e não em outro. Nesse caso, vias responsáveis pelo mascaramento poderiam também estar envolvidas (Mrosovsky & Hattar, 2005).

Até o presente momento não existem evidências de diferenças nos osciladores de mamíferos diurnos e noturnos. Não foram encontradas diferenças significativas nas propriedades listadas acima sobre os núcleos supraquiasmáticos em estudos comparativos utilizando-se mamíferos diurnos e noturnos (Smale *et al.*, 2003). Dessa forma as investigações acabaram se concentrando nas eferências, particularmente focadas nas células-alvo que recebem a informação rítmica dos núcleos supraquiasmáticos e que poderiam responder diferentemente em animais diurnos e noturnos (Mrosovsky, 2003; Smale *et al.*, 2003).

No caso do tuco-tuco, por outro lado, a existência de atividade durante as horas de claro do dia envolveria uma modificação um pouco distinta das descritas acima. Nesse caso, um componente diurno da atividade foi observado na arena semi-natural, mas os animais eram claramente noturnos em laboratório sob CE 12:12 (Valentinuzzi et al, 2009). No nosso trabalho com tuco-tucos em campo, porém, não tínhamos a caracterização completa da atividade, pois as observações só podiam mostrar a atividade fora dos túneis e durante as horas de claro do dia. Para verificar o quanto da atividade dos tuco-tucos observada acima da terra estaria relacionada à atividade total em campo, foram utilizados os pós-efeitos do arrastamento em campo. Assumindo-se que o oscilador determina diretamente a fase de atividade, especulava-se que o pós-efeito mostraria um ritmo cuja fase de atividade ocorreria no momento correspondente às

horas de claro em campo, o que demonstraria que a fase de atividade do ritmo em campo é a de um animal diurno. Por outro lado, também seria possível observar uma arritmicidade, o que demonstraria que o ritmo de atividade/inatividade dos tuco-tucos não está sincronizado em campo e que a atividade “diurna” observada é apenas um fragmento de uma atividade expressa ao longo das 24 horas do dia.

Surpreendentemente, os animais ativos durante o dia no campo não mostraram traço algum de arritmicidade ou diurnalidade após a transferência para o laboratório em condições constantes e sim um ritmo com período de 24 horas e com a fase de atividade robusta ocorrendo no momento que corresponderia à noite em campo. Esse padrão foi muito consistente, verificado não apenas nos animais observados na arena experimental, como também em todos aqueles capturados diretamente na natureza. Além disso, independente da presença de rodas de atividade o padrão se manteve, o que exclui a possibilidade da diferença entre campo e laboratório ser devida a essa forma de registro, como reportado para os *Nile grass rats* (*Arvicanthis niloticus*) (Blanchong *et al.*, 1999) e degus (*Octodon degus*; Octodontidae) (Kas & Edgar, 1999).

Dessa forma, não está ocorrendo uma mudança na fase do oscilador no laboratório em relação ao campo. O que se observa durante o dia em campo é a expressão de um novo componente da atividade, independente da atividade expressa exclusivamente na fase de escuro em laboratório ou daquela observada nos pós-efeitos de laboratório. Portanto, os pós-efeitos revelaram que os osciladores dos tuco-tucos, apesar de arrastados em campo, não estavam em uma fase correspondente ao que seria esperado de um animal diurno ou arritmico.

Este foi um resultado intrigante, pois o oscilador (central), localizado nos núcleos supraquiasmáticos dos mamíferos é a estrutura que fornece a informação sobre período e fase ao resto do organismo e, portanto, controla os ritmos. E o ritmo de atividade/inatividade é considerado um componente emergente de diversos outros ritmos, e, dessa forma, considerado como um ritmo que marca a fase do oscilador circadiano. Então no caso dos tuco-tucos poderia não existir correspondência entre a fase do oscilador e a fase do ritmo de atividade/inatividade? Se não está ocorrendo uma modificação na fase do oscilador que gera um padrão distinto entre campo e laboratório, e a forma de registro também não é a explicação, qual poderia ser a razão dessa atividade diurna em campo nos tuco-tucos?

Uma possibilidade estaria relacionada com uma comutação (denominada “*switch*” na literatura) na transdução dos sinais eferentes do oscilador aos centros de controle da atividade. Nesse caso, uma fase particular do oscilador arrastado é traduzida em atividade ou inatividade dependendo do ambiente. Chiesa *et al.* (2010) estudaram em laboratório uma espécie de lagosta (*Nephrops norvegicus*; Nephropidae) que apresenta mudança de fase de atividade dependendo da intensidade luminosa a qual é exposta. Os resultados experimentais simularam as condições naturais, em que os animais apresentam fases de atividade distintas dependendo da profundidade que ocupam, sendo que animais de profundidades maiores tendem a ser diurnos. Os resultados mostraram que nem modificações no oscilador e nem mascaramento são suficientes para explicar o padrão observado, portanto esse mecanismo de *switch* foi proposto como explicação. Esse mecanismo teórico seria uma proposta interessante para explicar modificações no nicho temporal, entretanto, ainda não foi possível determinar se ele efetivamente poderia ocorrer e quais suas bases anatômicas (Smale *et al.*, 2003).

Como mencionado anteriormente o ritmo de atividade/inatividade (assim como ingestão de água e temperatura) é tradicionalmente usado como marcador temporal da fase do oscilador. Entretanto reconhece-se que a relação de fases entre os ritmos e o oscilador poderia ser mais flexível (Moore-Ede *et al.*, 1984). Então, caso seja assumido que existe uma flexibilidade entre a fase do oscilador e do ritmo de atividade/inatividade, outro mecanismo pode ser pensado. Nessa segunda proposta, o mascaramento (Aschoff, 1960) seria um primeiro candidato para explicar as mudanças da fase diurna para noturna. Nesse caso, um fator ambiental exclusivo do campo estimularia a expressão da atividade durante o dia, e, talvez, a inibiria durante a noite. Esse mecanismo causaria modificações na fase de atividade sem afetar a fase do oscilador. Poderia, portanto, explicar o desaparecimento da atividade durante a fase correspondente às horas de claro do dia na transição entre campo e condições constantes (Mrosovsky & Hattar, 2005; Levy *et al.*, 2007).

Existem vários fatores ambientais que diferem consideravelmente entre o campo e o laboratório que poderiam ser considerados como candidatos a agentes mascaradores. Dentre eles é possível citar as temperaturas extremas do deserto (Rezende *et al.*, 2003), os predadores (Vassallo *et al.*, 1994) e o conteúdo de oxigênio dos túneis (Burda *et al.*, 2007). Um estudo com coruros (*Spalacopus cyanus*), outra espécie de roedor subterrâneo, mostrou que a atividade da população é restrita ao meio do dia no inverno,

enquanto que no verão ela estava concentrada mais nas horas da manhã e tarde (Rezende *et al.*, 2003). Esse padrão sazonal foi interpretado como uma estratégia termorregulatória da espécie, que teria sua atividade inibida pelas altas temperaturas do verão enquanto que no inverno a atividade ocorreria somente quando a temperatura externa estivesse mais elevada (Rezende *et al.*, 2003). A temperatura também foi considerada como um fator mascarador importante, inclusive capaz de modificar a fase de atividade nos degus (*Octodon degus*), roedores não-subterrâneos, pois quando expostos a temperaturas altas durante o dia, os animais passaram a ser ativos à noite (Vivanco *et al.*, 2010). Os dados obtidos com os tuco-tucos na arena experimental mostraram um padrão similar ao dos coruros: saídas concentradas nas manhãs no verão e à tarde no inverno. Uma possível explicação para esses dados seria similar àquela atribuída para o padrão dos coruros, ou seja, relacionada à temperatura ambiente. Para investigar essa possibilidade foi necessário coletar e analisar dados de temperatura, que serão explorados no capítulo 5.

Até então, o mascaramento ou mesmo um “switch” eram as melhores opções para explicar o que poderia estar ocorrendo com os tuco-tucos. O mecanismo do “switch” não poderia ser testado por nós experimentalmente mas era possível averiguar o quanto os dados abióticos poderiam modificar o padrão de atividade, atuando como mascaradores. Dessa forma, voltamos nosso foco para as variáveis ambientais às quais os tuco-tucos estavam expostos. Imaginávamos que, se tentássemos traçar uma relação entre os fatores ambientais e o padrão de saídas, poderíamos ter uma idéia do fator responsável por essa atividade diurna em campo.

Capítulo 5: Caracterização dos dados abióticos e da disponibilidade de alimento em campo

Introdução

Como discutido anteriormente, os dados obtidos tanto em campo quanto em laboratório indicavam que os tuco-tucos são uma espécie que expressa atividade durante o dia, apesar de ser exclusivamente noturna em laboratório. O experimento mostrado no capítulo 3 revelou através dos pós-efeitos que a fase do oscilador no campo não é distinta daquela do laboratório. Nesse caso, como não há mudanças no oscilador, poderíamos estar diante de um caso de mascaramento em campo. Ou seja, a atividade seria estimulada durante o dia por um fator ambiental presente somente no campo.

Como mencionado no Capítulo 1, diferentemente do arrastamento que envolve o oscilador, o mascaramento é uma resposta direta a fatores ambientais. No caso dos tuco-tucos a atividade diurna poderia ser fruto de um fator ambiental (mascarador) que faz com que os animais intensifiquem a atividade nesse momento, mas sem envolver o oscilador. Assim seria necessário tentar verificar a existência de alguma correlação entre os fatores ambientais e o ritmo de atividade/inatividade em campo.

Os dados disponíveis para essa análise foram aqueles obtidos ao longo das observações dos 3 indivíduos em arenas experimentais. Portanto, foi importante resgatar os dados complementares de campo colhidos ao longo das observações. Interessantemente esses dados, particularmente a disponibilidade de alimento, tornaram-se um dos aspectos mais importantes para a análise do fenômeno da expressão da atividade diurna no animal noturno

Material e métodos

Uma estação meteorológica localizada a 80 metros do local de observação permitiu o registro da temperatura ambiente, velocidade do vento, chuva e umidade relativa do ar durante as três observações. Durante o verão de 2011, também foi possível medir, continuamente, a temperatura abaixo da terra por meio de um sensor colocado

dentro do túnel em uma profundidade de aproximadamente 60 cm (HOBO data loggers U10/003; Onset Computer Corporation, Bourne, MA).

Resultados

Na Tabela 2 estão caracterizadas os três momentos nas quais as observações foram realizadas, mostrando as variações entre elas, especialmente da temperatura e das chuvas.

Ainda que a modulação direta pela temperatura, vento e chuva não tenha sido investigada de forma sistemática, é possível notar algumas relações interessantes entre o padrão de saídas e as informações do ambiente.

Tabela 2: Dados abióticos e disponibilidade de alimento das três estações em que foram realizadas observações.

	disponibilidade de alimento	umidade relativa média (%)	chuva (mm)	temperatura (°C)			velocidade do vento (km/h)		
				média (±DP)	max	min	média (±DP)	max	min
Verão 2010 (Março 01 - Março 11)	escasso	32,3	0	22,7 (± 4,12)	31,6	15,4	6,7 (± 3,13)	17,7	0
Inverno 2010 (Julho 26 - Agosto 06)	escasso	14,6	0,01297 (chuva e neve)	5,66 (± 5,21)	18,6	-2,1	4,13 (± 2,85)	12,9	0
Verão 2011 (Março 01 - Março 10)	abundante	32,3	11,5	20,73 (± 3,21)	28,5	15,1	4,52 (± 2,2)	11,3	0

a) Temperatura:

Além das diferenças no padrão de saídas, também podem ser vistas diferenças consideráveis nas temperaturas do verão e inverno, coletadas pela estação meteorológica (Fig. 15). Com isso, algumas relações entre saídas e temperatura podem ser traçadas:

Os picos de atividade no verão estão associados com as temperaturas mais baixas das manhãs e tardes, diminuindo no meio do dia. Já no inverno elas coincidiram com as temperaturas mais altas do meio do dia e não ocorreram na manhã e nem no fim do dia.

O dado das observações em 2011, juntamente com os dados de temperatura acima e abaixo da superfície mostraram que também é possível verificar que o pico de saídas é coincidente com uma baixa temperatura abaixo da terra e uma temperatura atmosférica crescente (Fig. 15).

Figura 15: Variação diária da temperatura ambiente juntamente com dados das saídas dos animais. Os quadrados representam as médias, com respectivos desvios, da temperatura considerando todos os dias a cada hora. As barras verticais em cinza mostram os momentos e frequências de saídas dos tuco-tucos, considerando todos os dias de observação (dados da Fig. 8). Primeiro gráfico: verão de 2010; Segundo: inverno de 2010; Terceiro: verão de 2011. Durante o ano de 2011 foi possível medir a temperatura 60 cm abaixo da terra, representada no terceiro gráfico pelos triângulos.

b) Vento:

Foi verificado que o vento pode modificar o padrão de saídas dos animais de seus túneis, ou seja, o vento forte na superfície pode inibir as saídas, algo particularmente notado durante o verão de 2010 (Fig. 16).

Figura 16: Dados dos momentos de saída do animal observado durante o verão de 2010 (barras pretas horizontais) juntamente com a velocidade do vento (linha preta). As flechas indicam os momentos que o vento potencialmente inibiu as saídas dos animais, modificando o padrão de saídas. Observação: Nos dias 4 e 5 não há registro da velocidade do vento devido à falha no equipamento.

Durante o terceiro dia das observações no verão de 2010, o animal realizou uma saída em um horário não usual, no fim da tarde. Nesse mesmo dia e horário foi relatado pelos observadores que, comparativamente com os dias anteriores, o vento estava mais intenso, frio e carregando uma grande quantidade de areia. O fato levantou a suspeita de que o vento poderia também ter algum efeito sobre o padrão de saídas. Posteriormente os dados da estação meteorológica confirmaram essas observações locais e subjetivas, no âmbito mais geral das medidas da região: a estação marcou a presença de vento mais forte do que nos dias anteriores durante o horário que saídas seriam esperadas (Fig. 16).

c) Chuvas:

O clima de Anillaco é muito seco durante todo o ano, com chuvas ocasionais concentradas no verão. Mesmo que o experimento tenha sido conduzido durante o verão de 2011, esse ano foi incomum, pois a quantidade de chuvas foi muito maior do que seria esperado para esse ambiente desértico. Com isso foi percebido que a chuva aparentemente também pode modificar o padrão de saídas dos animais, pois durante um dia particularmente chuvoso (dia 7 da observação do verão 2011), não ocorreram saídas. Interessantemente, nos dias seguintes ocorreu uma grande quantidade de escavação, enquanto o forrageamento não se modificou. Uma possível explicação para o fato é que as chuvas podem compactar os solos, preenchendo os poros e, conseqüentemente diminuindo o conteúdo de oxigênio dentro dos túneis, o que poderia induzir uma escavação mais intensa de forma a restaurar a atmosfera dos túneis (Burda *et al.*, 2007) (Fig. 17).

Figura 17: Soma do tempo total que o animal permanece realizando escavação ou forrageamento durante os dias de observação no verão de 2011. A quantidade de chuvas é mostrada no topo das barras. A ausência de valores indica que não houve chuva no dia em questão.

d) Disponibilidade de alimento:

A Tabela 2 também discrimina a quantidade de alimento disponível em cada estação. Na Figura 18 é possível ver as diferenças entre a quantidade de vegetação em cada uma das estações. É possível notar que justamente a estação mais chuvosa (verão de 2011) foi a que apresentou uma maior abundância de alimento.

Verão 2010

Inverno 2010

Verão 2011

Figura 18: Fotografias da arena experimental nos três momentos em que foram realizadas observações juntamente com fotografias dos três animais observados.

Assim, levando-se em consideração todas as informações obtidas durante esse experimento em campo, é possível caracterizar as três estações e padrões de saídas dos animais da seguinte forma.

Verão de 2010: quente e seco, com baixa disponibilidade de alimento. Os animais realizaram saídas durante todas as horas de claro do dia, com o pico na manhã.

Inverno de 2010: frio e seco, às vezes com neve, e baixíssima disponibilidade de alimento. Foi a estação com a maior quantidade de saídas nas horas de claro do dia, com o pico no meio do dia.

Verão de 2011: quente e úmido, chuvas fortes antes do início do experimento, seguido por garoas e chuvas ocasionais durante o experimento. Grande disponibilidade de alimento. Foi a estação com a menor quantidade de saídas nas horas de claro do dia, as quais ocorreram exclusivamente pela manhã.

Discussão

Nossos dados preliminares das variáveis ambientais não permitem que seja estabelecida uma correlação temporal entre elas e o ritmo de atividade/inatividade do tuco-tuco. Assim, não é possível afirmar que algum dos fatores medidos seja o responsável por estimular a atividade durante o dia em campo a ponto de modificar totalmente o padrão de atividade. Ou seja, não há evidências de que os fatores ambientais gerem a discrepância observada entre campo e laboratório.

Entretanto é possível observar que os fatores podem mascarar pontualmente a atividade. Vento e chuva, por exemplo, parecem inibir as saídas em alguns momentos. Além disso, os dados de temperatura ambiente sugerem a existência de uma relação entre esses ciclos e as diferenças dos picos de saída observados no verão e inverno. Tal relação poderia ser especulada como algum tipo de estratégia termorregulatória da espécie, assim como no caso dos coruros (Rezende *et al*, 2003).

Porém, a principal explicação para a atividade diurna no tuco-tuco surgiu após a ocorrência rara de chuva intensa no verão de 2011. Essa revelou um fator que até então não havíamos levado em consideração e que se tornou crucial para posterior interpretação do padrão de saídas, como apresentaremos no capítulo seguinte: a disponibilidade de alimento.

Capítulo 6: Outro modelo

O trabalho em condições naturais mostrou que temperatura, vento e chuva são fatores que parecem modificar o padrão de saídas, atuando como mascaradores. Mas essas variáveis ambientais por si só não conseguem explicar o porquê do desaparecimento do componente diurno da atividade na transição campo-laboratório. Ou seja, os dados que temos sobre mascaramento não podem explicar nem como e nem porque um animal noturno em laboratório poderia expressar atividade durante o dia, somente em campo. Assim, outra explicação seria necessária.

Recentemente Hut e col. (2011) publicaram um modelo que parecia fornecer uma explicação bem mais plausível para os dados obtidos com os tuco-tucos. Os autores elaboraram um protocolo de experimento laboratorial para testarem o que acontecia com a fase de atividade em animais submetidos a diferentes graus de dificuldade na obtenção de alimento. A intenção era criar um modelo, em laboratório, que simulasse momentos de escassez de alimento pelos quais os animais passam naturalmente. Nesse experimento, partindo de uma condição *ad libitum*, aumentava-se gradualmente o número de vezes que o animal precisava correr na roda de atividades para ter acesso ao alimento. Conforme os animais precisavam se esforçar mais para conseguir o alimento, de forma igualmente gradual, mesmo em ciclo claro/escuro, eles passaram a apresentar um componente diurno de atividade, deixando de ser exclusivamente noturnos (Fig. 19).

Diferentemente dos trabalhos tradicionais que estudam sincronização por disponibilidade de alimento e verificam mudanças de fase ao concentrarem o alimento em um momento do dia, esse trabalho não restringia o momento que o alimento era fornecido. Então, nesse caso, a mudança de fases parecia estar relacionada com o gasto energético associado ao trabalho realizado para obtenção de alimento e não com sua fase de disponibilidade já que os animais podiam coletar alimento em qualquer hora do dia.

Um componente noturno de atividade permaneceu em todas as fases do experimento, mas quanto maior era o esforço para obter alimento, menor a ocorrência dessa atividade durante a fase de escuro. O resultado podia ser revertido quase instantaneamente quando o alimento voltava a ser fornecido *ad libitum*. Ou seja, o componente diurno da atividade desaparecia completamente (Fig. 19).

Figura 19. Figura retirada do trabalho de Hut e col. (2011). Os dois actogramas mostram os ritmo de atividade/inatividade de camundongos em laboratório. Conforme o esforço necessário para a obtenção de alimento aumentava (requisição de maior número de revoluções da roda), o animal tornava-se gradativamente mais diurno. A volta à condição de alimento *ad libitum* (final do experimento, em verde) faz com que a fase de atividade mude bruscamente sem transientes. Cada um dos dados obtidos nas observações dos tuco-tucos pode ser correlacionado com um momento do experimento de Hut e col. (2011). Os tuco-tucos em campo apresentam mais saídas diurnas quando há menos alimento (como no inverno) e, ao serem colocados em condições constantes (inclusive de alimento), deixam de expressar atividade na fase correspondente ao dia ambiental.

Esse é um modelo ecológico puramente laboratorial, mas tem a sustentação de dados de campo obtidos com camundongos em arenas experimentais (Daan *et al.*, 2011). Interessantemente, os dados obtidos com os tuco-tucos também sustentam esse intrigante modelo, trazendo a contribuição de elementos naturais aos resultados laboratoriais encontrados pelo grupo. Além disso, o resultado surpreendente obtido por esses pesquisadores parece explicar muito bem os resultados intrigantes que obtivemos

com os tuco-tucos, nos quais a atividade em laboratório ocorre durante a fase de escuro em ciclo CE 12:12 (Valentinuzzi *et al.*, 2009), mas existe um componente diurno na atividade em campo.

No laboratório, em todos os experimentos, o alimento foi oferecido constantemente e em grandes quantidades (*ad libitum*). Nessas condições o animal apresenta a atividade ocorrendo totalmente concentrada na fase correspondente à noite no campo. Por outro lado, tanto em campo quanto na arena, os animais coletavam seus próprios alimentos e as observações revelaram que os animais na arena apresentam atividade durante as horas de claro do dia.

Os tuco-tucos são herbívoros e tendem a ser generalistas, consumindo plantas variadas, com preferência por monocotiledôneas, e várias partes da planta (folhas, talos, sementes e raízes). Apesar dos animais também alimentarem-se de raízes (Fracchia *et al.*, 2011), sua fonte principal de alimento parece consistir em porções aéreas de plantas, como relatado para outras espécies de *Ctenomys*, como *C. australis* e *C. talarum* (Comparatore, 1995). Estudos mostram que os animais forrageiam preferencialmente na superfície, estocando posteriormente o alimento coletado no subterrâneo (Busch *et al.*, 2000). A estratégia de forrageamento dos tuco-tucos consiste em coletar apenas plantas localizadas próximas das entradas dos túneis, nunca se afastando mais do que o comprimento do seu corpo. Dessa forma, como o animal não se desloca muito na superfície, para chegar a novas fontes de alimento ele necessita ampliar seus túneis. Logo, extensões do túnel são especialmente necessárias quando o alimento é escasso (Luna *et al.*, 2002). O custo energético utilizado para as escavações é considerado como extremamente alto (Buffenstein, 2000). Portanto, uma maior necessidade de escavar para chegar a fontes de alimento mais esparsas implica um maior custo energético. Ou seja, quando está mais seco, com alimento mais escasso, o custo de obtenção de alimento é consideravelmente maior do que quando o alimento está abundante. Tal custo é particularmente alto nos tuco-tucos devido à intensa escavação (Luna *et al.*, 2002; Luna & Antinuchi, 2006).

Em todas as observações, foi notado que os animais passaram mais tempo removendo terra de seus túneis do que forrageando. Esses episódios de remoção de terra são medidas indiretas das escavações subterrâneas, de uma forma geral, essa terra arremessada para fora é proveniente da abertura de novos túneis. Ambos componentes, escavação e forrageamento, foram menos intensos no verão do que no inverno (Fig. 10).

Quando o alimento é abundante, as observações revelaram que os animais podem utilizar as mesmas saídas dos túneis em dias subsequentes, o que requer menos escavações e, portanto, menos esforço. Dessa forma, os tuco-tucos, como roedores subterrâneos, não são apenas sistemas interessantes para o estudo da sincronização em condições naturais, como também contribuem como exemplos naturais para o modelo de Hut e col. (2011) (Fig. 19).

Em campo, além da existência de atividade diurna, também foi detectada uma variação no padrão de saídas de acordo com a estação na qual se realizaram as três observações. A quantidade de atividade durante as horas de claro do dia é muito alta no verão e inverno de 2010 e mais baixa no verão chuvoso (2011). Mesmo que exista uma coincidência no pico de atividade no verão de 2010 e 2011, o padrão não foi o mesmo, pois a quantidade de saídas por dia é consideravelmente maior no verão de 2010 (Fig. 8 e 11). As chuvas em Anillaco são variáveis entre os diferentes anos, mas em geral chove pouco (100 a 300 ml/ano) e o clima é consequentemente muito seco. Porém no verão de 2011 as chuvas foram muito mais intensas do que o normal e, segundo os moradores locais, tal fenômeno só é observado ocasionalmente. Uma maior quantidade de chuvas em 2011 significou uma grande quantidade de plantas, ou seja, uma maior disponibilidade de alimento. Dessa forma, um menor número de saídas era necessário para encontrar e carregar plantas para os túneis.

Portanto, a atividade, tanto de forrageamento como de extensão dos túneis subterrâneos, foi maior durante o ano seco e menor no ano úmido. De forma semelhante ao modelo de Hut e col. (2011), esse fato poderia ser explicado pela maior dificuldade de obtenção do alimento. Vale a pena destacar que as observações dos dois verões ocorreram com exatamente um ano de diferença, excluindo possíveis efeitos do fotoperíodo. Ou seja, o que realmente variou entre as duas observações de verão foram as condições climáticas e disponibilidade de alimento.

A ocorrência de atividade noturna foi investigada de forma não sistemática no ano de 2011 por meio da busca de túneis novos que não estavam presentes no dia anterior. Eles só foram detectados uma única vez, mas não é possível determinar se esse novo túnel surgiu durante a noite ou de manhã cedo antes do início das observações. Dessa forma, por ora consideramos que a atividade fora dos túneis se concentrou nas horas de claro do dia.

O modelo explorado por Hut e col. (2011) encaixa-se na categoria dos modelos que consideram a existência de flexibilidade entre a fase do oscilador e a fase do ritmo de atividade/repouso. Contrastando com o modelo que envolve mascaramento, apresentado anteriormente, o modelo desses autores assume que o componente diurno da atividade está sob o controle temporal de outro oscilador. Este é denominado “*slave*”, por sua ritmicidade estar atrelada a informações rítmicas vindas do oscilador central (núcleos supraquiasmáticos). Ou seja, de forma similar ao mascaramento, a informação vinda do oscilador central pode ser a mesma em campo e laboratório, mas, no caso desse novo modelo, o que define a fase da atividade será a fase desse segundo oscilador e não uma resposta direta às variáveis ambientais. Essa relação entre oscilador central e oscilador *slave* que determinaria a relação de fases foi inicialmente proposta por Pittendrigh (1981). Segundo o modelo de Hut (2011), uma defasagem crescente entre o oscilador central e este oscilador “*slave*” ocorre na condição de restrição alimentar.

Os resultados de Daan e col. (2011) e Hut e col. (2011) indicam que indivíduos ativos durante o dia ou a noite podem surgir devido a diferentes níveis de disponibilidade de alimento, sem requerer uma mudança de fase no oscilador central. Assim, a atividade não é uma marcadora da fase do oscilador central. Os resultados obtidos com os tuco-tucos suportam essa visão.

Outro aspecto interessante a ser ressaltado está relacionado às características próprias de animais diurnos e noturnos. É reconhecido que os animais apresentam especializações distintas para seus nichos temporais, particularmente relacionados aos órgãos sensoriais. Os diurnos que estão expostos a intensidades luminosas mais altas, possuem maior acuidade visual e podem apresentar visão colorida. Por outro lado os noturnos tendem a ter um olfato e/ou audição apurados e sua visão tende a ser menos acurada do que nos diurnos (Kronfeld-schor & Dayan, 2008). Especula-se que mudanças de um nicho para outro seriam raras por exigirem a ocorrência de modificações coordenadas na organização temporal de diversos processos comportamentais e fisiológicos, afinal, os organismos possuem especializações para determinados nichos temporais (Daan, 1981).

Os tuco-tucos são roedores noturnos em laboratório e os resultados demonstram que a fase determinada por seu oscilador arrastado é correspondente à de um animal noturno. Ainda que existam evidências de que tuco-tucos na natureza possam ter atividade noturna, visto que em *C. talarum* e *C. australis* a predação por corujas é

significativa (Vassallo *et al.*, 1994), os tuco-tucos deste trabalho, assim como outras espécies de tuco-tucos (Luna & Antinuchi, 2003; Cutrera *et al.*, 2006; Francescoli, 2010, comunicação pessoal), estão ativos em campo durante as horas de claro do dia. Assim, esses animais teriam a necessidade de sair de seus túneis ao menos para forragear durante o dia. Curiosamente, apesar dos tucos-tucos estudados por nós serem noturnos em laboratório, estudos com outras espécies revelaram que as características morfoanatômicas dos olhos de tuco-tucos são mais condizentes com a atividade diurna. A densidade de bastonetes e de cones de *Ctenomys talarum* e *Ctenomys magellanicus* é mais condizente com a de roedores diurnos do que de roedores noturnos, o que indica que esses animais teriam uma visão condizente com excursões fora da terra, nas horas de claro do dia (Schleich *et al.*, 2010). Tudo isso reforça que certa cautela é necessária quando se tenta inferir por meio de estudos em laboratório o que acontece em condições naturais. Apesar da importância do laboratório na definição e caracterização sistemática das propriedades dos osciladores circadianos, a realidade do laboratório pode não refletir o que ocorre na natureza. Os padrões de atividade e suas explicações podem ser ainda mais complexos do que parecem.

Conclusões

Os tuco-tucos são roedores subterrâneos noturnos em laboratório, com ritmos robustos de atividade/inatividade. Entretanto, um estudo através de observações contínuas de seu padrão de saídas mostrou que estes animais apresentam em campo um componente diurno de atividade que desaparece na transição campo-laboratório. Ainda que essas observações tenham sido realizadas com apenas três indivíduos, ela permitiu caracterizar, por dez dias em cada estação, os comportamentos dos animais e as condições ambientais que poderiam modular o padrão de saídas dos túneis.

Posteriormente, os pós-efeitos da sincronização destes três animais em arena experimental, e de outros dez em vida livre, mostraram que o oscilador em campo está arrastado e com a fase correspondente à noite ambiental. Tal resultado permitiu generalizar que o oscilador se mantém arrastado e na mesma fase em campo e laboratório. Portanto, a atividade dos animais na arena experimental, observada durante as horas de claro do dia, não pode ser explicada por uma expressão diferencial do oscilador em campo e laboratório. Entretanto, essa atividade que se expressa em campo, mas não em laboratório, também não pode ser explicada somente por mascaramento. Muito provavelmente as diferenças nas fases de atividade estão relacionadas às vias eferentes, por exemplo, devido a outros osciladores envolvidos no controle da fase de atividade/repouso.

O modelo proposto por Hut (2011) no qual o esforço para obter alimento gera uma diferença na expressão do ritmo de atividade/inatividade parece ser interessante para explicar o padrão dos tuco-tucos. Assim, nossos dados obtidos com os tuco-tucos podem ser um exemplo em condições semi-naturais para essa proposta laboratorial.

Por fim, nosso trabalho suporta a idéia que a fase do ritmo emergente de atividade/inatividade não representa precisamente a fase do oscilador. Assim, em condições naturais a relação entre a fase do ritmo de atividade/inatividade e do oscilador que o controla pode ser muito mais flexível do que se suspeitava.

Referências Bibliográficas

- Abraham, E.; del Valle, H.; Roig, F.; Torres, L.; Ares, J.O.; Coronato, F.; Godagnone, R. 2009. Overview of the geography of the Monte Desert biome (Argentina). *Journal of Arid Environments* 73: 144–153.
- Alcock, J. 2005. *Animal Behavior: An Evolutionary Approach*. 8th ed. Sinauer Associates, Inc., Sunderland.
- Aschoff, J. 1960. Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. *Cold Spring Harbour Symposia on Quantitative Biology* 25: 11–28.
- Aschoff, J. 1988. Masking of circadian rhythms by Zeitgebers as opposed to entrainment. *Advanced Biosciences* 73: 149–161.
- Begall, S.; Daan, S.; Burd, H.; Overkamp, G.J.F. 2002. Activity patterns in a subterranean social rodent, *Spalacopus cyanus* (Octodontidae). *Journal of Mammalogy* 83: 153–158.
- Ben-Schlomo, R.; Ritte, U.; Nevo, E. 1995. Activity pattern and rhythm in the subterranean mole-rat superspecies *Spalax ehrenbergi*. *Behavior Genetics* 25: 239–245.
- Berthold, P. 2001. *Bird Migration: A General Survey*. Oxford University Press, USA.
- Bidau, C. 2006. Familia Ctenomyidae. *In*: Barquez, R.M.; Díaz, M.M.; Ojeda, R.A. (Eds.). *Mamíferos de Argentina, Sistemática y Distribución*. SAREM, Tucumán. Pp. 219–231
- Blanchong, J.; Smale, L. 2000. Temporal patterns of activity of the unstriped Nile rat, *Arvicanthis niloticus*. *Journal of Mammalogy* 81(2): 595–599.
- Blanchong, J.A.; Mcelhinny, T.L.; Mahoney, M.M.; Smale, L. 1999. Nocturnal and diurnal rhythms in the unstriped Nile rat, *Arvicanthis niloticus*. *Journal of Biological Rhythms* 14: 364–377.
- Buffenstein, R. 2000. Ecophysiological responses of subterranean rodents to underground habitats. *In*: Lacey, E.A.; Cameron, G.; Patton, J.L. (Eds.). *Life Underground: The Biology of Subterranean Rodents*. University of Chicago Press, Chicago, Illinois. Pp. 62–110.
- Burda, H.; Sumner, R.; Begall, S. 2007. Microclimate in burrows of subterranean rodents - revisited. *In*: Begall, S.; Burda, H.; Schleich, C.E. (Eds.). *Subterranean*

- Rodents: News from Underground. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany. Pp. 21–23.
- Busch, C.; Antinuchi, D.C.; del Valle, J.C.; Kittlein, M.J.; Malizia, A.I.; Vassallo, A.I.; Zenuto, R.R. 2000. Population ecology of subterranean rodents. *In*: Lacey, E.A.; Cameron, G.; Patton, J.L. (Eds.). *Life Underground: The Biology of Subterranean Rodents*. University of Chicago Press, Chicago, Illinois. Pp. 183–226.
- Calisi, R.M.; Bentley, G.E. 2009. Lab and field experiments: are they the same animal? *Hormones and Behavior* 56: 1–10.
- Camin, S.; Madoery, L.; Roig, V. 1995. The burrowing behavior of *Ctenomys mendocinus* (Rodentia). *Mammalia* 59(1): 9–17.
- Chiesa, J.J., Aguzzi, J., García, J.A., Sardà, F., de La Iglesia, H.O. 2010. Light intensity determines temporal niche switching of behavioral activity in deep-water *Nephrops norvegicus* (Crustacea: Decapoda). *Journal of Biological Rhythms* 25(4): 277–287.
- Cohen, R.; Kronfeld-Schor, N.; Ramanathan, C.; Baumgras, A.; Smale, L. 2010. The substructure of the suprachiasmatic nucleus: similarities between nocturnal and diurnal spiny mice. *Brain, Behavior and Evolution* 75: 9–22.
- Comparatore, V.M.; Cid, M.S.; Busch, C. 1995. Dietary preferences of two sympatric subterranean rodent populations in Argentina. *Revista Chilena de Historia Natural* 68: 197–206.
- Cutrera, A.P.; Antinuchi, C.D.; Vasallo, A.I. 2006. Home range and activity patterns of the South American subterranean rodent *Ctenomys talarum*. *Journal of Mammalogy* 87(6): 1183–1191.
- Daan, S. 1981. Adaptive daily strategies in behavior. *In*: Aschoff, J. (Ed.). *Handbook of behavioral neurobiology*, Vol. 4, *Biological Rhythms*. Plenum Press, New York. Pp. 275–298.
- Daan, S.; Spoelstra, K.; Albrecht, U.; Schmutz, I.; Daan, M.; Daan, B.; Rienks, F.; Poletaeva, I.; Dell'Omo, G.; Vyssotski, A.; Lipp, H.P. 2011. Lab mice in the field: unorthodox daily activity and effects of a dysfunctional circadian clock allele. *Journal of Biological Rhythms* 26: 118–29.
- DeCoursey, P. 1986. Light sampling behaviour in photoentrainment of a rodent circadian system. *Journal of Comparative Physiology A* 159: 161–169.

- DeCoursey, P. 2004a. Overview of biological timing from unicells to humans. *In*: Dunlap, J. C.; Loros, J.J.; DeCoursey, P.J. (Eds.). *Chronobiology: Biological Timekeeping*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. Pp. 3–24.
- DeCoursey, P. 2004b. The behavioral ecology and evolution of biological timing systems. *In*: Dunlap, J.C.; Loros, J.J.; DeCoursey, P.J. (Eds.). *Chronobiology: Biological Timekeeping*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. Pp. 26–65.
- Enright, J.T. 1970. Ecological aspects of endogenous rhythmicity. *Annual Review of Ecology and Systematics* 1: 221–238.
- Erkert, H.G.; Cramer B. 2006. Chronobiological background to cathemerality: circadian rhythms in *Eulemur fulvus albifrons* (Prosimili) and *Aotus azarai boliviensis* (Anthropoidea). *Folia Primatologica* 77: 87–113.
- Fornel, R. 2010. Evolução na forma e tamanho do crânio no gênero *Ctenomys* (Rodentia: Ctenomyidae). Tese de doutorado (inédita). Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Fracchia, S.; Krapovickas L.; Aranda-Rickert, A.; Valentinuzzi, V.S. 2011. Dispersal of arbuscular mycorrhizal fungi and dark septate endophytes by *Ctenomys* cf. *knighti* (Rodentia) in the northern Monte Desert of Argentina. *Journal of Arid Environments* 75: 1016-1023.
- Goldman, B.D.; Goldman, S.L.; Riccio, A.P.; 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.
- Hut, R.A.; van Oort, B.E.H.; Daan, S. 1999. Natural entrainment without dawn and dusk: the case of the European ground squirrel (*Spermophilus citellus*). *Journal of Biological Rhythms* 14: 290–299.
- Hut, R.A.; Pilorz, V.; Boerema, A.S.; Strijkstra, A.M.; Daan, S. 2011. Working for food shifts nocturnal mouse activity into the day. *PLoS ONE* 6(3): e17527.
- Kas, M.J.H. & Edgar, D.M. 1999. A nonphotic stimulus inverts the diurnal–nocturnal phase preference in *Octodon degus*. *Journal of Neuroscience* 19: 328–333.
- Kenward, R.E. 2001. *A manual for wildlife tagging*. Academic Press, London.
- Kitchen, A.M.; Gese, E.M.; Schauster, E.R. 2000. Changes in coyote activity patterns due to reduced exposure to human persecution. *Canadian Journal of Zoology* 78: 853–857.

- Kronfeld-Schor, N.; Dayan, T. 2003. Partitioning of time as an ecological resource. *Annual Reviews of Ecology, Evolution and Systematics* 34: 153–181.
- Kronfeld-Schor, N.; Dayan, T. 2008. Activity patterns of rodents: the physiological ecology of biological rhythms. *Biological Rhythms Research* 39(3): 193–211.
- Levy, O.; Dayan, T.; Kronfeld-Schor, N. 2007. The relationship between the golden spiny mouse circadian system and its diurnal activity: an experimental field enclosures and laboratory study. *Chronobiology International* 24(4): 599–613.
- Luna, F.; Antinuchi, C.D. 2003. Daily movements and maximum speed in *Ctenomys talarum* (Rodentia: Ctenomyidae) in artificial enclosures. *Journal of Mammalogy* 84(1): 272–277.
- Luna, F. & Antinuchi, C.D. 2006. Cost of foraging in the subterranean rodent *Ctenomys talarum*: effect of soil hardness. *Canadian Journal of Zoological* 84: 661–667.
- Luna, F.; Antinuchi, C.D.; Busch, C. 2002. Digging energetics in the South American rodent *Ctenomys talarum* (Rodentia, Ctenomyidae). *Canadian Journal of Zoology* 80: 2144–2149.
- Malizia, A.I. 1998. Population dynamics of the fossorial rodent *Ctenomys talarum* (Rodentia: Octodontidae). *Journal of Zoology, London* 244: 545–551.
- Marques, M.D.; Golombek, D.E.; Moreno, C. 1999. Adaptação Temporal. In: Marques, N. & Menna-Barreto, L. (Eds.). *Cronobiologia: Princípios e Aplicações*. S.P. Fiocruz e Edusp. Pp. 55–98.
- Menaker, M. 2006. Circadian organization in real world. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(9): 3015–3016.
- Menaker, M.; Moreira, L.F.; Tosini, G. 1997. Evolution of circadian organization in vertebrates. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 30(3): 305–313.
- Moore, R.Y. 1983. Organization and function of a central nervous system circadian oscillator: the suprachiasmatic hypothalamic nucleus. *Federation Proceedings* 42: 2783–2789.
- Moran, T.H.; Schulkin, J. 2000. Curt Richter and regulatory physiology. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 279: R357–R363.
- Morello, J. 1958. La provincia fitogeográfica del monte. *Opera Lilloana* 2. Instituto Miguel Lillo, Universidad de Tucumán, Argentina.

- Moore-Ede, M.; Sulzman, F.M.; Fuller, C.A. 1982. The Clocks That Time Us: Physiology of the Circadian Timing System. Commonwealth Fund Publications, Harvard University Press. 464 p.
- Mrosovsky, N. 1999. Masking: history, definitions and measurement. 1999. *Chronobiology International* 16(4): 415–429.
- Mrosovsky, N. 2003. Beyond the suprachiasmatic nucleus. *Chronobiology International* 20(1): 1–8.
- Mrosovsky, N. & Hattar, S. 2005. Diurnal mice (*Mus musculus*) and other examples of temporal niche switching. *Journal of Comparative Physiology A* 191(11): 1011–1024.
- Mrosovsky, N.; Edelstein, K.; Hastings, M.H.; Maywood, E.S. 2001. Cycle of period gene expression in a diurnal mammal (*Spermophilus tridecemlineatus*): implications for nonphotic phase shifting. *Journal of Biological Rhythms* 16(5): 471–478.
- Nams, V.O. 2006. LOCATE III, User's Guide. Tatamagouche, Canada: Pacer Computer Software.
- Oliveira, J.A.; Bonvicino, C.R. 2006. Ordem Rodentia. *In*: Reis, N.; Peracchi, A.L.; Pedro, W.A.; Lima, I.P. (Eds.). Mamíferos do Brasil. Londrina, Paraná. Pp. 381.
- Oster, H.; Avivi, A.; Joel, A.; Albrecht, U.; Nevo, E. 2002. A switch from diurnal to nocturnal activity in *Spalax ehrenbergi* is accompanied by an uncoupling of light input and the circadian clock. *Current Biology* 12(2): 1919–1922.
- Page, T.L. 1985. Clocks and circadian rhythms. *In*: Kerkut, G.A.; Gilbert, L.I. (Eds.). *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*. Vol 6. Nervous System: Sensory. Pergamon Press, Oxford.
- Page, T.L. 1989. Masking in invertebrates. *Chronobiology International* 6(1): 3–11.
- Pearson, O.P. 1984. Taxonomy and natural history of some fossorial rodents of Patagonia, southern Argentina. *Journal of Zoology, London*, 202: 225–237.
- Pittendrigh, C.S. & Daan, S. 1976a. A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. I. The stability and liability of spontaneous frequency. *Journal of Comparative Physiology A* 106: 223–252.
- Pittendrigh, C.S. & Daan, S. 1976b. A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. IV. Entrainment: pacemaker as a clock. *Journal of Comparative Physiology A* 106: 291–331.

- Pittendrigh, C.S. 1981. Circadian organization and the photoperiodic phenomena. *In*: Follet, B.K.; Follet, D.E. (Eds.). Biological clocks in seasonal reproductive cycles. John Wiley & Sons, Nova York. Pp 1–35
- Redlin, U. 2001. Neural basis and biological function of masking by light in mammals: suppression of melatonin and locomotor activity. *Chronobiology International* 18: 737–758.
- Redlin, U.; Mrosovsky, N. 2004. Nocturnal activity in a diurnal rodent (*Arvicanthis niloticus*): the importance of masking. *Journal of Biological Rhythms* 19(1): 58–67.
- Refinetti, R. 2008. The diversity of temporal niches in mammals. *Biological Rhythm Research* 39: 173–192.
- Reig, O.A. 1970. Ecological notes on the fossorial rodent *Spalacopus cyanus* (Molina). *Journal of Mammalogy* 51(3): 592–601.
- Rezende, E.L.; Cortés, A.; Bacigalupe, L.D.; 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.
- Ricio, A.P. & Goldman, B.D. 2000. Circadian rhythms of locomotor activity in naked mole-rats (*Heterocephalus glaber*). *Physiology & Behavior* 71: 1–13.
- Roces, F.; Núñez, J.A. 1996. A circadian rhythm of thermal preference in the ant *Camponotus mus*: masking and entrainment by temperature cycles. *Physiological entomology* 21: 138–142.
- Roll, U.; Dayan, T.; Kronfeld-Schor, N. 2006. On the role of phylogeny in determining activity patterns of rodents. *Evolutionary Ecology* 20: 479–490
- Schleich, C.E.; Vielma, A.; Glösnabb, M.; Palacios, A.G.; Peichl, L. 2010. Retinal photoreceptors of two subterranean tuco-tuco species (Rodentia, Ctenomys): morphology, topography and spectral sensitivity. *Journal of Comparative Neurology* 518: 4001–4015.
- Sikes, R.S.; Gannon, W.L.; 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.
- Smale, L.; Lee, T.; Nunez, A.A. 2003. Mammalian diurnality: some facts and gaps. *Journal of Biological Rhythms* 18(5): 356–366.
- 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.

- Urrejola D.; Lacey, E.A.; Wieczorek, J.R.; Ebensperger, L.A. 2005. Daily activity patterns of free-living cururos (*Spalacopus cyanus*). *Journal of Mammalogy* 86: 302–308.
- U.S. Naval Oceanography Portal. (www.usno.navy.mil). Último acesso em Outubro de 2011.
- Valentinuzzi, V.S.; Oda, G.A.; Araújo, J.F.; Ralph, M.R. 2009. Circadian pattern of wheel running activity of a South American subterranean rodent (*Ctenomys knighti*). *Chronobiology International* 26: 14–27.
- Vassallo, A.I.; Kittlein, M.J.; Busch, C. 1994. Owl predation on two sympatric species of tuco-tucos (Rodentia: Octodontidae). *Journal of Mammalogy* 75: 725–732.
- Vivanco, P.; Rol, M.A.; Madrid, J.A. 2010. Temperature cycles trigger nocturnalism in the diurnal homeotherm *Octodon degus*. *Chronobiology International* 27: 517–534.

Resumo

Os tuco-tucos de Anillaco (*Ctenomys cf. knighti*) são roedores subterrâneos noturnos quando colocados em ciclo claro-escuro no laboratório. Com o interesse de se investigar o quanto um animal subterrâneo se expõe à luz, foi realizado um experimento de observação contínua em campo durante as horas de claro do dia. Três indivíduos, um em cada estação, foram observados em uma arena semi-natural. Essas observações revelaram que os tuco-tucos não apenas saíam freqüentemente durante as horas de claro do dia, como também apresentavam atividades robustas de forrageamento e remoção de terra de seus túneis. Uma vez que não se tinha conhecimento da atividade abaixo da terra ou durante à noite, foram examinados os pós-efeitos do arrastamento em campo para se investigar se o ritmo estaria sincronizado em campo e o quanto da atividade observada correspondia à atividade total do animal. Os pós-efeitos foram acessados pela transferência dos animais observados diretamente da arena para condições constantes. Surpreendentemente os animais exibiram uma atividade robusta concentrada na fase correspondente à noite ambiental sem transientes e sem traços da atividade diurna previamente observada em campo. Esse padrão foi observado em outros 10 animais trazidos dessa vez diretamente do campo e colocados em condições constantes. Além disso, não foram observadas diferenças na fase de atividade de animais com e sem acesso a rodas de atividade. Portanto, nosso estudo com esses animais subterrâneos pode contribuir com elementos ecológicos nas discussões recentes sobre o significado da atividade diurna em animais que são noturnos segundo a fase do oscilador.

Abstract

South American subterranean rodents (*Ctenomys* cf. *knighti*), commonly known as tuco-tucos, display robust, nocturnal, wheel-running rhythms under a light-dark condition. To verify whether these subterranean and nocturnal animals ever expose themselves to light in the field, individual animals were continuously observed during light hours in a semi-natural enclosure that was constructed in their natural habitat. Observations during different seasons revealed that tuco-tucos not only emerged aboveground during daylight hours but also that their light exposure was due to robust diurnal activities of foraging and soil removal. Because of the lack of access to these animals' subterranean and nocturnal activities in the field, the aftereffects of field entrainment were examined instead to verify the contribution of the previously observed diurnal behaviors to the total daily activity. This examination was achieved by transferring the observed animals from a field enclosure to constant laboratory conditions. Surprisingly, tuco-tucos exhibited robust activity concentrated in the phase corresponding to the external night without any trace of transients or of the diurnal activity that was observed in the enclosure. This pattern was also replicated when the aftereffects of the field entrainment of other animals trapped directly from the field were measured in the laboratory. Furthermore, no difference was detected in the activity measured with and without access to a running wheel. Our study of a wild subterranean species in its natural habitat can contribute novel ecological elements to the recently debated issue of the meaning of day-activity displayed by nocturnal rodents in the field.

Anexo 1: Caracteres para a descrição dos tuco-tucos de Anillaco

Os tuco-tucos de Anillaco (La Rioja, Argentina) consistem em uma espécie nova. Especialistas do gênero sugeriram inicialmente que esses tucos-tucos pertencessem à espécie *Ctenomys knighti* Thomas, 1919. Entretanto existem diferenças morfológicas e cariotípicas entre os animais de Anillaco, *C. knighti* e as demais espécies de *Ctenomys* das regiões vizinhas. Além disso, a área de ocorrência do tuco-tuco de Anillaco é distinta daquela de *C. knighti*.

Com o intuito de descrever o tuco-tuco de Anillaco como uma nova espécie, uma extensa busca bibliográfica foi realizada, levantando-se os principais caracteres morfológicos importantes na descrição de roedores e especialmente de espécies de *Ctenomys*. Todas as descrições originais das espécies geograficamente próximas foram obtidas para comparação (Tabela A1). Os muitos espécimes disponíveis dos tuco-tucos de Anillaco serão utilizados nessa descrição. Este primeiro levantamento de caracteres foi realizado em conjunto com Rodrigo Brincalepe Salvador.

Os caracteres comumente utilizados na descrição de espécies de *Ctenomys* são:

- Coloração (pelagem): cor da base da pelagem dorsal, cor da ponta da pelagem dorsal, cor da base da pelagem ventral, cor da ponta da pelagem ventral.
- Coloração (pele): cor do focinho, pés e cauda.
- Morfometria geral: comprimento total, comprimento da cauda, tamanho da orelha, tamanho das patas traseiras.
- Morfometria cranial: comprimento do occipitonasal, largura do zigomático, largura do esquamosal, altura cranial, comprimento do nasal, comprimento do rostral, menor largura interorbital, comprimento do parietal, largura interparietal, comprimento do interparietal, comprimento da fileira de dentes maxilar. Todas as medidas seguem Anderson (2003) e Fornel (2010).

As etapas seguintes do trabalho de descrição consistem na confecção de um mapa de distribuição, tomada das medidas de crânio e análise das peles dos animais taxidermizados, bem como a comparação com os dados da literatura. Todos os

espécimes serão depositados em museus argentinos, sendo que se pretende que a série de parátipos seja a mais variada e completa possível, contando com peles e esqueletos de machos, fêmeas e jovens. Esse trabalho será realizado com Rodrigo B. Salvador e Lucía Krapovickas.

Tabela A1: Dados das espécies de *Ctenomys* que ocorrem próximas a Anillaco, La Rioja.

Espécie	Autor, ano de descrição	Localidade	Cariótipo (Fornel, 2010)
<i>Ctenomys tucumanus</i>	Thomas, 1900	Tucumán (altitude 450m)	2n=28
<i>Ctenomys pundti</i>	Nehring, 1900		2n=50
<i>Ctenomys bergi</i>	Thomas, 1902	Cruz del Eje, Cordoba	2n=48
<i>Ctenomys latro</i>	Thomas, 1918	Tapia, Tucumán (altitude 600m)	2n=40-42
<i>Ctenomys pontifex</i>	Thomas, 1918	Forte San Rafael, Mendoza	nd
<i>Ctenomys coludo</i>	Thomas, 1920a	La puntilla, próx. Tinogasta, Catamarca (altitude 1000m)	nd
<i>Ctenomys famosus</i>	Thomas, 1920b	Sierra Famatina, La Rioja (altitude 2600 a 3800m)	nd
<i>Ctenomys osvaldoreigi</i>	Contreras, 1995	Cruz del Eje, Córdoba (altitude 2000m)	2n=52
<i>Ctenomys knighti</i>	Thomas, 1919	Otro Cerro, Chumbicha, La Rioja	2n=36

Referências bibliográficas:

- Anderson, R.P. 2003. Taxonomy, distribution, and natural history of the genus *Heteromys* (Rodentia: Heteromyidae) in Western Venezuela, with the description of a dwarf species from the Península de Paraguaná. American Museum Novitates 3396: 1–43.
- Contreras, J.R. 1995. *Ctenomys osvaldoreigi*, una nueva especie de tuco-tuco procedente de las sierras de Cordoba, Republica Argentina (Rodentia: Ctenomyidae). Notulas Faunisticas 84: 1-4.
- Fornel, R. 2010. Evolução na forma e tamanho do crânio no gênero *Ctenomys* (Rodentia: Ctenomyidae). Tese de doutorado (inérita). Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Nehring, A. 1900. Über *Ctenomys Pundti* n. sp. und *Ct. minutus* Nhrig. Zoologischer Anzeiger 23: 420-425.
- Thomas, O. 1900. Descriptions of new rodents from Western South America. The Annals & Magazine of Natural History 7(6): 749.
- Thomas, O. 1902. On mammals collected at cruz del Eje, Central Cordova, by Mr. P. O. Simons. The Annals & Magazine of Natural History 7(9): 17-245.
- Thomas, O. 1918. Two new tuco-tucos from Argentina. The Annals & Magazine of Natural History 9(1): 38-40.

- 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.
- Thomas, O. 1920. On mammals from near Trinogasta, Catamarca, collected by Sr. Burdin. *The Annals & Magazine of Natural History* 9(6): 116-120.
- Thomas, O. 1920. On small mammals from the Famatina Chain, North-western Rioja. *The Annals & Magazine of Natural History* 9(6): 417-422.

Anexo 2: Animais utilizados nos experimentos

A Tabela A2 contém informações dos animais utilizados nos experimentos descritos nesta dissertação. Os animais da rádio-telemetria e da arena experimental foram pesados logo antes da soltura, e, quando possível, após a recaptura. Os animais vindos diretamente do campo foram pesados imediatamente após a captura, antes de serem colocados em condições constantes. Não foi possível pesar todos os animais antes de colocá-los em condições constantes, pois o experimento do pós-efeito exige que os animais sejam expostos ao mínimo de estímulos (inclusive luminosos) possível.

Tabela A2: Lista dos animais utilizados nos experimentos com as datas de entrada e saída dos respectivos experimentos. *O peso do animal #65 da observação do verão de 2011 corresponde a uma soltura/recaptura/soltura anterior à observação.

animal	sexo	peso			telemetria		observação contínua		pós efeito	
		soltura	recaptura	captura	início	término	início	término	início	término
#13	f	186,40g	165,50g				01/03/2010	11/03/2010	15/03/2010	07/07/2010
#55	m	182,30g			sensor não funcionou					
#58	f	193,60g			27/02/2010	01/03/2010				
#59	f	131,02g			28/03/2010	03/03/2010				
#65	f	142,00g*	125,67g*				01/03/2011	10/03/2011	10/03/2011	16/03/2011
#68	f	141,00g	129,83g				23/07/2010	24/08/2010	14/08/2010	24/08/2010
#70	f			134,55g					20/05/2010	21/07/2010
#71	m			208,93g					22/05/2010	22/07/2010
#72	f			142,80g					09/06/2010	15/06/2010
#75	f								16/06/2010	20/07/2010
#76	m								09/07/2010	20/07/2010
#77	m								12/07/2010	20/07/2010
#80	m								06/08/2010	14/08/2010
#81	m			159,78g					08/08/2010	15/08/2010
#82	m			128,47g					11/08/2010	24/08/2010
#83	m								16/08/2010	24/08/2010

Anexo 3: Ficha de observação

Para uniformizar as observações foram utilizadas fichas de observação (Figuras A1 e A2). A sugestão de utilizar tal material foi dada pelo professor Gabriel Francescoli (Universidad de La Republica Oriental Del Uruguay).

Em cada quadrado era escrito o tipo de atividade que o animal estava realizando e nas linhas verticais ao lado dos quadrados eram colocadas as horas de início e término da atividade. As atividades eram marcadas como: E = escavação; F = forrageamento; V = vigilância (postura de alerta); N = nenhuma atividade.

Em muitos casos o animal entrava e saía rapidamente de seu túnel, ou entrava e permanecia por alguns segundos dentro do túnel antes de voltar a sair. Dessa forma, para se considerar que a atividade havia acabado o animal deveria permanecer ao menos 1 minuto sem realizá-la.

O comportamento de vigilância era notado antes da escavação e do forrageamento. Além disso, cada observador definia de forma arbitrária quando o animal apresentava ou não tal comportamento. Dessa forma, ele foi excluído da análise.

	N	F	N	VF	N	VF	N	VF	E	N
06:30	07:37	07:39	08:05	08:11	08:13	08:18	08:28	08:34	08:36	

Figura A1: Exemplo de anotação na ficha de observação.

Data:

Figura A2: Ficha de observação.

Anexo 4: Outros animais

A atividade de outros animais localizados próximos à arena experimental podia ser inferida de duas formas: pela observação direta de animais que eventualmente apareciam próximos à arena experimental e pelo registro das vocalizações dos tuco-tucos próximos.

Observações

A ocasião em que foi possível registrar com maior precisão a atividade de outro animal foi durante o inverno de 2010, quando um indivíduo surgiu ao lado da arena e permaneceu escavando (Tabela A3). O horário dessas escavações coincidia com os horários que o animal da arena era observado, além disso, essa atividade foi igualmente robusta.

Tabela A3: Escavações de um tuco-tuco do lado de fora da arena experimental.

28/07/2010		29/07/2010		30/07/2010	
início	término	início	término	início	término
09:00	09:40	12:21	12:24	10:55	11:38
11:57	11:58	13:52	14:17		
12:18	12:44				
12:45	12:55				
77 minutos		28 minutos		43 minutos	

Vocalizações

A vocalização de defesa territorial dos tuco-tucos, denominada “tipo S”, é muito característica e fácil de ser detectada sem a necessidade de equipamentos especiais, pois ela consiste em notas repetidas e pode durar mais de um minuto (Francescoli, 1999; Francescoli & Quirici, 2010).

A área cercada onde as observações foram realizadas foi construída em um local onde tuco-tucos selvagens naturalmente habitam. Dessa forma, durante todas as fases de observação, havia animais selvagens próximos. Como não era possível distinguir entre a vocalização do animal observado e dos demais, todos os episódios de vocalização foram anotados juntos (Figura A3).

Não é possível tirar conclusões do padrão de atividades dos animais em campo somente a partir dessas vocalizações. Entretanto, é interessante notar que o padrão de vocalizações variou nas diferentes estações de observação: no inverno as vocalizações

ocorreram mais intensamente próximas ao meio do dia, no verão seco (2010) elas foram esparsas e no verão chuvoso (2011) elas ocorreram mais concentradas pela manhã. É importante ressaltar que não foram realizadas observações durante a noite, de forma que não foram anotadas vocalizações noturnas. Porém elas também ocorrem nessa fase, ao menos esporadicamente, visto que em diversos momentos, durante a fase de telemetria, foram ouvidas vocalizações durante a noite.

Figura A3: Soma de todos os episódios de vocalização a cada 15 minutos em todas as fases de observação. Os gráficos mostram apenas as horas nas quais foram realizadas as observações.

Referências bibliográficas

- Francescoli, G. 1999. A preliminary report on the acoustic communication in Uruguayan *Ctenomys* (Rodentia, Octodontidae): basic sound types. *Bioacoustics* 10: 203-218.
- Francescoli, G.; Quirici, V. 2010. Two different vocalization patterns in *Ctenomys* (Rodentia: Ctenomyidae) territorial signs. *Mastozoología Neotropical* 17:141-145.