

SBI-IFUSP



Universidade de São Paulo
Instituto de Física

Ritmos Biológicos Observados em Insetos Cavernícolas

Tese apresentada ao
Instituto de Física da
Universidade de São Paulo
para a obtenção do título
de Doutor em Ciências

Banca Examinadora

Prof. Dr. Iberê L. Caldas (IF-USP) *Iberê Luiz Caldas*
Prof. Dr. Amando Ito (IF-USP)
Prof. Dr. José C. Sartorelli (IF-USP)
Prof. Dr. José E. Bicudo (ICB)
Profa. Dra. Mirian D. Marques (Museu de Zoologia - USP)

Orientador: Prof. Dr. Iberê L. Caldas
Coorientador: Prof. Dr. José R. C. Piqueira

Gisele Akemi Oda
agosto de 1997

Sylvio Canuto
Prof. Sylvio Roberto Accioly Canuto
Presidente da Comissão de Pós-Graduação



571.77

022r

Dex. 1

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Serviço de Biblioteca e Informação
do Instituto de Física da Universidade de São Paulo

Oda, Gisele Akemi

Ritmos Biológicos Observados em Insetos Cavernícolas.
São Paulo, 1997.

Tese (Doutoramento) Universidade de São Paulo.
Instituto de Física - Departamento de Física Aplicada

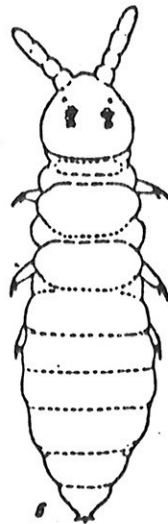
Área de Concentração: Física Nuclear
Orientador: Prof. Dr. Iberê Luiz Caldas
Co-orientador: Prof. Dr. José R. C. Piqueira

Unitermos: 1. Cronobiologia; 2. Osciladores;
3. Ritmos Biológicos.

USP/IF/SBI - 34/97

Universidade de São Paulo
Instituto de Física

Ritmos Biológicos Observados em Insetos Cavernícolas



Orientador: Prof. Dr. Iberê L.Caldas
Coorientador: Prof. Dr. José R.C.Piqueira
Trabalho realizado no Museu de Zoologia USP, sob a
supervisão da Profa. Dra. Mirian D. Marques

Gisele Akemi Oda
agosto de 1997

A meus pais,
Haruko e Akio

"There is a square, there is an oblong. The players take the square and place it upon the oblong. They place it very accurately; they make a perfect dwelling place. Very little is left outside. The structure is now visible; what was inchoate is here stated; we are not so various or so mean; we have made oblongs and stood them upon squares. This is our triumph; this is our consolation."

Virginia Woolf

Agradecimentos

Agradeço, profundamente, aos três orientadores deste trabalho:

Ao prof. Iberê L. Caldas, do Instituto de Física da USP, pela orientação da parte matemática, por ter proporcionado contato com as técnicas e abordagens de sistemas dinâmicos. Agradeço o auxílio, a paciência e a amizade, em todos os momentos.

Ao prof. José R.C. Piqueira, da Engenharia Elétrica da Poli USP, pelas discussões, pelas aulas e por ter proporcionado contato com as várias abordagens da biomatemática. Agradeço o auxílio, o incentivo e a amizade, em todos os momentos.

À profa. Mirian D. Marques, do Museu de Zoologia da USP, pela recepção em seu projeto de pesquisa, a transmissão de técnicas e a orientação minuciosa de toda a parte biológica, a divisão da tarefa experimental, as aulas e o enorme entusiasmo. Agradeço a dedicação, o incentivo, o auxílio e a amizade, em todos os momentos.

Agradeço a todos que participaram das várias fases desse trabalho:

Ao prof. James M. Waterhouse, da School of Biological Science, Univ. de Manchester, pelo interesse e orientação da parte estatística, pelas sugestões, comentários, incentivo, os livros e referências.

À Ana Amélia B. Silva, do EPUSP, pelo interesse, coleguismo e orientação nas análises estatísticas dos dados.

Ao Kai Ullmann, do IFUSP, pelo auxílio matemático, e a convivência diária.

Ao prof. Luiz Menna Barreto e prof. Nelson Marques do ICB, pela recepção no grupo e o excelente curso de introdução à Cronobiologia. A todos os membros do grupo GMDRB (ICB), pela recepção.

Aos desenhistas do IFUSP Carlos R. Marques e Carlos E.F. Siqueira, pelas figuras desta tese.

A todos os funcionários do Museu de Zoologia da USP, pela atenção, a simpatia e colaboração durante a fase experimental do trabalho, em especial ao Luiz e à Alzira.

Ao Wanderley e Renata, do IFUSP, pelo auxílio no computador e amizade.

Às colegas do Museu de Zoologia da USP Sônia, Samira, Kátia, Mirian e Daniela, pelos bons momentos convividos e a grande amizade.

Ao colega do EPUSP Luiz, pela amizade e incentivo.

Aos colegas do Grupo de Plasma do IFUSP, Edson, Anselmo, Ismael, José, Sílvio, Fábio, Elisângela, Gesil, Valdemar, Paulo, André, Zoezer, Raul, Mauro, Kenya, Ibrahim, Ernesto, Moraes, Murilo, Gilberto, Renato e a todos os professores do grupo, pela convivência diária e a amizade.

Às secretárias Eleonora, Sylvia e Lia, do departamento do IFUSP, pela amizade e colaboração.

Às grandes amigas da república Luísa, Lilian e Márcia, pelos bons tempos de convivência.

A todos os meus amigos.

A meus pais, irmãs, Kaname e sogros pelo interesse e incentivo.

Ao Pedro, que repartiu os bons e maus momentos da tese, um agradecimento especial.

À Fapesp, pelos equipamentos utilizados.

Ao Cnpq, pelo auxílio financeiro.

Resumo

Este trabalho consiste na realização experimental de uma Curva de Resposta de Fases (PRC) de ritmos biológicos infradianos observados em insetos cavernícolas da espécie *Folsomia candida*. Sendo os insetos cegos, utilizamos pulsos de temperatura para provocar os deslocamentos de fase. Obtivemos PRCs com apenas atrasos, com a característica topológica do Tipo 1, para as três durações diferentes dos pulsos utilizados. Essa característica difere das típicas respostas observadas nos osciladores do tipo ciclo-limite, os quais são associados à maioria dos ritmos biológicos. A dimensão de um oscilador determina quais os tipos de PRCs que o sistema pode apresentar, quando sujeito a perturbações, em suas diferentes fases. Relógios simples são associados a ciclos constituídos por uma seqüência discreta de eventos encadeados, estando cada evento dependente do término do anterior, para se iniciar. Esses são sistemas unidimensionais, diferindo dos ciclos-limites pela impossibilidade de apresentar PRCs do Tipo 0 e singularidades de fase. Associamos um modelo de relógios simples para os ritmos infradianos estudados, baseados nas características observadas nas PRCs e por estar de acordo com as bases fisiológicas dos mesmos.

Abstract

In this work, we constructed Phase Resetting Curves (PRC) of the infradian biological rhythms of the cave insects *Folsomia candida*. We used temperature pulses to reset the phases of these rhythms, since the insects are blind. We obtained PRCs with delays only, of the topological Type 1, for the three different pulse durations. This is an unusual behavior, considering the typical responses of the limit-cycle oscillators associated to the majority of the biological rhythms. The dimension of an oscillator determines the PRC types that a system, submitted to pulses at different phases, can present. Simple clocks are associated to a sequence of discrete linked events, each event leading to the next and playing a functional role in generating the rhythmicity. They are unidimensional systems and can't present Type 0 PRCs and singularities, as the two-dimensional limit cycles. Based on the properties of the experimental curves and knowing the physiological bases of these insect rhythms, we propose a simple clock model for the infradian rhythms studied here.

Índice

Introdução	3
1 Modelos Matemáticos de Sistemas Biológicos	8
1.1 Introdução	8
1.2 Abordagem com equações explícitas	9
1.3 Abordagem sem equações explícitas	13
2 Cronobiologia	17
2.1 Organização Temporal dos Seres Vivos	17
2.2 Os Ritmos Circadianos	20
2.3 Ritmos sem Correlatos Geofísicos	22
3 Modelos de Osciladores Biológicos	25
3.1 Representação dos Sistemas Dinâmicos	26
3.2 Osciladores Conservativos e Dissipativos	28
3.3 Osciladores do Tipo Ciclo-Limite	29
3.4 Sincronização dos Ritmos	31
3.4.1 Sincronização por Forças Externas Impulsivas	31
3.4.2 Sincronização por Acoplamento de Osciladores	43
3.5 Modelos de Realimentação	47
4 Curvas de Respostas de Fases em Ciclos Infradianos	51
5 Parte Experimental	54
5.1 Metodologia de Investigação em Cronobiologia	54
5.1.1 Metodologia de Obtenção da Curva de Resposta de Fases	55
5.2 A Obtenção Experimental da Curva de Resposta de Fases . .	58

5.2.1	Materiais e Métodos	58
5.2.2	Resultados	62
5.3	Análise Estatística	69
5.3.1	Teste de Normalidade	69
5.3.2	Verificação de Dependência de Fase dos Resultados . .	70
5.3.3	Verificação de Dependência de Fase considerando o Grau de Adiantamento	75
5.3.4	Verificação de Diferenças entre M1 e M2	75
5.3.5	Verificação de Transientes	76
6	Discussão dos Resultados e Modelo	78
6.1	Principais Aspectos Observados	78
6.2	Considerações sobre a Natureza do Pulso	79
6.3	Discriminação do Oscilador através de uma PRC	84
6.4	Ciclos-Limites e Relógios Simples	87
6.5	Relógio Simples Subjacente aos Ritmos de Muda e de Oviposição	88
	Conclusões	97

Introdução

Recentemente, o interesse sobre os sistemas dinâmicos não-lineares na biologia tem crescido bastante, o que se reflete no número crescente de revistas, livros e reuniões científicas que tratam desse assunto (Elbert et al 1994) (Ditto 1993) (Glass, Mackey 1988) (Murray 1989).

Entre as áreas da biologia que têm apresentado contribuições significativas da teoria de sistemas dinâmicos está a cronobiologia, que é o estudo da organização temporal dos seres vivos (Winfrey 1980) (Moore-Ede, Czeisler 1984). Essa organização manifesta-se na presença de ritmos biológicos em processos fisiológicos e comportamentais, desde seres unicelulares a pluricelulares, apresentando periodicidades que vão de milissegundos a anos.

A cronobiologia tem centrado a atenção, principalmente, no estudo dos ritmos circadianos, que apresentam periodicidades de 24 horas, iguais aos do ciclo ambiental de claro-escuro. A natureza autônoma desses ritmos é verificada ao persistirem, sob condições ambientais constantes, no laboratório, apresentando períodos um pouco diferentes de 24 horas. Ciclos artificiais de iluminação e mesmo breves pulsos periódicos de luz podem, novamente, sincronizar esses ritmos (Aschoff et al 1969). Além da luz, vários outros fatores ambientais podem sincronizar os ritmos biológicos, como a temperatura, disponibilidade alimentar, som e interação social.

Modelos de ciclo-limite têm sido propostos na descrição matemática da maioria das oscilações biológicas. Esses modelos têm contribuído significativamente na compreensão dos comportamentos de ritmos biológicos, como a sincronização pelos fatores ambientais e acoplamentos entre diversos osciladores (Glass, Mackey 1988). Especulações quanto à natureza do oscilador são formuladas a partir da observação de um ritmo controlado por ele, consistindo numa maneira indireta de investigação. Experimentos baseados nessa idéia, verificando os comportamentos dos ritmos sob as mais variadas con-

dições, têm trazido muitas contribuições na elucidação da estrutura e do funcionamento do sistema circadiano (Pittendrigh, Daan 1976).

Ritmos ultradianos e infradianos, que apresentam periodicidades menores e maiores do que 24 horas, respectivamente, são pouco estudados, comparados aos circadianos. Dentre eles, aqueles que não apresentam correlatos geofísicos nas periodicidades são ainda menos investigados.

Neste trabalho, estudamos os ritmos infradianos observados em insetos da espécie *Folsomia candida*, que vivem em cavernas, onde o ciclo de claro-escuro, praticamente, não existe. Nesse caso, esperamos identificar ritmos "puros", desvinculados de um sistema de sincronização por ciclos ambientais, podendo esclarecer as bases de ritmos infradianos semelhantes que ocorrem em outras espécies.

Essa investigação dos ritmos infradianos dos colêmbolos foi feita através da construção de Curvas de Resposta de Fases (PRC, do inglês "Phase Response Curve"). Experimentos de PRC constituem a forma mais elaborada de investigação indireta da natureza de um oscilador, deduzindo-a a partir de suas respostas a perturbações externas aplicadas em fases diferentes do ciclo. A construção de PRCs tem se tornado um procedimento usual, na cronobiologia, e as inferências de suas características estão baseadas na teoria dos osciladores. Não há, na literatura, nenhum relato anterior de PRC em ciclos infradianos.

Nosso objetivo foi desenvolver um trabalho interdisciplinar na área de cronobiologia, participando da realização de um experimento de PRC no Museu de Zoologia da USP e modelando os resultados, do ponto de vista da teoria dos sistemas dinâmicos.

Muitas vezes, trabalhos de modelamento matemático de sistemas biológicos são criticados pelo distanciamento das análises matemáticas do problema biológico inicial. Essa crítica constituiu uma preocupação constante em nosso trabalho, de forma que norteamos, na medida do possível, o encaminhamento das análises para as questões cronobiológicas.

Existem várias maneiras de se abordar matematicamente um sistema biológico. Acharmos conveniente, nesta tese, além de apresentar o trabalho específico desenvolvido, apresentar também um quadro dessas diversas

abordagens, no capítulo 1, para ajudar, como guia, outros estudantes que pudessem se interessar pelo mesmo tipo de trabalho. Dessa forma, dedicamos uma boa parte da tese à apresentação das abordagens matemáticas baseadas em dados experimentais e, mais especificamente, sobre problemas de cronobiologia, tendo o estudo dessas questões ocupado, proporcionalmente, grande parte do doutorado.

As abordagens matemáticas de problemas biológicos são variadas, podendo ser classificadas através de diversos critérios. Achemos interessante, aqui, apresentá-las segundo dois pontos de vista, como estão no **capítulo 1**: modelos que buscam explicar os mecanismos dos processos biológicos observados, identificando-os com equações explícitas, e modelos que caracterizam qualitativamente os comportamentos biológicos observados, considerando os mecanismos como caixas-pretas. A apresentação dos exemplos mais notórios dessas duas abordagens, na biologia, serve para ilustrar a diferença desses dois pontos de vista e o alcance de cada uma. Essas duas abordagens, contudo, aparecem em qualquer trabalho de modelamento matemático de um sistema real construído sobre dados experimentais. A apresentação desses critérios de classificação nos pareceu apropriada, neste trabalho, para mostrar quais são as suas bases, seus alcances e limitações, legitimando o tipo de modelo que construímos.

No **capítulo 2**, vamos apresentar os principais conceitos da cronobiologia, localizando o nosso problema dentro de uma perspectiva cronobiológica. Apresentamos considerações sobre o aspecto adaptativo das espécies terem desenvolvido um relógio interno sincronizado pelos ciclos ambientais, refletindo nos ritmos com periodicidades iguais a esses ciclos (Enright 1970). O principal sincronizador, na maioria das espécies, é o ciclo de claro-escuro da Terra. Ritmos circadianos, com periodicidades de 24 horas, são, portanto, os mais estudados na cronobiologia, tanto do ponto de vista das propriedades comportamentais como da identificação anatômica, nas diversas espécies, das principais estruturas envolvidas na geração da ritmicidade e nos processos de sincronização (Moore-Ede 1982). Ritmos infradianos (com períodos maiores do que 24 horas) são pouco estudados e conhecidos quanto à sua natureza. Nosso trabalho consiste no modelamento de ritmos infradianos em insetos cavernícolas, cujos habitats são destituídos do ciclo de claro-escuro. Eles apresentam uma série de peculiaridades que os tornam ideais para o tipo de experimento realizado.

No **capítulo 3**, vamos apresentar os dois tipos de abordagens de mode-

lamentos tratados no cap.1, aplicados a problemas de cronobiologia.

Em trabalhos de modelamento de oscilações, a impossibilidade de se identificar as equações explícitas de um sistema não impede que muitos de seus comportamentos resultantes sejam entendidos através de propriedades comuns à classe de osciladores ao qual ele pertence (Ding 1987) (Glass e Mackey 1988). Ritmos biológicos são associados a osciladores do tipo ciclo-limite e muitos de seus comportamentos são entendidos a partir de argumentos puramente geométricos decorrentes das propriedades dessa classe de osciladores: pulsos de luz podem deslocar as fases das oscilações biológicas e pulsos periódicos podem sincronizar essas oscilações, de forma que elas passam a oscilar com a mesma periodicidade deles, mantendo uma relação de fase constante (Pavlidis 1969a). A magnitude e direção dos deslocamentos de fase causados por um pulso, nas diferentes fases de uma oscilação, são apresentadas pela Curva de Resposta de Fase (PRC, do inglês "Phase Response Curve") (Pittendrigh, Daan 1976). A construção de PRCs tem se tornado um procedimento básico na cronobiologia e constitui o nosso objetivo experimental.

Apesar de não ter sido utilizado em nosso trabalho, vamos apresentar, brevemente, os passos da construção de um modelo de realimentação, que descreve mecanismos geradores da ritmicidade no nível bioquímico, para ilustrar uma abordagem com equações explícitas na cronobiologia. Relações excitatórias ou inibitórias entre diversas reações de uma alça de realimentação podem gerar um regime oscilatório, sendo as condições para o surgimento desse regime previstas pelas equações que descrevem essa alça (Ogata 1982). Esse tipo de modelamento é realizado na medida da possibilidade de se identificar, ponto a ponto, as principais reações químicas envolvidas na geração da ritmicidade com variáveis e parâmetros das equações. Avanços nas áreas de bioquímica celular, biologia molecular e genética têm possibilitado o desenvolvimento recente de um grande número desses modelos (Goldbeter 1996).

No **capítulo 4**, vamos apresentar as principais motivações cronobiológicas de nosso trabalho. Ritmos infradianos são pouco investigados, quanto à sua natureza, comparados aos circadianos, sendo os infradianos sem correlatos geofísicos muito menos conhecidos. Não existe, na literatura, nenhum relato de PRC de um ciclo infradiano, o que nos motivou à realização deste experimento. PRCs fornecem muitas informações sobre a natureza de um oscilador, constituindo na forma mais elaborada de investigação indireta do oscilador, deduzindo a sua natureza a partir das respostas a perturbações aplicadas em

fases diferentes do ciclo.

No **capítulo 5**, vamos apresentar, inicialmente, os principais procedimentos na elaboração de um experimento em cronobiologia e, em particular, de PRCs. Vamos descrever as condições gerais de nosso experimento, como as formas de manutenção dos insetos e a maneira como foi feita a coleta de dados. Pelo fato desses insetos serem insensíveis à luz, os pulsos utilizados nesta PRC foram de temperatura. Vamos descrever como esses pulsos eram administrados em fases diferentes dos ciclos e as características gerais dos resultados do experimento. Finalmente, vamos apresentar os testes de bioestatística empregados na avaliação da significância dos resultados.

No **capítulo 6**, vamos apresentar as principais considerações que nortearam a elaboração do modelo dos ritmos infradianos dos colêmbolos, baseados nos resultados das PRCs.

Capítulo 1

Modelos Matemáticos de Sistemas Biológicos

Existem duas maneiras básicas de se modelar matematicamente sistemas reais: com equações explícitas e sem equações explícitas. Neste capítulo, essas duas linhas de abordagem serão descritas, ressaltando-se que ambas foram estudadas como alternativas no modelamento de dados de experiências de cronobiologia realizadas com insetos cavernícolas.

1.1 Introdução

A teoria de sistemas dinâmicos não-lineares tem proporcionado importantes contribuições em áreas tão diversas como a astronomia, meteorologia, climatologia, química e biologia, além de possivelmente se aplicar à economia e à sociologia. Uma revisão crítica do grau de relevância dessas contribuições encontra-se no artigo de David Ruelle, que tem como sugestivo título “Where can one hope to profitably apply the ideas of chaos?” (Ruelle 1994).

Esta possibilidade de modelar sistemas tão diferentes deve-se ao enorme poder unificador da matemática: é interessante notar o **isomorfismo** existente entre sistemas análogos que, mesmo tendo naturezas bem diversas, podem ainda assim ter seus comportamentos regidos pelas mesmas equações diferenciais. Um clássico exemplo dessa analogia é o pêndulo mecânico e o circuito elétrico: ambos os sistemas podem ser descritos pelas mesmas equações, de forma que uma correspondência entre variáveis e parâmetros equivalentes

de cada um dos sistemas pode ser feita (ângulo de deslocamento-corrente elétrica; massa-indutância; resistência do ar-resistência elétrica). Isso possibilita simular um sistema com a manipulação dos parâmetros equivalentes de um sistema isomorfo de controle mais fácil, bem como a compreensão de um sistema mais abstrato através da observação comportamental de um sistema isomorfo mais intuitivo (D'Humieres 1982). Da mesma forma, é conveniente se representar o intrincado mecanismo dos ritmos biológicos através de um modelo de osciladores físicos, os quais permitem uma compreensão mais sistemática da variedade de fenômenos observados. A motivação para construirmos modelos matemáticos de sistemas reais baseia-se nesta busca de uma representação que permita compreender o sistema melhor, através de analogias, e torná-lo manipulável, permitindo fazer previsões de seu comportamento (Benedito-Silva 1997).

Equações diferenciais e mapas não-lineares têm modelado satisfatoriamente uma série de sistemas biológicos. Mais recentemente, com a verificação de comportamentos caóticos em sistemas fisiológicos, um interesse crescente tem sido devotado aos modelos matemáticos de sistemas biológicos (Elbert et al, 1994)(Ditto 1993).

Em linhas gerais, a abordagem matemática de problemas biológicos tem seguido caminhos diferentes, dependendo do conhecimento que se tem das bases do mecanismo do sistema estudado: a abordagem com equações explícitas é possível quando se tem conhecimento, em algum nível, dessas bases; a abordagem sem equações explícitas trata o mecanismo como uma caixa-preta e enfoca a caracterização global dos comportamentos finais apresentados pelo sistema.

1.2 Abordagem com equações explícitas

Quando é possível conhecer as bases do mecanismo de um processo biológico e quando o comportamento resultante é muito análogo ao de um sistema isomorfo padrão, é proposto um conjunto de equações que descreve a sua dinâmica qualitativa: essas equações têm a mesma forma daquelas do sistema padrão mais conhecido, sendo o ajuste dos parâmetros feito de acordo com valores obtidos em experiências.

Uma alça de elementos que gera algum tipo de comportamento oscilatório, por exemplo, pode ser visto como análogo a um circuito elétrico. A analogia

entre batimentos cardíacos e oscilações eletroquímicas já era sugerida por Van der Pol no começo do século (Van der Pol 1928). Seu clássico trabalho de modelamento do bombeamento do coração ilustra com clareza e simplicidade os principais passos da construção do modelo:

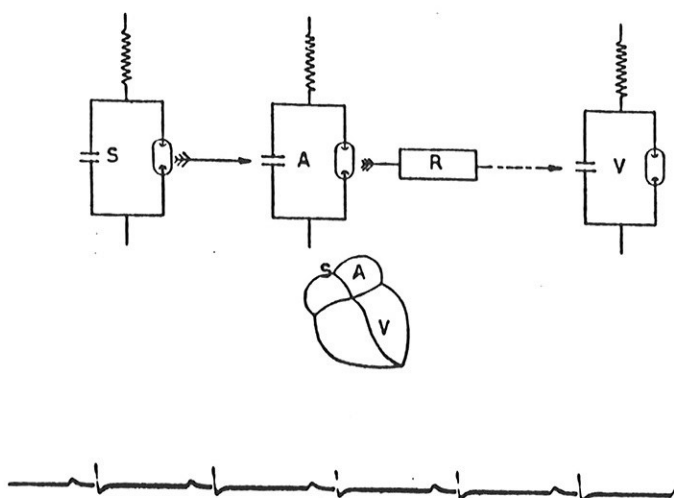


Figura 1.1: Analogia entre o coração e circuitos elétricos; abaixo, um eletrocardiograma típico, figura extraída de (Van der Pol 1928)

O coração é constituído, basicamente, por seus três componentes (o sinus, o átrio e o ventrículo), pelos quais os impulsos são enviados sucessivamente. Eletrocardiogramas fornecem sinais que constituem, basicamente, **osciladores de relaxação**: a variável que oscila sofre sempre uma abrupta mudança no seu valor em uma determinada fase do ciclo. Este tipo de oscilação pode ser produzido por diversos sistemas padrões, dos quais é escolhido, para efeito de analogia, um circuito com um tubo de neon que produz descargas intermitentes: a voltagem no capacitor aumenta até um certo limite, alcançando um determinado patamar, provocando o processo de descarga do tubo, e o ciclo recomeça. Este circuito é constituído apenas por resistências e capacitores, sendo a forma de suas equações bastante conhecida.

Cada um dos componentes do coração é modelado por um circuito elétrico como descrito anteriormente, tendo cada circuito o seu período natural e, desta forma, o sistema “de três tubos de neon” produz flashes que correspondem às atividades ocorrendo em cada parte do coração. Os tipos de interações e

do fator de retardamento na transmissão do sinal entre cada parte do coração estão esquematizados na fig.1.1.

A identificação dos componentes de um sistema, das suas interações e dos fatores de retardamento, permite a construção de um esquema conceitual em que variáveis, parâmetros e acoplamentos são sugeridos. A partir desse gráfico conceitual, constroem-se as equações diferenciais que descrevem o sistema, e parte-se para o ajuste dos parâmetros: a passagem do modelo qualitativo para o modelo quantitativo se efetua nesta etapa. De posse dessas equações, é possível simular em computador possíveis respostas do sistema às novas condições impostas pelos parâmetros e posterior verificação experimental das previsões. Com a manipulação dos parâmetros do modelo do coração, Van der Pol demonstrou possíveis causas de arritmias e paradas cardíacas.

Modelos mais realistas, cada vez mais complexos e refinados do funcionamento do coração têm sido propostos (Glass 1991). Os princípios do modelamento, no entanto, são, basicamente, os mesmos: o refinamento consiste na inclusão de novas variáveis, parâmetros e acoplamentos no modelo, os quais refletem um conhecimento cada vez mais minucioso da estrutura do coração.

Um outro exemplo ilustrativo de aplicação desta abordagem de modelamento é o estudo das dinâmicas populacionais, do qual o clássico modelo de Volterra representa a base dos modelos de presas e predadores (Volterra 1926). A dinâmica populacional de espécies predadas e de seus predadores mostra variação periódica, que reflete a influência da disponibilidade alimentar, doenças, competição e cooperação de grupo. O modelo ficou conhecido como Lotka-Volterra, por ter Lotka utilizado as mesmas equações, anteriormente, para modelar reações químicas que, de forma isomorfa, apresentavam variações periódicas nas concentrações dos componentes, tendo cada um, em relação ao outro, uma dependência análoga àquela proposta, mais tarde, entre presas e predadores (Lotka 1920). O sistema de Lotka-Volterra tem a seguinte forma, sendo X a população da presa, Y a população do predador, a,b,c,d parâmetros:

$$\frac{dX}{dt} = X(a - bY)$$

$$\frac{dY}{dt} = Y(cX - d)$$

Para se obter essa equação, supõe-se que: i) a população das presas aumente, indefinidamente, na ausência de predador; ii) a taxa de redução de presas seja proporcional à população do predador e dela própria; iii) na ausência da presa, a população do predador se reduza exponencialmente; iv) a população do predador aumente a si mesma proporcionalmente à população de presas.

Apesar da simplicidade deste quadro qualitativo, estas equações fornecem elementos suficientes para produzir como resultado variações periódicas das duas populações e têm servido de base para modelos mais realísticos. Modelos de dinâmica populacional têm tratado problemas ecológicos tão diversos como a dinâmica de sociedades com multi-espécies, evolução de espécies resistentes a pesticidas, controle ecológico de pestes, administração de recursos renováveis e disseminação de doenças (Murray 1989)(Constantino et al 1996).

Um dos modelos matemáticos de sistemas biológicos mais bem sucedidos foi proposto por Hodgkin e Huxley, para descrever a propagação de potenciais de ação nos axônios gigantes da lula (Hodgkin, Huxley 1952). Com um sistema de quatro equações diferenciais, o modelo descreve a variação temporal e a dependência na voltagem devida às correntes iônicas de membranas, que percorrem os axônios, descrevendo a geração dos potenciais de ação. Esse modelo envolve variáveis ativadoras do sódio e do potássio, uma variável inibidora do sódio, todas dependentes da voltagem, e uma quarta variável, envolvendo o potencial da membrana.

Segundo esse modelo, o axônio possui, quando isolado, uma frequência natural na geração dos potenciais de ação e quando estimulado por sinais elétricos periódicos externos, uma série de comportamentos diferentes podem surgir. Esses comportamentos dependem dos parâmetros dos sinais elétricos e consistem em oscilações periódicas, quasi-periódicas ou caos. Todos esses comportamentos, observados experimentalmente, são previstos pelo modelo matemático, bem como é possível identificar as mesmas rotas para o caos (passagem do estado regular para o caótico, através de mudança de parâmetros) no sistema real e no modelo, demonstrando a grande representatividade e abrangência deste (Elbert et al, 1994).

1.3 Abordagem sem equações explícitas

A segunda abordagem não lida com equações explícitas, mas com a caracterização global mais abstrata de séries temporais biológicas. Sistemas cujos comportamentos são mais complexos, dos quais não se pode identificar o mecanismo, têm sido analisados através de técnicas cada vez mais sofisticadas da teoria de sistemas dinâmicos não-lineares.

O estudo de processos fisiológicos implica, freqüentemente, a interpretação de sinais de séries temporais que, em sua maioria, são irregulares. O estudo de séries temporais, antes limitado aos clássicos métodos de análise de espectro de potências e função de auto-correlação, ampliou-se com métodos como a reconstrução de atratores de Takens, algoritmos de caracterização de atratores (Grassberger, Procaccia 1983) e identificação por redes neurais (Chen, Billings 1992), abrindo a possibilidade de se estudar um leque maior de comportamentos (Abardanel 1989)(Fiedler 1994).

O problema fundamental na abordagem de um sistema do qual se desconhecem as bases do seu mecanismo é o estabelecimento da relação entre a série temporal obtida experimentalmente e a dinâmica que governa o seu comportamento: uma série temporal representa a evolução no tempo de apenas uma variável do sistema e sistemas dinâmicos complexos, como o cérebro, devem possuir uma enorme quantidade de variáveis inter-relacionadas, que não podem ser medidas e nem identificadas diretamente.

Se a dinâmica do sistema, porém, for mesmo regida por um conjunto de leis determinísticas, sua trajetória irregular no espaço de fases constitui um atrator caótico, que não é observado diretamente (Ruelle, Takens 1971). Pode-se admitir, no entanto, que existe uma função suave que mapeia pontos do atrator com os valores experimentais da série temporal. Nesse caso, é possível reconstruir o atrator a partir dos dados da série temporal, apesar destes serem representativos de apenas uma das variáveis do sistema: os métodos de reconstrução de atratores baseiam-se nos teoremas que afirmam que, sendo possível medir uma variável do sistema com precisão e por longo tempo, é possível caracterizar a estrutura dinâmica de todo o sistema através das medidas correspondentes a essa única variável (Takens 1981). A reconstrução do atrator está esquematizada na Fig.1.2. Toda a análise do sistema é realizada sobre esse atrator reconstruído, o qual pode ser caracterizado através de medidas como a dimensão (Grassberger, Procaccia 1983) e a entropia (Shiriayev 1987), que permitem quantificar o grau de complexidade

do sistema. O novo atrator reconstruído apresenta características idênticas ao atrator original (Packard, Crutchfield 1980).

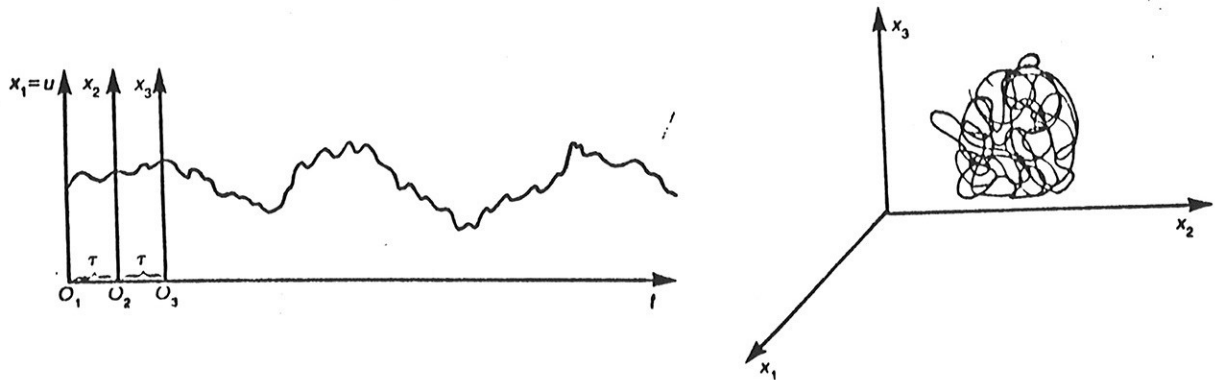


Figura 1.2: Esquema da reconstrução de um atrator, através de uma série temporal, extraído de Ruelle (1994)

Em ambas as abordagens de modelamento, o sistema real é descrito como um sistema determinístico acrescido de ruído. A presença do ruído constitui um sério desafio para uma boa modelagem, especialmente na segunda abordagem, em que não se trabalha com equações mas diretamente com séries temporais de dados experimentais com ruído. Neste caso, técnicas de filtração dos dados assumem um papel fundamental na modelagem (Kostelich, Yorke 1990).

Por outro lado, a adição de ruído a sinais periódicos fracos pode aumentar a transmissão de informações em certos sistemas físicos não-lineares, num processo conhecido como ressonância estocástica (Longtin 1991). A verificação deste processo tem aumentado o interesse no estudo do papel do ruído nos processos de transmissão de informações no cérebro (Chialvo e Apkarian, 1993) (Ditto 1993).

Todo esse complexo quadro de aplicações teve um grande impacto, especialmente na fisiologia, na maneira como os processos complexos começaram a ser encarados e descritos. Com o advento da teoria do caos, muitos sistemas, antes considerados aleatórios, passaram a ser vistos como tendo uma dinâmica determinística em potencial, com um processo simples governando a dinâmica complexa (May 1976).

A interpretação definitiva da presença de caos nos sistemas fisiológicos ainda continua em aberto: ora é associado às situações patológicas do organismo (Glass, Mackey 1988), ora aos ingredientes necessários para o seu bom funcionamento. Várias especulações têm sido levantadas quanto ao papel positivo do caos na biologia: caos tem sido cada vez mais relacionado como fonte de diversidade, o qual permite inovações e flexibilidade, além de aumentar as possibilidades de adaptação dos organismos, como por exemplo, reduzindo a previsibilidade do comportamento diante de predadores (Lloyd, Lloyd 1995).

Eletrocardiogramas e eletroencefalogramas são exemplos de séries temporais que têm sido intensamente pesquisadas e as interpretações do caos aplicadas. Estes fornecem séries temporais longas, requisitos para se poder reconstruir os atratores: o cuidado com o tamanho da série é essencial para se obter resultados confiáveis (Ruelle 1990).

Eletrocardiogramas mostram evidências de que a dinâmica do coração saudável é altamente irregular, enquanto uma menor complexidade está associada a cardiopatias (Goldberger e West 1987)(Skinner 1993) e ao envelhecimento (Kaplan 1991). Uma explicação proposta para essas evidências trata o coração como em constante ajustamento com toda a demanda de atividades do organismo, produzindo um comportamento altamente complexo. Em casos de doenças ou envelhecimento, o coração perderia essa habilidade de se ajustar às atividades do organismo, comportando-se de forma cada vez mais regular e menos flexível (Glass 1979). Registros encefalográficos apontam o mesmo sentido: eletroencefalogramas registrados em pacientes durante ataques epiléticos apresentam menor desorganização em relação aos registrados durante o funcionamento normal do cérebro (Babloyantz e Destexhe 1986).

Outros sistemas como a atividade respiratória, a produção de glóbulos brancos no sangue (Elbert et al, 1994) e até mesmo o choro de bebês (Mende et al 1990) têm sido estudados segundo técnicas de caracterização de atratores para o diagnóstico de doenças. Um dos grandes desafios em aberto consiste na possibilidade de se utilizar esses conhecimentos em terapias que possam ajustar organismos doentes à normalidade, seja pela manipulação de parâmetros do sistema, seja pela aplicação de métodos de controle de caos (Ott, Grebogi, York 1990), (Garfinkel et al, 1993).

O modelamento de um sistema real exige uma série de cuidados: no momento da delimitação das variáveis e parâmetros essenciais de um processo, existe, sempre, a preocupação de que o modelo matemático possa estar simplificando demais o sistema biológico; num sentido inverso, existe também a preocupação de que modelos possam se perder em sua própria complexidade matemática, sem produzirem nenhuma contribuição ao entendimento do sistema. O desafio no trabalho de modelamento matemático de um sistema biológico é alcançar uma boa representatividade do sistema e contribuir para o seu melhor entendimento, sistematizando os comportamentos observados. Para isso, é essencial que as análises desenvolvidas não se desvinculem das motivações biológicas do problema tratado.

Capítulo 2

Cronobiologia

Nosso trabalho consiste na realização e modelamento matemático de um experimento envolvendo ritmos biológicos, os quais são estudados pela cronobiologia, através de um amplo enfoque de suas implicações na organização biológica. Vamos apresentar, neste capítulo, os principais aspectos biológicos de ritmos que apresentam periodicidades iguais a ciclos ambientais e ritmos que não apresentam essa propriedade, inserindo o nosso problema, que consiste no estudo desses últimos, dentro de uma perspectiva cronobiológica.

2.1 Organização Temporal dos Seres Vivos

A cronobiologia é o estudo da organização temporal dos seres vivos. Essa organização manifesta-se na ocorrência de ritmos biológicos em processos fisiológicos e comportamentais, desde seres unicelulares a pluricelulares, apresentando periodicidades que vão de milissegundos a anos.

Ritmos biológicos com periodicidades iguais aos de ciclos ambientais são bastante evidentes: ciclos de vigília-sono e de temperatura corporal, em humanos, têm periodicidades de 24 horas; o florescimento, o amadurecimento dos frutos, o cair das folhas e seu renascimento constituem o próprio retrato das estações do ano; a reprodução, o desenvolvimento e as atividades de animais marinhos estão diretamente relacionados com os ciclos de marés. A correlação dessas periodicidades levou à crença, por muito tempo, de que os ritmos biológicos decorriam apenas de uma resposta direta do organismo aos fatores ambientais cíclicos, como a temperatura e as alternâncias de claro

para escuro. Em 1729, no entanto, J.J. de Mairan verificou formalmente a persistência do ritmo de movimento foliar de plantas, em escuro constante (Bünning 1957). A persistência dos ritmos, sob condições ambientais constantes de laboratório, tem explicitado o caráter endógeno dos mesmos, em diferentes espécies. Nessas condições, as oscilações biológicas entram em **livre curso**, apresentando periodicidades ligeiramente diferentes daquelas apresentadas sob a influência dos ciclos externos. Fatores ambientais cíclicos podem sincronizar os ritmos biológicos e são chamados "zeitgebers", sendo a natureza destes bastante variada: luz, temperatura, som, disponibilidade alimentar, estímulos sociais (Moore Ede 1982).

A propriedade dos ritmos de se sincronizarem pelos estímulos ambientais deve ter evoluído através de forte pressão seletiva (Enright 1970). A adaptação de um organismo a um determinado ambiente envolve uma série de aspectos, estando o aspecto temporal relacionado com a programação da melhor hora do dia, melhor estação do ano, melhor fase de maré, para realizar determinada atividade. Essa adaptação implica um encadeamento de processos fisiológicos, os quais se organizam internamente, resultando em um organismo que expressa comportamentos e funções nos intervalos de tempo mais convenientes. A importância e a eficiência desse ajuste verifica-se numa ampla diversidade de processos como a busca de alimento, interação predador-presa, sobrevivência a estações adversas, migração, crescimento, reprodução, etc.. Da interação entre o relógio interno e os ciclos externos resulta a sincronização dos ritmos biológicos: o ciclo externo não somente acerta o período como a fase do relógio, de forma que cada evento fisiológico ocorra na hora certa (Enright 1970) (Pittendrigh, Daan 1976).

O sentido de se ter um relógio endógeno auto-sustentado, ao invés de apenas um simples mecanismo de resposta direta ao ciclo ambiental, está na necessidade do organismo se preparar, antecipadamente, para uma determinada atividade. Em alguns casos, essa necessidade torna-se bastante evidente: animais que vivem em cavernas ou buracos, mas que precisam sair diariamente para se alimentar, precisam ter um relógio interno que os faça sair na hora mais apropriada; a orientação solar com compensação de tempo, nas formigas, é um processo através do qual as formigas são guiadas pela posição relativa do sol, descontando sempre a variação da posição deste no decorrer das horas do dia; animais hibernantes e migradores precisam ir acumulando peso para estarem com reservas suficientes no momento ideal de se recolher, ou começar uma longa viagem, respectivamente; animais que vivem

sob a areia e que precisam migrar continuamente de acordo com as marés não podem se confundir com as flutuações típicas do mar: relógios internos também protegem o organismo de distúrbios ambientais menores (Enright 1970).

A importância do relógio endógeno verifica-se na sua própria transmissão genética, de uma geração a outra: se, mesmo em condições constantes de laboratório, por exemplo, animais hibernadores ou migratórios começam a ganhar peso no momento exato em que isso deveria ocorrer em seus ciclos na natureza, mais surpreendente é verificar esse mesmo comportamento nos filhotes que nascem em laboratório. A persistência dos ritmos de 24 horas, em sucessivas gerações de macacos que nasciam em laboratório, sem nenhum contato com ciclos ambientais, foi verificado por Aschoff (Aschoff 1960).

Dessa forma, o **princípio cronobiológico** contrapõe-se ao **princípio homeostático** que constituiu, durante muito tempo, a lei básica da organização biológica: segundo esse princípio, mecanismos regulatórios procuram defender o equilíbrio interno do organismo, através da manutenção de valores médios dos valores fisiológicos, como a temperatura, a pressão e as concentrações das diversas substâncias no plasma sanguíneo (Bernard 1926)(Cannon 1929). A manutenção de uma temperatura média corporal, por exemplo, permite que um organismo possa viver no deserto ou nos pólos, sendo essa independência em relação ao meio externo a idéia central da homeostase. O princípio homeostático considera as variações rítmicas desses valores, ao longo do dia, como apenas flutuações em torno da média que é preservada, sem levar em conta a extrema regularidade e o minucioso ordenamento dos diversos ritmos, que mantêm relações de fases constantes entre si e entre o meio externo (Mrosovsky 1990) (Reinberg, Smolensky 1983). Nas palavras de Jurgen Aschoff:

“Homeostasis is a shielding against the environment, one might say, a turning away from it. For a long time, this phenomenon has been taken as the prime objective for an overall organization in physiology: and it evidently has great survival value. But there is another general possibility in coping with the varying situations in the environment: it is, instead of shielding, “to turn toward it”; instead of keeping the “milieu interne” stable, to establish a mirror of the changing outside world in the internal organization. This has one clear prerequisite: the events in the environment must be predictable, which, of course, is the case when they change periodically. ” (Aschoff 1964)

Hoje em dia, considera-se que a ritmicidade e a homeostase, dois princípios aparentemente contraditórios dos sistemas biológicos, constituem dois aspectos complementares de um único princípio geral: valores médios são preservados pelo organismo - mas esses valores preservados variam ao longo do dia, mês, ano, ou de acordo com a fase de desenvolvimento, constituindo um ritmo biológico (Mrosovsky 1990).

2.2 Os Ritmos Circadianos

Os ritmos biológicos mais estudados, com periodicidades equivalentes aos dos ciclos de rotação da Terra, são chamados **circadianos**. Esses ritmos constituem a referência básica na classificação dos demais, sendo chamados **infradianos** os ciclos com períodos maiores e **ultradianos** os ritmos de períodos menores do que 24 horas.

A ritmicidade circadiana é observada numa variedade muito grande de organismos, desde unicelulares a pluricelulares. Dada a diversidade de formas e funções, é provável que cada espécie tenha desenvolvido mecanismos diferentes de mediação dos processos internos que originam esses ritmos. A estrutura básica do sistema circadiano, porém, comum a todos os organismos, é constituída por um **fotorreceptor**, um **oscilador circadiano** e o **ritmo** que observamos em alguma variável fisiológica (Pittendrigh, Bruce 1957). O oscilador constitui as “engrenagens” e o ritmo os “ponteiros” do relógio biológico, que é sincronizado pelo ciclo de claro-escuro, através do fotorreceptor. Os ponteiros são apenas a parte visível do relógio, estando controlados pela engrenagem interna que não observamos, como mostrado na fig.2.1.

Sob condições constantes, os ritmos circadianos entram em **livre curso**, constituindo a **expressão direta do oscilador circadiano**, livre dos fatores ambientais. O livre curso não é alcançado imediatamente, observando-se **pós-efeitos** que constituem os reflexos da condição anterior de arrastamento: o período de livre-curso demora muitos ciclos até se estabilizar. Esse período, chamado τ , é sempre diferente de 24h, variando entre 20 e 28 horas, sendo as implicações dessa diferença minuciosamente analisados em Pittendrigh, Daan, 1976.

Uma vez em contato com um ciclo de claro-escuro, a duração de τ torna-se igual ao do ciclo ambiental e as fases são ajustadas às fases do “zeitgeber”, mantendo entre si uma relação estável. A esse processo chama-se **sincro-**

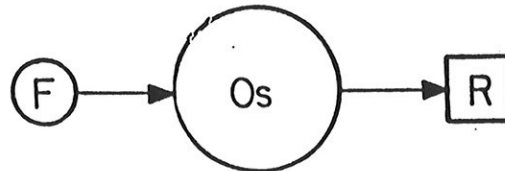


Figura 2.1: Estrutura geral do sistema circadiano, onde F=fotorreceptor, O=oscilador interno e R=ritmo biológico

nização ou **arrastamento** (Pittendrigh 1960). A passagem de um ritmo em livre curso para o estado sincronizado, na maior parte das vezes, não é imediata, acontecendo após um certo número de ciclos **transientes**, em que a fase do ritmo vai mudando gradualmente até atingir a posição final. O número de transientes varia de acordo com a espécie biológica e com as condições de sincronização (Pittendrigh, Minis 1964). Transientes também são observados quando se muda experimentalmente o “zeitgeber”, ou como no caso de humanos, após vôos trans-meridianos, constituindo-se no efeito “jet-lag”.

A sincronização do relógio biológico circadiano é realizada pela ação conjunta de diversos ciclos ambientais, os “zeitgebers”. Para separar esses possíveis agentes de sincronização e poder testar sua ação, é preciso analisar os ritmos em ambientes controlados. Nessas condições, “zeitgebers” em potencial podem ser introduzidos e removidos, de forma controlada, em condições de laboratório.

Para se interpretar corretamente as observações dos ritmos sujeitos a fatores ambientais, é preciso distinguir claramente o oscilador (engrenagem) e o ritmo (ponteiro), como mostrado na fig.2.2. A expressão de um ritmo sujeito a fatores ambientais é resultado de componentes endógenos (devidos à expressão direta do oscilador interno) e exógenos (devido à resposta direta do ritmo a fatores ambientais ou comportamentais). Por exemplo, os ritmos de variação da pressão arterial, batimentos cardíacos e produção de urina são controlados pelo oscilador circadiano, que está sendo diretamente arrastado

pelo “zeitgeber” de claro-escuro, mas exercícios físicos podem modificar a expressão desses ritmos, sem alterar o oscilador. Nesse caso, dizemos que houve **maskamento** dos ritmos pelo fator externo. A temperatura retal é considerada um dos ritmos menos suscetíveis ao maskamento pelos fatores ambientais, fornecendo uma das variáveis mais confiáveis da expressão direta do oscilador circadiano. Como outros exemplos de maskamento, citamos o efeito do sono sobre a temperatura corporal, o efeito de refeições sobre o teor de insulina no sangue, o efeito da postura sobre a vasopressina (Waterhouse, Minors 1994).

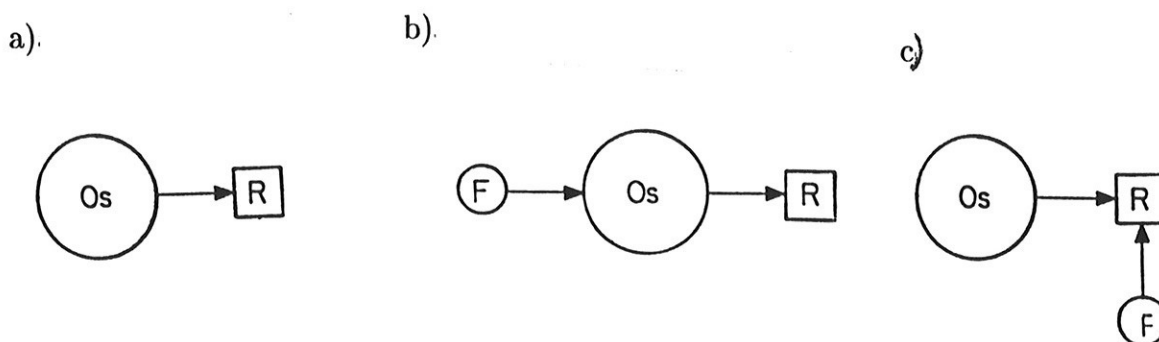


Figura 2.2: a)ritmo em livre-curso. b)ritmo arrastado. c)ritmo mascarado

Além da persistência sob condições constantes e a capacidade de se sincronizar por estímulos de luz, o sistema circadiano apresenta **compensação de temperatura**, ou seja, a independência do período com a temperatura (Pittendrigh 1954) (Sweeney, Hastings 1960). Essa propriedade diferencia a ritmicidade circadiana dos demais fenômenos fisiológicos, que geralmente mostram variações acentuadas com aumento ou diminuição da temperatura. Processos biológicos são, em geral, acelerados por um fator 2 ou 3 com um aumento de 10°C da temperatura ambiente.

2.3 Ritmos sem Correlatos Geofísicos

Verificamos, nas seções anteriores, o valor adaptativo de alguns ritmos biológicos terem desenvolvido períodos iguais aos de ciclos ambientais. Ritmos do tipo “relógio biológico” são tão importantes que, na maioria dos seres

vivos, o espectro de frequências dos diversos ritmos é centrado na frequência circadiana, constituindo o componente central da organização temporal. Esses ritmos constituem, no entanto, apenas um subgrupo do amplo conjunto de todos os processos que apresentam oscilações rítmicas. A propriedade oscilatória envolve a totalidade das funções fisiológicas do organismo, revelando uma ampla rede de intermodulação entre ritmos circadianos, ultradianos e infradianos, nos diferentes níveis de organização biológica (Marques 1997).

Em um estado estacionário, os sistemas ignoram o tempo. Uma vez num regime periódico, no entanto, os sistemas “descobrem” o tempo, na sucessão das fases do movimento periódico, e na ordem prescrita da sucessão dos máximos picos de cada ritmo. No estudo dos sistemas complexos, esse fato é conhecido como “quebra de simetria temporal” (Nicolis, Prigogine 1989). Oscilações, ou processos periódicos constituem, inclusive, a própria base da percepção temporal do homem: experimentos da psicologia verificaram que, ao menos na percepção de pequenos intervalos de tempo, são utilizados processos periódicos internos como sistema de referência (Pöppel 1972).

As periodicidades dos ritmos sem correlatos geofísicos devem estar relacionadas, provavelmente, com a otimização dos processos em que estão envolvidos. Modelos de comunicação intercelular mediados pela produção ultradiana de hormônios têm demonstrado a existência de periodicidades que otimizam estas atividades. Além disso, o estudo da ontogênese dos ritmos procura responder como se origina a sensibilidade do organismo a sinais pulsáteis e as mutações que têm permitido a seleção de frequências ótimas para cada processo (Goldbeter, 1996).

Neste contexto, é interessante verificar características oscilatórias em seres que vivem em habitats cujos ciclos ambientais mostram características peculiares, como o interior das cavernas. Apesar do ambiente cavernícola ser pouco estudado quanto às suas características rítmicas, sabe-se que os eventuais ciclos ambientais das cavernas possuem pequena amplitude. Existem organismos que vivem exclusivamente dentro das cavernas e outros, como os morcegos, que ainda mantêm contato com o exterior. Para os primeiros, não existe um valor adaptativo em se desenvolver ritmos circadianos, devido à inexistência do ciclo de claro-escuro, que constitui o principal estímulo circadiano externo, para a maioria das espécies: seres cavernícolas são, geralmente, cegos, tendo perdido a visão no longo processo de adaptação ao ambiente escuro das cavernas. Apesar disso, a existência de ritmos regulares nesses seres aponta mais uma vez para a importância de fenômenos rítmicos

puros, mesmo desvinculados de um sistema de sincronização com o meio externo. Nesse sentido, cavernícolas apresentam ritmos que, talvez, cubram um espectro de frequências mais amplo do que aquele das espécies de superfície, os quais têm seu espectro centrado na frequência circadiana.

Claros ritmos de muda cuticular e de oviposição foram verificados em colêmbolos, insetos cavernícolas da espécie *Folsomia candida*, insetos cegos e despigmentados que vivem sobre o guano de morcegos (Chiba 1973)(Marques et al,1987)(Cutkomp et al,1987). É interessante notar que, nesses poucos exemplos observados, são evidentes as frequências infradianas. Vamos estudar os ritmos desses insetos, por serem bastante convenientes do ponto de vista prático: podem ser facilmente criados em laboratório, onde o ambiente constante de cavernas é recriado; reproduzem-se com facilidade e por partenogênese, garantindo um grande número de indivíduos idênticos, do ponto de vista genético; além disso, têm uma vida relativamente longa, de aproximadamente 4 meses.

Vamos investigar a natureza dos ritmos infradianos observados nessa espécie. Ritmos infradianos são pouco estudados mesmo em seres sujeitos a um ambiente cíclico, em que existe sempre a possibilidade de um sistema de sincronização externa estar atuando. Dado esse desconhecimento, a verificação da natureza de um ritmo infradiano em seres que vivem em ambientes desprovidos de ciclos ambientais evidentes pode servir de indicativo para o que acontece nos demais seres. Existe uma série de procedimentos experimentais que permitem conhecer a natureza do oscilador subjacente a um ritmo, sendo esses procedimentos baseados na teoria dos osciladores. No próximo capítulo, vamos apresentar as bases teóricas desses procedimentos.

Capítulo 3

Modelos de Osciladores Biológicos

Experiências em cronobiologia são realizadas enfocando apenas a expressão dos ritmos, considerando o mecanismo subjacente como “caixa preta”, ou buscando as bases fisiológicas explícitas, no nível celular ou bioquímico, do mecanismo gerador dos ritmos. Paralelamente, modelos matemáticos descrevem comportamentos gerais de uma classe de osciladores, sem levar em conta especificidades de cada sistema, ou descrevem equações explícitas identificadas com etapas dos processos biológicos que geram as oscilações.

Os aspectos da cronobiologia estudados através de modelos matemáticos são muito abrangentes. Neste capítulo, fazemos uma exposição de alguns desses aspectos, restringindo-nos aos relacionados com o nosso trabalho.

Comportamentos dos ritmos relacionados com a sincronização são explicados através de modelos generalizados de osciladores do tipo ciclo-limite: a construção das Curvas de Respostas Dependentes de Fase (abreviadamente “PRC”, do inglês “Phase Response Curve”) constitui o procedimento mais comumente seguido na verificação da natureza do oscilador subjacente a um ritmo biológico.

Evidências estruturais de um sistema de multiosciladores, em insetos, motivam uma breve apresentação dos aspectos relacionados com o acoplamento de osciladores do tipo ciclo-limite generalizados.

Para ilustrar uma abordagem com equações explícitas na cronobiologia, apresentamos, brevemente, como as bases fisiológicas da ritmicidade são modeladas por equações explícitas de realimentação de estados (Ogata 1982).

3.1 Representação dos Sistemas Dinâmicos

Modelos matemáticos de sistemas biológicos procuram expressar a evolução temporal determinística de variáveis biológicas através de N equações diferenciais da forma:

$$\dot{x} = F(x, \mu) \quad x = (x_1, x_2, \dots, x_N) \quad F = (F_1, F_2, \dots, F_N) \quad (3.1)$$

sendo x a **variável** dependente uma função do tempo e \dot{x} representa a taxa de variação temporal da variável x , expressa pela função F . μ constitui um **parâmetro**, uma constante do sistema. A solução dessa equação fornece x como função do tempo $x(t)$, com a condição inicial $x(t=0) = x_0$.

A solução da equação pode ser expressa no **espaço de fases**, em que as coordenadas representam pares de variáveis (x_i, x_j) : No espaço de fases, um estado de um sistema com $N = 2$ no instante t^* é representado por um ponto de coordenadas $(x_1(t^*), x_2(t^*))$ e uma **trajetória** é definida como uma sucessão de estados $(x_1(t), x_2(t))$ que o sistema vai assumindo no tempo, segundo as soluções $x(t)$ das equações, como mostrado na fig.3.1. O conjunto de trajetórias possíveis do sistema, no espaço de fases, constitui um **retrato de fase** do sistema.

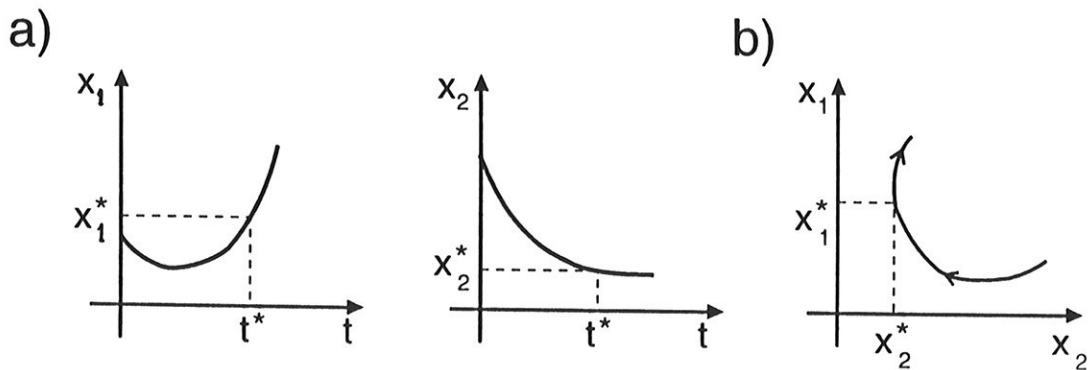


Figura 3.1: a) Soluções de $x_1(t)$ e $x_2(t)$ b) representação da trajetória no espaço de fases.

Uma propriedade muito importante da estrutura do retrato de fase de um sistema dinâmico é devido ao **Teorema de Unicidade** de Cauchy (Andronov 1949), segundo o qual, uma equação diferencial contínua e diferenciável

em todos os pontos admite uma solução única: a partir de um ponto no espaço de fases passa somente uma única trajetória, não sendo permitidas intersecções de curvas.

Uma segunda propriedade é a existência de séries invariantes no espaço de fases, que consistem trajetórias invariantes no tempo, sendo exemplos o **ponto fixo** e a **curva periódica**.

Soluções estacionárias são representadas por um ponto fixo no espaço de fases: são as soluções de $x(t)$ para o qual o sistema permanece constante no tempo, ou seja $\dot{x} = 0$. O ponto fixo é instável ou estável, respectivamente, se as trajetórias se afastam ou se aproximam, assintoticamente, do ponto. O princípio da Homeostase pode ser associado a um estado de equilíbrio assintoticamente estável (Glass, Mackey 1988): existe um valor da variável fisiológica que é mantida no tempo, e qualquer perturbação desse ponto de equilíbrio leva o sistema de volta, assintoticamente, a esse ponto, como mostrado na fig.3.2a.

Soluções oscilatórias, por outro lado, são representadas, no espaço de fases, através de curvas fechadas, correspondendo a trajetórias em que os sistemas repetem, ciclicamente, os mesmos conjuntos de estados. O tempo necessário para o sistema retornar ao estado inicial, nessa curva, corresponde ao período da oscilação.

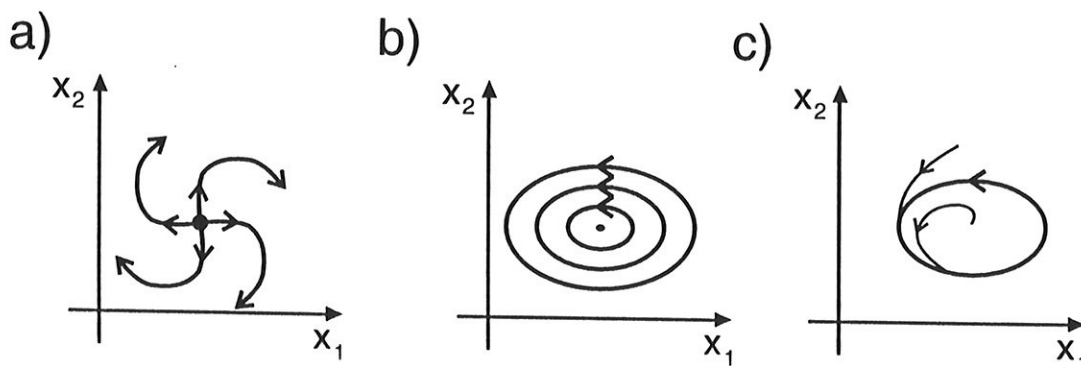


Figura 3.2: Representação de séries invariantes no espaço de fases:a) foco estável b) pêndulo c) ciclo-limite

3.2 Osciladores Conservativos e Dissipativos

Osciladores são classificados como **conservativos** ou **dissipativos**, quanto à conservação ou não da energia e os principais exemplos são, respectivamente, o **pêndulo ideal** e o **ciclo-limite**.

Um pêndulo ideal (sem amortecimento), na ausência de perturbações, oscila indefinidamente com a amplitude determinada pelas condições iniciais, fig.3.2b. Um pêndulo amortecido não conserva a energia, perdendo-a por atrito e tem sua amplitude diminuída a cada ciclo, até parar completamente. O ciclo-limite, por sua vez, corresponde a uma oscilação em sistemas que possuem coeficiente de atrito variáveis com o estado, em virtude de não-linearidades: é uma solução periódica correspondente a uma trajetória fechada isolada, no espaço de estados.

Esses sistemas podem ser descritos, genericamente, pela equação:

$$\ddot{x} + h(x)\dot{x} + f(x)x = g(x) \quad (3.2)$$

sendo x a variável que oscila no tempo, $h(x)$ o termo de amortecimento, ou coeficiente de atrito, $f(x)$ a força de restauração e $g(x)$ a força externa. Considerando $g(x) = 0$ e $T = \dot{x}^2/2$, $U = \int f(x)dx$, respectivamente, a energia cinética e potencial do sistema, temos:

$$\frac{d(T + U)}{dt} = -h(x)\dot{x}^2 \quad (3.3)$$

Dessa forma, a variação da energia total do sistema depende do termo de amortecimento $h(x)$ e quando $h(x) = 0$, a equação se reduz a do pêndulo ideal e o sistema tem sua energia conservada; $h(x) = \gamma$, com γ real positivo e constante, corresponde ao pêndulo amortecido linearmente, quando o sistema perde energia monotonamente; quando $h(x)$ assume valores negativos e positivos ao longo de um ciclo, a energia é perdida e recebida, sendo um exemplo $h(x) = (1 - x^2)$, o termo de amortecimento do oscilador de van der Pol, que depende da amplitude (Hagedorn 1984): para valores pequenos ($x < 1$), e valores maiores ($x > 1$), o oscilador ganha e perde, respectivamente, a energia: no ciclo-limite de amplitude $x = 1$, a energia perdida é igual à recebida durante um ciclo.

Sistemas conservativos são representados por equações invariantes quanto à reversão temporal. Sistemas dissipativos, no entanto, apresentam irreversi-

bilidade no tempo, propriedade comum na maioria dos sistemas encontrados na natureza (Nicolis, Prigogine 1989).

Quando um oscilador do tipo pêndulo ideal sofre uma pequena perturbação, as oscilações seguintes adotam uma nova amplitude, até que nova perturbação determine mais uma nova amplitude.

A principal propriedade do ritmo biológico, por outro lado, do ponto de vista da sua classificação como oscilador, é a estabilidade de sua amplitude, quando sujeito a perturbações: após transientes, a oscilação volta a apresentar a amplitude inicial. Se ritmos como os de batimento cardíaco fossem suscetíveis a qualquer uma das inúmeras perturbações a que está exposto, ao longo do dia, fibrilações ocorreriam com facilidade, causando a morte do indivíduo. Essa estabilidade da amplitude caracteriza osciladores do tipo **ciclo-limite**.

As curvas que representam oscilações do tipo pêndulo e do tipo ciclo-limite são apresentados na fig.3.2.b,c. O pêndulo é representado por uma série de curvas concêntricas, sendo todas essas curvas igualmente soluções da equação do pêndulo, determinadas cada uma por uma condição inicial e energia diferente: como o sistema é linear, se $x(t)$ for uma solução da equação do pêndulo, qualquer $ax(t)$, a real, é igualmente solução. Através de cada condição inicial, no espaço de fases, passa uma única curva, sobre a qual segue a trajetória do sistema: uma perturbação transporta o sistema para uma nova condição inicial, passando a seguir a nova trajetória determinada por esta nova condição. A equação do ciclo-limite, por outro lado, tem como solução apenas uma única curva fechada, para onde todas as trajetórias se dirigem, assintoticamente. Uma vez sobre a curva, uma pequena perturbação que retire o sistema dela resultará no seu retorno, garantindo, dessa forma, a estabilidade da amplitude da oscilação.

3.3 Osciladores do Tipo Ciclo-Limite

Um **ciclo-limite estável** caracteriza um estado oscilatório com as propriedades de auto-sustentação e auto-excitação (Minorsky 1962):

Oscilação auto-sustentada - representa uma oscilação que se repete espontaneamente, sem a necessidade de impulsos que iniciem cada novo ciclo. Essa propriedade caracteriza, claramente, as oscilações biológicas, sendo a vantagem em relação a um mecanismo oscilante de resposta direta ao am-

biente cíclico, tratada no cap.2.

Oscilação auto-excitada - o sistema evolui espontaneamente do estado de repouso para o estado oscilatório, logo que as condições necessárias para a oscilação são completadas. Essa propriedade foi, inicialmente, demonstrada num experimento em que ritmos circadianos de aves (*Chloris chloris*) eram observados sob condições controladas de variação da luz: sabe-se que a luz forte ("Bright Light") inibe a oscilação circadiana. À medida em que a intensidade luminosa era aumentada, verificava-se o cessar do ritmo no momento em que ela ultrapassava um certo limiar e à medida em que a intensidade era gradualmente diminuída, verificava-se o reinício espontâneo do ritmo circadiano: foi tomado cuidado para a variação ocorrer de forma gradual o suficiente para não haver efeito impulsivo (Wever 1982). A oscilação auto-excitada caracteriza o **oscilador suave** (Glass, Mackey 1988).

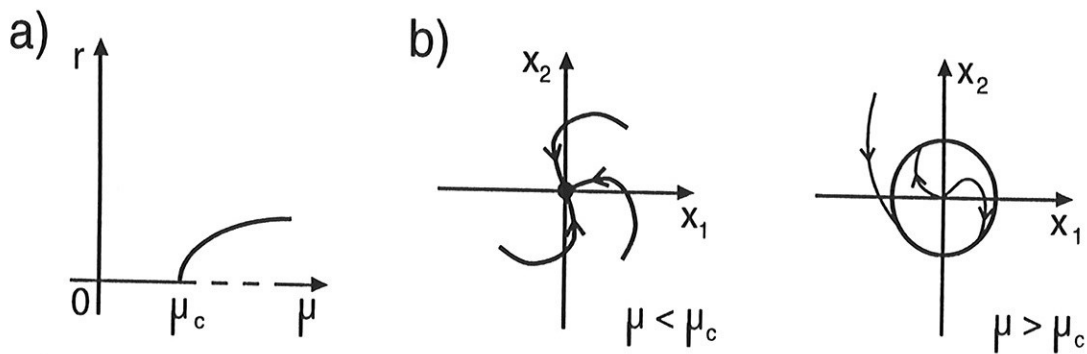


Figura 3.3: a) Diagrama de Bifurcação, em que a abscissa corresponde ao parâmetro μ e a ordenada à posição radial do ponto de equilíbrio r . Mostrada a Bifurcação Supercrítica de Hopf.

Essa mudança de um estado de equilíbrio estacionário para um estado oscilante, com variação gradual de um parâmetro (no caso, a intensidade da luz) é conhecida como Bifurcação Supercrítica de Hopf (Guckenheimer, Holmes 1983), e representada no diagrama de bifurcação da fig.3.3, sendo que, na abscissa está representado o parâmetro μ e na ordenada a posição radial r de equilíbrio estável do sistema, no espaço de fases. Uma linha sólida representa uma solução estável do sistema e uma linha tracejada uma solução

instável. Dessa forma, verificamos que até um certo limiar μ_c , o ponto $r = 0$ constitui um foco estável do sistema. Além desse valor, ele se transforma num foco instável, a partir do qual as trajetórias vão tender à posição radial correspondente à localização do ciclo-limite estável centrado na origem.

3.4 Sincronização dos Ritmos

Note-se que, nas considerações anteriores, caracterizou-se as oscilações biológicas sob o ponto de vista da teoria dos osciladores baseados apenas em propriedades qualitativas dos ritmos, como a estabilidade da amplitude e período, a propriedade de ser auto-sustentado e auto-excitado. Em trabalhos de modelamento de oscilações, a impossibilidade de se identificar as equações explícitas de um sistema não impede que muitos de seus comportamentos resultantes sejam entendidos através de propriedades comuns à classe de oscilador ao qual ele pertence: apesar de diferentes sistemas físicos serem modelados por diferentes séries de equações, a dinâmica resultante, para uma grande **classe** de sistemas, apresenta comportamentos muito semelhantes. Em particular, se o oscilador é representado por um ciclo-limite centrado num foco instável, vários de seus comportamentos, quando forçado periodicamente, são comuns a toda a classe de osciladores desse mesmo tipo. Essa generalidade permite, muitas vezes, analisar o sistema através de uma abordagem geométrica, tendo sido proposta, inicialmente, por Pavlidis (Pavlidis 1967a,b) e desenvolvida por Winfree (Winfree 1988).

Vamos apresentar os principais aspectos observados na sincronização dos ritmos biológicos, onde essa abordagem mostrou-se bastante eficiente na compreensão do funcionamento e papel do relógio biológico. Vamos tratar de dois tipos de sincronização: a resultante de **forças externas impulsivas** sobre o oscilador, modelo esse utilizado para descrever a sincronização dos ritmos biológicos pelo "zeitgeber" de claro-escuro; a resultante do **acoplamento** com outros osciladores, modelo este utilizado para descrever populações de osciladores que podem constituir a base do oscilador circadiano.

3.4.1 Sincronização por Forças Externas Impulsivas

A oscilação biológica é associada a um oscilador do tipo ciclo-limite por suas propriedades de oscilação auto-sustentada, auto-excitada e à capacidade

de se sincronizar de forma estável.

São considerados critérios de uma sincronização estável (Moore-Ede 1980):

- 1- O sistema precisa oscilar com período τ de livre-curso, antes e depois de ser submetido ao "zeitgeber";
- 2- Ao ser arrastado, o ritmo deve apresentar período igual ao do "zeitgeber";
- 3- Ao ser arrastado, o ritmo deve apresentar uma relação de fases constante em relação ao "zeitgeber", a qual pode ser determinada pela diferença em horas entre picos característicos de ambos os ciclos;
- 4- Ao retornar ao livre-curso, o ritmo deve, ainda que passageiramente, continuar com a fase determinada pelo zeitgeber (caso contrário, tratou-se apenas de um mascaramento).

Diversos experimentos de arrastamento foram realizados com a manipulação dos "zeitgebers", considerando o mecanismo de sincronização como "caixa-preta", fornecendo valiosas propriedades gerais do arrastamento (Aschoff, Pöppel, Wever 1969). Além disso, diversas propriedades qualitativas da sincronização, obtidas experimentalmente, foram demonstradas pela simulação da equação estendida de van der Pol sujeita a forças externas (Wever 1979).

Um fotoperíodo consiste num ciclo constituído por intervalos de claro escuro, com duração bem definida desses intervalos. A submissão controlada de organismos a fotoperíodos de diferentes periodicidades demonstrou que existe um **intervalo de arrastamento** dentro do qual o ritmo pode ser sincronizado de forma estável, sendo as periodicidades desse intervalo próximas do período de livre-curso do oscilador. Fora desse intervalo, mas ainda próximo aos seus limites, o ritmo era fracamente arrastado num processo chamado **coordenação relativa** (Swade, Pittendrigh 1967): o estímulo cíclico não era forte o suficiente para arrastar o ritmo, mas ainda conseguia exercer um certo controle de fase. Quando a intensidade da luz, da parte clara de um fotoperíodo incapaz de sincronizar um ritmo, era aumentada, esse fotoperíodo passava a sincronizar o ritmo. Da mesma forma, se a intensidade da parte clara de um fotoperíodo efetivo era diminuída, a sincronização podia ser perdida.

A ação de um zeitgeber como o claro-escuro pode ser **paramétrica** ou **não-paramétrica** (Pittendrigh, Daan 1976): no primeiro caso, o estímulo provoca um efeito constante no tempo, como uma pressão constante sobre um sistema; no segundo caso, o efeito do estímulo é localizado no tempo,

como uma breve pancada.

Breves pulsos de luz podem sincronizar os ritmos circadianos, quando administrados aos organismos mantidos em escuro constante, apenas nos momentos em que aconteceriam, no fotoperíodo natural, as mudanças de escuro para claro e vice-versa. Esse tipo de zeitgeber é conhecido como **fotoperíodo esqueleto**, por representar uma mímica do ciclo de claro-escuro que ocorre na natureza, como mostrado na fig.3.4.

O fotoperíodo esqueleto é revelador do mecanismo não-paramétrico de sincronização do fotoperíodo completo: a ação efetiva de deslocamento de fase do oscilador acontece principalmente nos momentos de transição de luz.

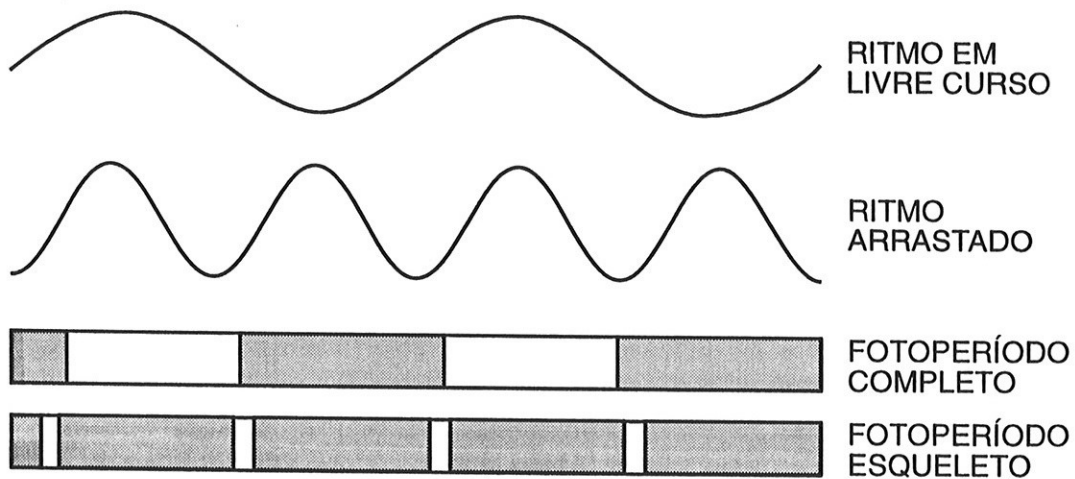


Figura 3.4: Sincronização do oscilador circadiano pelo fotoperíodo completo e pelo fotoperíodo esqueleto

O deslocamento de fase efetivo ocorre nos momentos de transição entre os ciclos de claro-escuro. Durante as fases em que a iluminação é mantida constante, porém, ainda existe um efeito paramétrico muito mais fraco da luz sobre o oscilador, acelerando ou desacelerando o ciclo em suas diferentes fases. A verificação desse fato ocorre quando o organismo é mantido em claro constante e se observa uma leve diminuição ou aumento do seu período τ . Aumentos estão sempre correlacionados com PRCs que apresentam áreas de atraso maiores do que áreas de adiantamentos e vice-versa: a ação da luz constante é interpretada como resultante da integração de pulsos sucessivos sobre o oscilador, alterando parametricamente a sua velocidade angular. Esse processo, porém, ocorre com intensidade muito pequena, em comparação ao

impacto que a transição de luz tem sobre o oscilador (Pittendrigh, Daan 1976).

O pulso de luz constitui uma perturbação sobre o ciclo-limite que, apesar de não modificar a amplitude, modifica a fase do ciclo. O tamanho dessa modificação, ou deslocamento de fase, varia para cada fase em que a mesma perturbação é imposta. A propriedade dos ritmos de se sincronizarem por fotoperíodos esqueléticos conduz naturalmente à verificação dos efeitos de pulsos de luz sobre o oscilador, nas suas diferentes fases. A curva que apresenta essa variação com a fase do deslocamento é chamada de **Curva de Resposta de fases** ou **PRC** (Phase Response Curve), constituindo a base do mecanismo de sincronização dos ritmos.

Curva de Resposta de Fases PRC

Uma PRC consiste num gráfico onde as abscissas correspondem às fases Φ de um ciclo e as ordenadas correspondem ao deslocamento de fase ($\Delta\Phi$) provocado pelo pulso, naquela fase. Esse deslocamento pode ser um atraso ($\Delta\Phi < 0$) ou adiantamento de fase ($\Delta\Phi > 0$).

A variação periódica da sensibilidade à luz, que constitui a base da sincronização do oscilador circadiano, já havia sido observado em plantas por Kleinhoonte, em 1932 (citado em Bünning 1957). A primeira apresentação formal de uma PRC foi realizada por De Coursey, em 1959 (De Coursey 1959), com a observação do deslocamento de fases induzido no ritmo de atividades de esquilos voadores (*Glaucomys volans*), por pulsos de dez minutos de luz. Desde então, a construção de curvas de resposta de fases tem constituído um procedimento básico na compreensão dos mecanismos de sincronização e da natureza dos osciladores subjacentes aos ritmos biológicos. A PRC permite que deslocamentos observados nos ponteiros do relógio possam trazer inferências sobre o funcionamento do relógio, consistindo no caso mais elaborado de um experimento de "caixa preta" em cronobiologia: quando não se sabe como funciona um sistema, perturba-se esse sistema de diversos modos e faz-se hipóteses sobre o seu conteúdo através das respostas a cada perturbação. Análises das formas das PRCs, em diversos organismos, trouxeram surpreendentes informações sobre o papel do oscilador como relógio biológico (Pittendrigh, Daan 1976).

Existem grandes diferenças nas formas das PRCs apresentadas entre espécies diferentes, sendo a escala dessa diferença muito maior do que as dife-

renças entre indivíduos da mesma espécie (Pittendrigh, Daan 1976). Como o indivíduo se encontra em condições de claro ou escuro constante, considera-se “dia subjetivo” o intervalo no qual se observam comportamentos que a espécie apresenta no claro e “noite subjetiva”, o intervalo no qual se observam comportamentos apresentados no escuro. Assim, todas as PRCs apresentam atrasos de fase no início da noite subjetiva e adiantamentos de fase no fim da noite subjetiva. Durante o dia subjetivo e a noite subjetiva, as PRCs não apresentam deslocamentos significativos de fase, demonstrando, mais uma vez, insensibilidade do relógio em horários correspondentes à situação de luminosidade constante. A sensibilidade é observada nas fases correspondentes ao anoitecer e amanhecer, que correspondem às mudanças de luminosidade. Essa propriedade geral está ilustrada na fig.3.5.

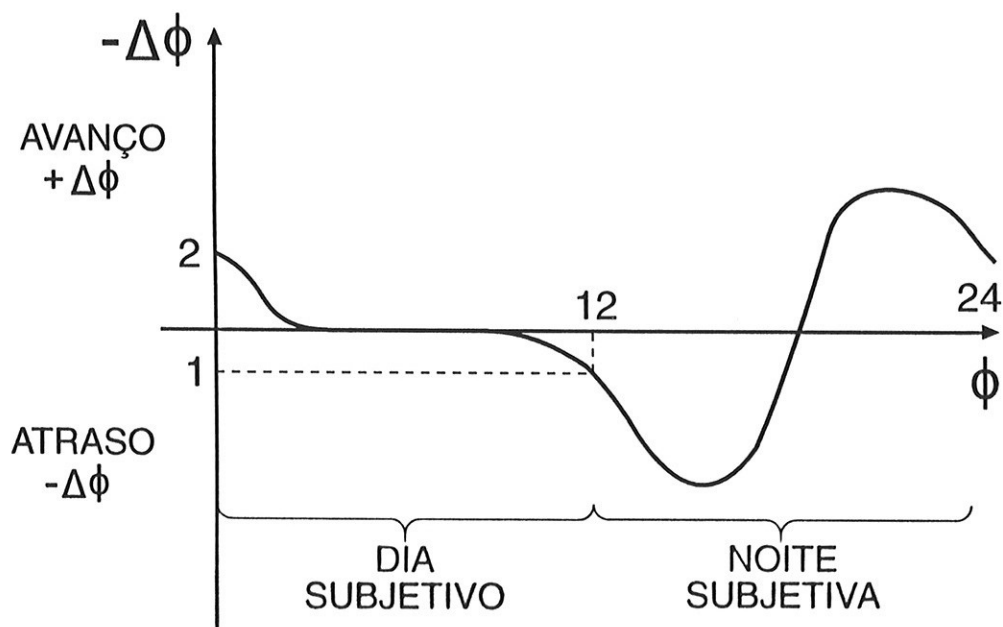


Figura 3.5: Esquema da forma geral de uma PRC, em que atrasos e adiantamentos de fase ocorrem, respectivamente, no início e fim da noite subjetiva

Para que um zeitgeber possa arrastar o sistema de temporização circadiano, deve acertar, a cada ciclo, a fase do oscilador por uma quantidade igual à diferença entre o seu período e do oscilador. Em linhas gerais, podemos entender o processo da sincronização como o acerto, ciclo por ciclo, nessa diferença. A PRC da fig.3.5 ilustra de que forma o surgimento do sol, nas

primeiras horas do dia, causa um adiantamento de fase de 2 horas e o poente, no entardecer, causa um atraso de 1 hora, resultando na sincronização de um oscilador com $\tau = 25$ horas por um zeitgeber de $25 - 2 + 1 = 24$ horas.

Uma outra característica comum às PRCs são as duas formas em que eles se apresentam, seja quando submetido a um estímulo de intensidade forte ou fraca. Na fig.3.6, estão ilustrados os dois tipos de PRC, tendo sido chamados de Tipo 0 e Tipo 1, respectivamente, para pulsos fortes e fracos e tratados na seção seguinte.

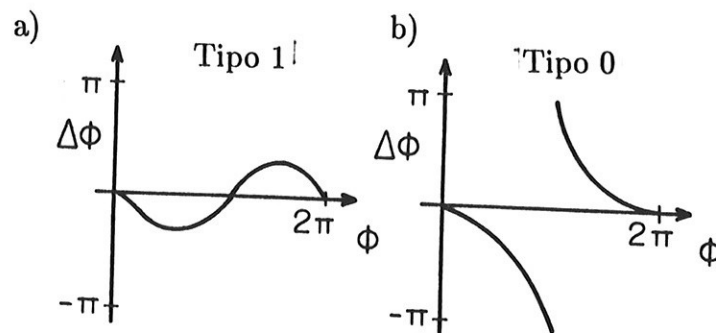


Figura 3.6: PRC para diferentes intensidades dos pulsos. a) Tipo 1. b) Tipo 0

Uma PRC mostra o deslocamento final de uma série de pequenos deslocamentos **transientes** apresentados pelo ritmo, após o sistema ter recebido o pulso. Esses transientes são indicados como a evidência de que o pulso de luz deslocou imediatamente a fase do oscilador, mas o processo da transmissão dessa nova fase ao ritmo foi lento. A verificação de que o deslocamento de fase é instantâneo pôde ser realizada e é apresentada em Moore-Ede, Sulzman, Fuller (1982).

Transientes são, dessa forma, comumente associados com a demora na transmissão de uma nova fase do oscilador para um ritmo ou para um outro oscilador (Pittendrigh, Bruce 1959).

Modelo de Ciclo-Limite Perturbado Impulsivamente

Como vimos na seção anterior, o fotoperíodo esqueleto consiste em pulsos rápidos de luz atuando sobre o oscilador biológico, em escuro constante,

sendo o seu efeito de sincronização a base daquele do zeitgeber de claro-escuro que encontramos na natureza. As propriedades observadas podem ser descritas através do modelo generalizado de **ciclo-limite perturbado impulsivamente**. Essa força é caracterizada por atuar no oscilador em pulsos localizados numa estreita faixa de tempo, representados matematicamente por funções delta, e o modelo é conhecido como "kicked oscillator" (Campbell et al 1988)(Ding 1987)(Glass 1988).

Ciclos-limites são representados por curvas fechadas no plano de fases e uma curva fechada pode, através de transformação conveniente de variáveis, ser representada por um círculo (Murray 1989). Um ciclo limite no plano de fases é representado, portanto, genericamente, por um círculo centrado num foco instável, a partir do qual podemos traçar linhas radiais sobre as quais recaem todos os pontos correspondentes à mesma fase, como ilustrado na fig.3.7a Essas linhas foram denominadas **isócronas**, por Arthur Winfree (1980), que desenvolveu toda uma teoria geométrica da cronobiologia. O foco instável corresponde a uma **singularidade** no espaço de fases, por não corresponder a nenhuma fase específica (Winfree 1980) (Petersen 1980).

O resultado de perturbações impulsivas sobre o ciclo-limite, em suas diferentes fases Φ , são deslocamentos da trajetória para novas fases Φ' , sendo a magnitude do deslocamento, $\Delta\Phi = \Phi' - \Phi$, dependente de Φ e da intensidade I do pulso.

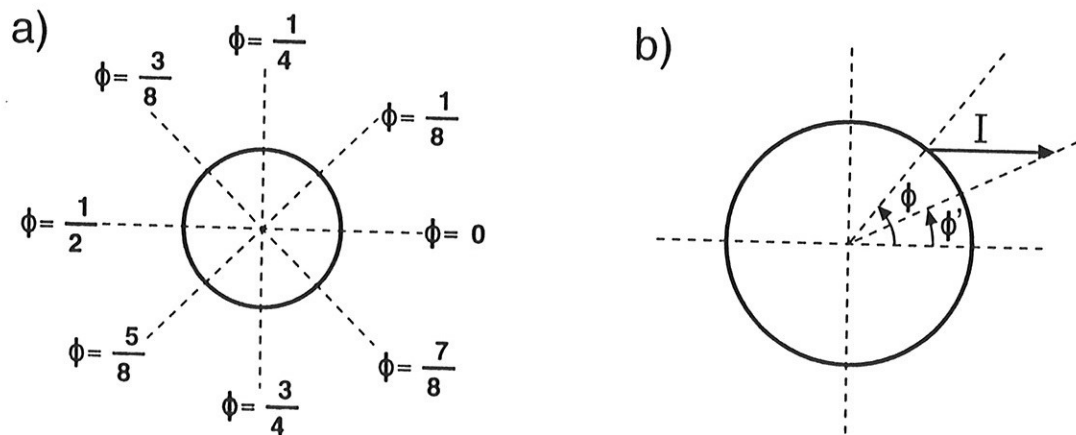


Figura 3.7: a) Isócronas no plano de fases. b) Deslocamento de fase causada por uma perturbação impulsiva de magnitude I

Em termos geométricos, uma perturbação no ciclo limite corresponde a um vetor de deslocamento horizontal no plano de fases, apontando sobre a isócrona correspondente à nova fase Φ' , e retornando à curva inicial, dessa forma conservando a amplitude mas mudando a fase, fig.3.7b. A nova fase Φ' está relacionada com a fase em que foi submetido o pulso Φ e à intensidade do pulso I através da relação (Glass 1988):

$$\Phi' = \frac{1}{2\pi} \arccos \frac{I + \cos 2\pi\Phi}{(1 + 2I \cos 2\pi\Phi + I^2)^{1/2}} \quad (3.4)$$

De acordo com esse modelo, temos dois tipos diferentes de PRC, gráficos da alteração de fase $\Delta\Phi$ em função de Φ , de acordo com a magnitude da perturbação I , e denominados, segundo Winfree: **Tipo I** para pequenas intensidades da perturbação, quando o ciclo deslocado ainda contém o ponto de equilíbrio: nesse caso, existe uma correspondência ($\Phi \rightarrow \Phi'$) entre todas as fases do ciclo; **Tipo 0** para grandes intensidades, quando o ciclo não contém mais o ponto de equilíbrio inicial e o gráfico apresenta uma descontinuidade: nesse caso, a relação ($\Phi \rightarrow \Phi'$) mapeia as fases iniciais para apenas um intervalo limitado de fases Φ' , como ilustrados na fig.3.8.

Esses gráficos têm uma boa correspondência com resultados experimentais de curvas de resposta de fases de ciclos biológicos sujeitos a perturbações de intensidades fortes e fracas, apresentados na seção anterior (Sismondo 1990) (Moore-Ede 1992).

Uma importante previsão desse modelo é que existe, para todo ciclo-limite, um pulso dado numa fase específica Φ^* , com intensidade específica I^* , que leva o sistema exatamente sobre o ponto de singularidade, como ilustrado na fig.3.8c. Nesse caso, o sistema é deslocado para uma condição de fase indeterminada, traduzida por um estado arritmico. Por ser o foco instável, este experimento é muito difícil de se realizar, pois pequenas perturbações podem afastar o sistema desse ponto. Apesar disto, evidências experimentais têm surgido sobre a ocorrência desse efeito, demonstrando a generalidade dessa abordagem topológica do sistema de ciclo-limite (Winfree 1975), (Karlsson, Johnson 1972), (Taylor et al, 1982).

Estrutura do Espaço de Parâmetros

Com o conhecimento do efeito de um pulso único em cada fase do oscilador, através da PRC, podemos prever o efeito de pulsos periódicos de mesma

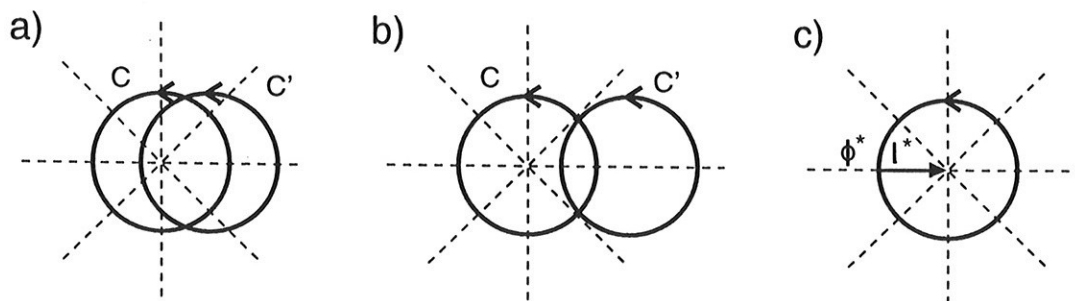


Figura 3.8: Efeitos dos impulsos, segundo Winfree: a) Tipo 1, quando a perturbação ainda engloba o foco b) Tipo 0, quando a perturbação vai além do foco c) perturbação que leva o sistema ao estado arritmico

intensidade ministrados ao oscilador. Um regime de “**phase-lock**” ou **sincronismo de fase** é obtido quando o oscilador, sujeito aos pulsos periódicos, completa q ciclos para cada p ciclos de pulsos, sendo p/q um número racional. Quando $p/q = 1/1$, temos a sincronização em que o oscilador passa a completar o ciclo com a mesma periodicidade dos pulsos externos, como é o caso do arrastamento do oscilador circadiano pelo zeitgeber de claro-escuro. Esse regime, somado a todos os outros caracterizados por p/q racionais é chamado **regime periódico**. Quando o resultado da interação entre o oscilador e os pulsos é um p/q irracional, temos um **regime quase-periódico** e quando p/q não converge, temos um **regime caótico** (Ding 1987) (Jensen, Bak 1984).

O regime em que o sistema vai recair é determinado pelo conjunto dos parâmetros I e β : I corresponde à intensidade do pulso e β à razão entre o período dos pulsos periódicos e o período de livre-curso do oscilador: quando a intensidade da força periódica é baixa, a sincronização com $p/q = 1/1$ é possível somente para osciladores com periodicidades situadas numa estreita faixa próxima à da força externa; à medida em que I aumenta, cresce a capacidade de arrastar osciladores com periodicidades mais afastadas. Quando os parâmetros são variados (a intensidade da força é diminuída, ou a frequência da força periódica é levada para um valor muito distante daquela do oscilador), o sistema muda de um regime a outro. Um parâmetro sozinho não define independentemente o regime do sistema, precisando ser visto em conjunto com o outro: para se entender de forma sistematizada o efeito conjunto dos parâmetros I e β , é preciso construir o **Espaço de Parâmetros** do sis-

tema.

Para melhor tratar analiticamente o problema, costuma-se utilizar o oscilador de Van der Pol, por sua simplicidade, como protótipo de sistema com ciclo limite estável isolado, centrado num foco instável (Ding 1987), representado nas coordenadas (r, Φ) :

$$\begin{aligned}\dot{r} &= Ar(1 - r) \\ \dot{\Phi} &= -1\end{aligned}\tag{3.5}$$

O parâmetro A representa o inverso do tempo de relaxamento do sistema, quando perturbado para fora do ciclo-limite $r = 1$. Levamos em conta que o sistema tenha um rápido relaxamento, ou seja, que o sistema retorne rapidamente ao ciclo-limite, entre o intervalo de um pulso e o próximo.

Como o deslocamento causado pelo pulso é representado por um vetor na direção x , é conveniente representar o mesmo sistema nas coordenadas $(x = r \cos \Phi, y = r \sin \Phi)$:

$$\begin{aligned}\dot{x} &= Ax(1 - x^2 - y^2) - y + 2I\Sigma_n\delta(t - 2\pi n\beta) \\ \dot{y} &= x + Ay(1 - x^2 - y^2)\end{aligned}\tag{3.6}$$

onde a somatória na equação 3.6 representa a seqüência dos pulsos ministrados ao oscilador, representados pela função Delta de Dirac (Ding 1987).

Sendo o efeito do pulso não paramétrico, esse sistema evolui autonomamente nos intervalos de tempo entre os pulsos. Dessa forma, o sistema é integrado separadamente, durante e entre pulsos. A função Delta, representando o pulso, é matematicamente conveniente para essa integração. No limite de rápido relaxamento ($A \rightarrow \infty$), o sistema de duas dimensões pode ser convenientemente reduzido a um **mapa circular**: a variável r permanece aproximadamente constante no ciclo-limite ($r = 1$) e a evolução do sistema é representada apenas pela variável Φ . Essa evolução se processa em tempos discretos $t = n$, onde n é um inteiro e ao qual corresponde a variável Φ_n . O mapa circular é uma função que mapeia um ponto Φ_n do círculo $0 < \Phi < 2\pi$ num outro ponto Φ_{n+1} no mesmo círculo: $\Phi_{n+1} = F(\Phi_n)$ (Ding 1987) (Kaneko 1986) (Bak 1986).

O mapa circular correspondente às equações 3.6 fornece a nova posição angular Φ_{n+1} após o n -ésimo pulso, como função da posição anterior Φ_n :

$$\Phi_{n+1} = F(\Phi_n) = \text{arctg} \frac{\text{sen}(\Phi_n + 2\pi\beta)}{2I + \text{cos}(\Phi_n + 2\pi\beta)} \quad (3.7)$$

Essa função representa um mapa circular com os dois parâmetros I e β . Note-se que, a partir do gráfico do par (Φ_{n+1}, Φ_n) , temos a PRC do oscilador, visto que esse último indica, para cada fase, a nova fase para o qual o pulso o desloca, sendo $\Phi_{n+1} = \Phi_n + \Delta\Phi$.

Para se verificar o comportamento do sistema para determinados valores dos parâmetros, é preciso iterar o mapa F , produzindo a série: $\Phi, F(\Phi), F^2(\Phi), F^3(\Phi) \dots$ ou $\Phi_1, \Phi_2, \Phi_3 \dots$

Temos um ciclo de período p quando, para qualquer n :

$$\Phi_{n+p} = \Phi_n \quad (3.8)$$

O **número de rotação** desse sistema é definido como p/q , em que p corresponde ao número de ciclos de pulsos a cada q ciclos completados pelo oscilador. p/q racional caracteriza o regime periódico, p/q irracional caracteriza o regime quasi-periódico e p/q não convergente caracteriza o regime caótico. Como vimos, o conjunto dos parâmetros I e β determina o regime do sistema oscilador-pulso periódico. O espaço de parâmetros é construído verificando, para cada coordenada (I, β) o tipo de regime do sistema, agrupando no gráfico $(I \times \beta)$ as regiões de mesmo regime, como mostrado na fig.3.9, para o oscilador de Van der Pol sujeito a pulsos delta periódicos.

O espaço de parâmetros apresenta características distintas para regiões de intensidades baixas, altas e intermediárias dos pulsos. Lembrando que o regime final resulta da interação entre o oscilador que tem uma frequência autônoma e o pulso com outra frequência, temos: regimes periódicos e quasi-periódicos para baixas intensidades do pulso ($I < 0,5$); regimes periódicos e caóticos para intensidades intermediárias ($0,5 < I < 1$); regimes periódicos completamente determinados pela frequência do pulso, para intensidades fortes do mesmo ($I > 1$) (Ding 1987).

Interessa-nos, aqui, verificar as regiões de baixa intensidade do pulso ($I < 0,5$), por ser nessa faixa que acontecem as sincronizações comumente observadas no meio ambiente. As zonas periódicas, cada qual com um número de rotação p/q diferente, formam estruturas chamadas de "Línguas

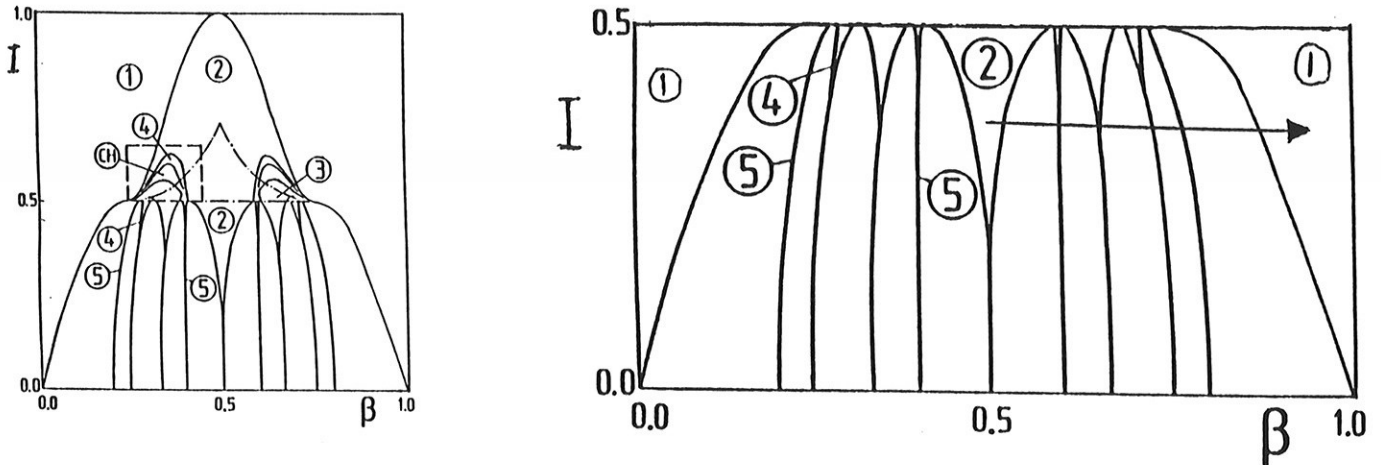


Figura 3.9: Espaço de Parâmetros do oscilador de van der Pol sujeito a força periódica impulsiva. Nas abscissas temos o parâmetro β e nas ordenadas o parâmetro I . Regimes periódicos são caracterizados pelo número de rotação p/q respectivo, extraído de Ding (1987).

de Arnold”. Quando I é pequena, todas as línguas são estreitas, sendo a largura de cada língua proporcional à faixa de frequências β capazes de serem sincronizados naquele regime. Essa largura aumenta com o aumento de I , representando o aumento do “intervalo de arrastamento” tratado na seção 3.4.1.

Verifiquemos a língua correspondente a $p/q = 2/1$. O regime periódico $p/q = 2/1$ representa um sistema em que o oscilador completa um ciclo a cada dois ciclos do pulso: na região de intensidades muito pequenas $I \approx 0$, onde a interação entre oscilador e pulso é muito fraca, cada um comportando-se quase autonomamente, isso ocorre na linha onde, de fato, os períodos do pulso e do oscilador estão na razão $\beta = 1/2$. Aumentando I , a interação começa a fazer efeito e osciladores cujas periodicidades são diferentes, mas estão na vizinhança $\beta \approx 1/2$, começam a oscilar segundo o regime $p/q = 2/1$.

Vizinhanças cada vez mais distantes são sincronizadas, dessa forma, com aumento de I .

Um sistema num regime $p/q = 2/1$ pode passar a um regime $p/q = 1/1$ se mantivermos I e aumentarmos β , como mostrado pela seta 1 na fig.3.9. Como β representa a razão entre o período dos pulsos e o período autônomo do oscilador, um aumento de β pode ser obtido com o aumento do primeiro ou com a diminuição do último, de forma a aproximar as duas periodicidades da razão $1/1$, que resulta no arrastamento de mesmo período.

Fora das línguas estão as zonas quasi-periódicas, que correspondem a um p/q irracional: esse comportamento corresponde à “coordenação relativa” tratada em 3.4.1.

Apesar de diferentes ciclos-limites, sujeitos a diferentes forças externas, apresentarem especificidades na forma e posições das línguas de Arnold e das regiões quasi-periódicas e caóticas, a estrutura geral do espaço de parâmetros é a mesma para essa classe de sistemas: comportamentos típicos nas regiões de baixas, médias e altas intensidades da força externa periódica.

A estrutura fina do espaço de parâmetros é muito complexa, principalmente na região de intensidade intermediária, onde se entrelaçam regimes periódicos e caóticos. Estudos detalhados dessa região têm revelado minuciosas estruturas, envolvendo a sistemática da Dinâmica Simbólica (Metropolis, Stein, Stein 1973) (Belair, Glass 1985)(Bak 1986)(Bai Lin 1989)(Ding 1987)(Ullmann, Caldas 1997).

A verificação experimental da passagem de um regime periódico a outro caótico tem sido feita, com a submissão de neurônios (Aihara et al 1986) e marcapassos do coração de pintos (Glass et al 1984) a pulsos elétricos de periodicidades e intensidades controladas.

3.4.2 Sincronização por Acoplamento de Osciladores

Fenômenos coletivos resultantes da agregação de muitos osciladores, através de acoplamentos mútuos, são muito comuns na natureza.

A etapa primordial do desenvolvimento do marcapasso do coração de pintos consiste numa população de células oscilatórias independentes: à medida em que essas unidades entram em contato, elas se sincronizam de forma que a população começa a funcionar como um único oscilador (De Haan, 1967).

Amebas da espécie *Dictyostelium discoideum* são seres unicelulares e vivem independentemente, até o momento em que uma eventual escassez de

alimentos provoca um processo de agregação através de uma substância chamada cAMP, que é sintetizada e liberada periodicamente por algumas amebas centrais. À medida em que novas amebas vão se juntando, elas passam a produzir a mesma substância, que atrai novas células por quimiotaxia, de forma sincronizada, amplificando o sinal, terminando por constituir um organismo com cerca de 10^5 componentes (Goldbeter 1996). Assim, osciladores acoplados podem apresentar um conjunto de comportamentos muito mais complexo do que o apresentado por um único oscilador isolado (Kuramoto 1984).

De acordo com o modelo apresentado no cap.2, o sistema circadiano consiste em um fotorreceptor, um oscilador circadiano e o conjunto dos ritmos que mantêm entre si uma relação de fases constante, caracterizando a **sincronização interna**. Dois problemas centrais têm sido trabalhados do ponto de vista fisiológico: o primeiro consiste na identificação dos correlatos anatômicos desses componentes; o segundo consiste na determinação dos mecanismos de interação desses componentes, formando um sistema regulatório organizado.

O modelo básico (fotorreceptor \rightarrow oscilador \rightarrow ritmo) tem se mostrado gradativamente mais complexo em suas estruturas componentes: ritmos diversos podem ser controlados por um único oscilador central; ritmos diversos podem ser controlados por osciladores circadianos diferentes; mais de um oscilador pode controlar um único ritmo. No caso da existência de mais de um oscilador, eles podem ser acoplados ou não. Esses modelos são ilustrados, esquematicamente, na fig.3.10.

Nos insetos, a existência de um sistema multioscilaratório é bastante evidente. Existem demonstrações de osciladores no sistema nervoso central cuja ação é redundante, como em besouros (Koehler, Fleissner 1978), ou osciladores mutuamente acoplados como na barata (Page et al, 1977). Além dos osciladores neurais, os insetos apresentam osciladores localizados diretamente na estrutura que apresenta ritmicidade, como as células epidérmicas responsáveis pela elaboração da cutícula (Neville 1975); ou na glândula pro-torácica, que sintetiza o hormônio da muda (Mizogushi, Ishizaki 1982); ou ainda na atividade das gônadas e estruturas acessórias (Weber 1985).

Nas baratas (*Leucophaea maderae*), os dois principais osciladores localizam-se bilateralmente nos dois lóbulos ópticos. Remoções de um dos lóbulos comprovam que cada oscilador consegue sustentar, independentemente, o ritmo circadiano de atividades desses insetos. Essa remoção, no entanto, causa um aumento de τ do oscilador intacto. O acoplamento dos dois osciladores, resul-

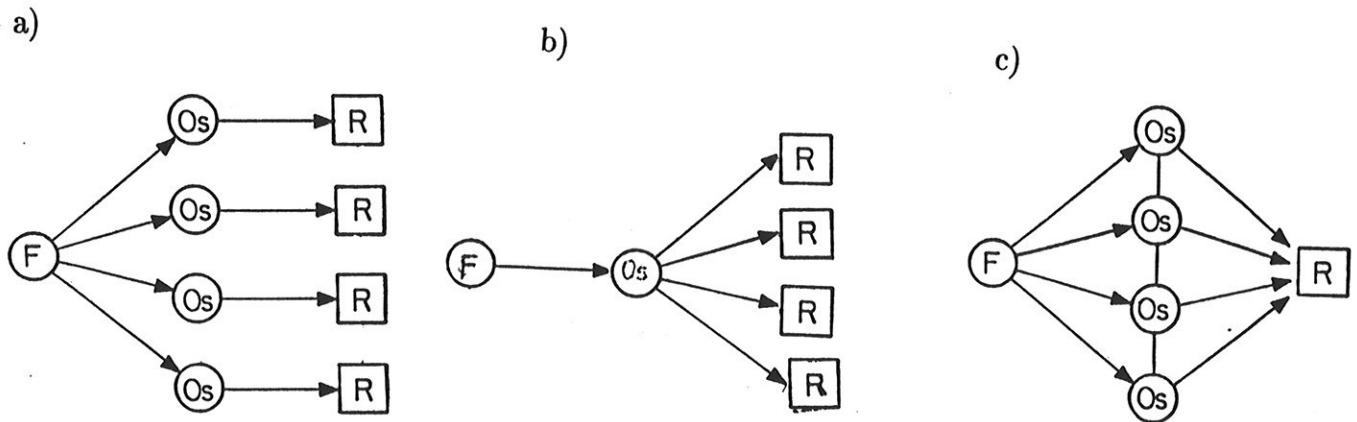


Figura 3.10: Aumento de complexidade do modelo básico do sistema circadiano: a) diferentes osciladores circadianos controlam diferentes ritmos. b) um oscilador controla vários ritmos. c) mais de um oscilador controla um único ritmo.

tando num único oscilador central, resulta na diminuição de τ . Além disso, quando um estímulo sincronizador é submetido apenas a um dos osciladores, verifica-se o deslocamento da fase também no outro oscilador. A amplitude deste deslocamento, porém, é maior quando o outro oscilador havia sido removido: o acoplamento mútuo diminui a amplitude do deslocamento (Page 1978).

Em organismos mais complexos, Winfree propôs um modelo de populações de osciladores circadianos fracamente acoplados, tendo como unidade células, formando o oscilador central (Winfree 1967). Pavlidis, por outro lado, propôs um modelo de populações de osciladores ultradianos fortemente acoplados, também a nível de células, tendo como resultado final um oscilador circadiano. O resultado de um forte acoplamento de osciladores de frequências altas resulta na sincronização que tem como resultante um oscilador de baixa frequência (Pavlidis 1969), (Miller 1993). De qualquer forma, a extrema precisão do oscilador circadiano é um aspecto a ser destacado: um oscilador está sempre sujeito a imprecisões decorrentes de flutuações estocásticas. Uma população de osciladores acoplados apresenta maior estabili-

dade de seu período, pois pequenas variações em osciladores componentes são logo amortecidas pela influência corretiva do conjunto dos demais osciladores (Enright 1980).

Todas essas propriedades são resultado de modelos matemáticos de osciladores acoplados. O desenvolvimento desses modelos, no entanto, é muito extenso e específico para cada propriedade a ser verificada, sendo apresentadas, na seção seguinte, apenas as linhas gerais da formulação matemática de osciladores acoplados. Detalhes do desenvolvimento podem ser encontrados nas referências citadas.

Formulação Matemática do Acoplamento

A sincronização de um oscilador submetido a uma influência externa periódica pode ser devida a uma força externa aplicada ou à ação de outros osciladores vizinhos. Nesse caso, a influência é mútua, cada oscilador influenciando o comportamento do outro. Nesse caso, dizemos que os osciladores estão **acoplados**, podendo o efeito do acoplamento ser paramétrico ou não-paramétrico.

Entre dois osciladores com freqüências muito próximas, um acoplamento fraco é suficiente para que ambos se sincronizem. Para facilitar a formulação, vamos considerar dois ciclos-limites idênticos acoplados. Sejam (r, Φ) as coordenadas de cada oscilador, no espaço de fases. A evolução de cada oscilador, independente, é:

$$\begin{aligned} \dot{r}_1 &= F(r_1, \Phi_1) & \dot{r}_2 &= F(r_2, \Phi_2) \\ \dot{\Phi}_1 &= G(r_1, \Phi_1) & \dot{\Phi}_2 &= G(r_2, \Phi_2) \end{aligned} \quad (3.9)$$

Ao considerarmos o acoplamento, temos:

$$\begin{aligned} \dot{r}_1 &= F(r_1, \Phi_1) + \epsilon k(r_2 - r_1) + \lambda f(r_1, \Phi_1) \\ \dot{\Phi}_1 &= G(r_1, \Phi_1) + \epsilon k(\Phi_2 - \Phi_1) + \lambda g(r_1, \Phi_1) \\ \\ \dot{r}_2 &= F(r_2, \Phi_2) + \epsilon k(r_1 - r_2) \\ \dot{\Phi}_2 &= G(r_2, \Phi_2) + \epsilon k(\Phi_1 - \Phi_2) \end{aligned} \quad (3.10)$$

onde $0 < \epsilon \ll 1$ e $k > 0$ é uma constante de acoplamento. Quando $\epsilon = 0$, não temos acoplamento e as equações reduzem-se a 3.9. Quando $\epsilon \neq 0$ e $\lambda = 0$, os dois osciladores acoplados são idênticos. O último termo em λ garante generalidade suficiente para o sistema, fornecendo a assimetria que permite que os dois osciladores sejam diferentes. Os termos específicos de acoplamento utilizados, representados pelos termos em k , são proporcionais à diferença de fases ($r_1 - r_2$) e $(\Phi_1 - \Phi_2)$ entre os osciladores, sendo o tipo de acoplamento mais utilizado nos modelos. O termo $\epsilon \ll 1$ determina que o acoplamento seja fraco, o que permite que **métodos perturbativos** sejam utilizados na resolução do sistema. O método perturbativo tem sido satisfatório na resolução desses problemas que são muito difíceis de serem resolvidos analiticamente (Neu 1979), (Kuramoto 1984), (Murray 1989).

No espaço de fases, espera-se que o efeito do acoplamento fraco modifique levemente a trajetória do sistema do ciclo-limite original.

Através do método perturbativo, comportamentos característicos de osciladores acoplados podem ser explicados, como o **sincronismo de fases**, que ocorre quando as periodicidades dos dois osciladores são muito próximos e a diferença de fases entre os dois tende a um valor constante, e o “**splitting**”, quando as duas periodicidades são muito diferentes e no qual se alternam uma lenta variação da diferença de fases com uma rápida flutuação nessa diferença (Neu 1980)(Kopell 1984) (Kuramoto 1984).

Além disso, esses modelos descrevem a mudança dos períodos dos osciladores, quando acoplados fortemente, como foi observado em experiências com baratas, descrita na seção anterior (Kawato, Suzuki 1980)(Daan, Berde 1978).

3.5 Modelos de Realimentação

Paralelamente aos modelos que explicam qualitativamente os comportamentos dos ritmos biológicos, modelos com equações explícitas têm sido desenvolvidos, identificados com os processos bioquímicos geradores dos ritmos, representando uma abertura da caixa-preta.

O conhecimento detalhado desses mecanismos bioquímicos tem sido possível apenas em alguns poucos animais como a mosca *Drosophila* e o fungo *Neurospora*, graças a avanços nas áreas de bioquímica celular, biologia molecular e genética (Goldbeter 1996).

Sabe-se que o mecanismo gerador da oscilação circadiana depende, pelo menos em parte, de uma alça de realimentação negativa da transcrição dos segmentos de DNA que codificam a ritmicidade biológica (Weitz 1996). Este mecanismo parece ser surpreendentemente semelhante em organismos tão diferentes quanto uma mosca e um fungo (Page 1994). Estudos detalhados da seqüência de processos que integram esta alça mostram que a proteína sintetizada é mantida por um intervalo de tempo, no qual age como inibidor da transcrição de seu próprio gene (Aronson et al 1994)(Rosbach 1995) (Goldbeter 1996).

A construção do modelo de um processo de realimentação é construído em duas etapas (Friesen 1993). Numa primeira etapa, é construído um esquema qualitativo de todas as fases do processo, com a determinação de todas as variáveis que o constituem. Essas variáveis são representadas por blocos ligados por linhas que representam o tipo de interação entre eles: terminações em T representam efeito inibidor e terminações em \bullet representam efeito excitatório. Triângulos entre as linhas representam atrasos (Johnsson, Karlsson 1972), que representam a não-instantaneidade do processo.

Um esquema qualitativo bastante simples é apresentado na fig.3.11.

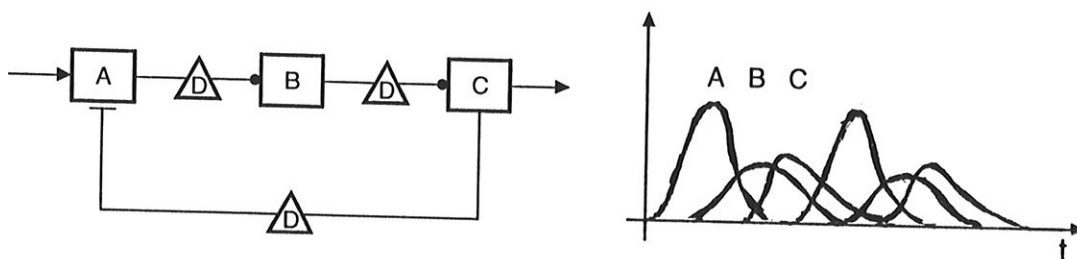


Figura 3.11: Exemplo de modelo de realimentação, em que os blocos correspondem às variáveis, e as interações entre elas são explicitadas. Na figura à direita, apresentamos a evolução temporal das três variáveis A, B e C, com diferença de fase.

Nesse sistema, o modelo é representado pela seguinte série de equações, onde A,B,C representam as variáveis, m (coeficiente de Hill), F, G, a, b, c, d, e são parâmetros positivos e constantes:

$$\begin{aligned}\frac{dA}{dt} &= \frac{F}{G + C^m} - aA \\ \frac{dB}{dt} &= bA - cB \\ \frac{dC}{dt} &= dB - eC\end{aligned}\tag{3.11}$$

A criação de A é inibida pelo produto final C e degradada de acordo com uma cinética de primeira ordem. O tempo necessário para que ocorra a seqüência dos processos formadores de B e C corresponde ao atraso que constitui um componente necessário, num processo de realimentação, para o surgimento de oscilações (Murray 1989).

Uma vez identificadas as variáveis e o tipo de interação entre elas, procede-se à etapa quantitativa do modelamento, que corresponde ao ajuste de parâmetros de forma a obter, como resultado das equações, oscilações com as características (períodos, relação de fases entre variáveis, forma da onda) observadas no sistema biológico, como mostrado na fig.3.11.

É importante ressaltar que a oscilação ocorre apenas num conjunto limitado de intervalos dos parâmetros do sistema, denominado “domínio de oscilação”: para algum valor do parâmetro fora desse domínio, o caráter oscilatório não se verifica mais no sistema. A possibilidade de oscilações do tipo ciclo-limite ocorrerem como resultado de um sistema de equações é verificada no teorema de Poincaré-Bendixon (Andronov e Chaikin 1949).

Dizemos que esse tipo de modelamento é explícito porque estamos identificando as variáveis e interações envolvidas nas equações, esclarecendo os mecanismos. Modelos explícitos de realimentação do oscilador circadiano têm ainda se limitado a poucos processos específicos como o do oscilador de “*Drosophila*”, visto que, na maioria dos casos, o número de reações químicas envolvidas na geração da oscilação é tão grande que uma descrição ponto a ponto de todo o processo ainda é inacessível. Por outro lado, a verificação de processos semelhantes de realimentação na transcrição do DNA no fungo *Neurospora* (Aronson et al, 1994), (Dunlap, Feldman 1988) tem reforçado a idéia de que esse processo possa constituir um mecanismo geral da ritmicidade, tanto em seres unicelulares como em multicelulares (Takahashi 1993).

Modelos devem ser suficientemente detalhados sem, no entanto, tornarem-se desnecessariamente complexos demais, pois acima de tudo seu objetivo é

contribuir para um melhor esclarecimento das principais variáveis envolvidas e na maneira como elas agem: simplificações excessivas de um processo, com modelos não identificados com dados experimentais, não geram hipóteses que possam ser testadas; por outro lado, um modelo que considera um número muito grande de variáveis e parâmetros de importâncias secundárias pode se perder em sua própria complexidade matemática, sem trazer contribuições para o melhor entendimento do processo.

Paralelamente aos recentes avanços na bioquímica, e conseqüente identificação das etapas de muitos processos fisiológicos complexos, modelos detalhados de realimentação têm ajudado a visualizar os mecanismos geradores de outros ritmos como os da glicólise e ritmos intracelulares de Ca^{++} (Goldbeter 1996). Apresentamos, na fig.3.12, o esquema qualitativo do oscilador de Ca^{++} , para ilustrar um processo mais complexo de realimentação.

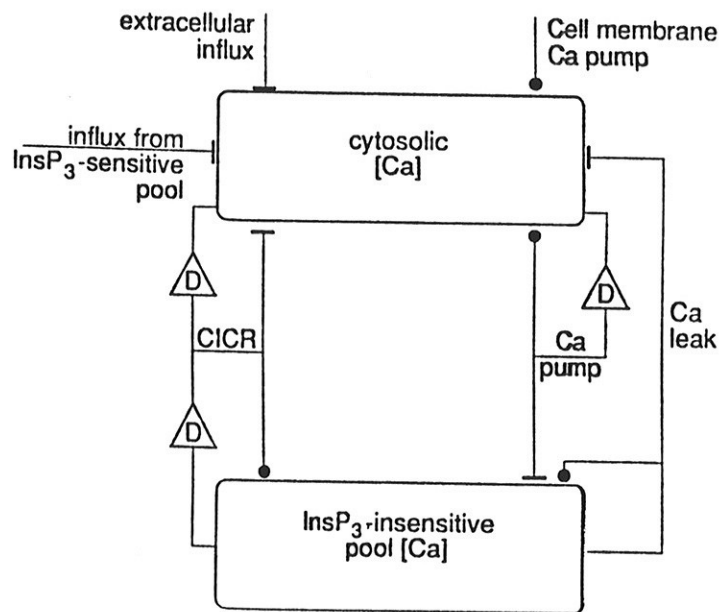


Figura 3.12: Esquema qualitativo dos processos envolvidos na geração de oscilações de Ca^{++} , extraído de (Friesen 1993)

Capítulo 4

Curvas de Respostas de Fases em Ciclos Infradianos

Ritmos de muda cuticular e de oviposição foram verificados em colêmbolos, insetos cavernícolas da espécie *Folsomia candida*, insetos cegos e despigmentados que vivem sobre o guano de morcegos (Chiba 1973)(Marques et al,1987)(Cutkomp et al,1987). Estudamos os ritmos desses insetos, por serem bastante convenientes do ponto de vista prático: podem ser facilmente criados em laboratório, onde o ambiente constante de cavernas é recriado; reproduzem-se com facilidade e por partenogênese, garantindo um grande número de indivíduos idênticos, do ponto de vista genético; além disso, têm uma vida relativamente longa, de aproximadamente 4 meses.

Investigamos a natureza dos ritmos infradianos observados nessa espécie. Ritmos infradianos são pouco estudados, mesmo em seres sujeitos a um ambiente evidentemente cíclico, em que existe sempre a possibilidade de um sistema de sincronização externa estar atuando.

Dentre os ritmos infradianos, os mais estudados são os ritmos circanuais, devido à clara correlação de suas periodicidades com a do movimento de translação da Terra em torno do Sol: ciclos ambientais de fotoperíodo e de temperatura ocorrem com periodicidades anuais, mas não se conhece, até o momento, o mecanismo de sincronização desses ritmos: não se sabe nem mesmo se existe um oscilador circanual controlando o ritmo, numa estrutura semelhante ao sistema circadiano (Gwinner 1981). Esse desconhecimento da natureza dos ritmos circanuais estende-se para os outros ritmos infradianos, sem correlatos geofísicos, sobre os quais vamos centrar nossa atenção. A veri-

ificação da natureza de um ritmo infradiano em seres que vivem em ambientes desprovidos de ciclos ambientais evidentes pode servir de indicativo para o que acontece nos demais seres.

Curvas de Resposta de Fases (PRC), como explicados no cap.3, fornecem muitas informações sobre a natureza do oscilador subjacente. Não há relato na literatura, até o momento, de uma PRC de um ritmo infradiano, o que motivou o nosso trabalho. Nosso objetivo foi construir uma PRC para os ritmos infradianos de muda e de oviposição dos insetos cavernícolas. Uma vez que esses insetos são cegos e, portanto, insensíveis à luz, utilizamos pulsos de temperatura para provocar os deslocamentos de fases.

"Gates" são muito comuns em ritmos de oviposição de insetos e constituem a manifestação de um relógio controlando um ciclo de desenvolvimento (Gillet 1962) (Pittendrigh, Skopik 1970) (Truman 1972a). Um experimento anterior havia indicado a presença de um "gate" circadiano no ritmo de oviposição dos colêmbolos. Nesse caso, a oviposição ocorre com periodicidade de 8 dias e, quando os ovos estão prontos para serem depositados, eles esperam a abertura de um "gate" de oviposição: essa abertura ocorre num estreito intervalo de 3 horas, voltando a se abrir, novamente, somente 24 horas depois. Se todos os ovos já estão prontos quando o "gate" se abre, eles são todos depositados nesse intervalo de tempo. Se, no entanto, somente alguns ovos estão prontos no momento da abertura, somente eles são depositados e os demais esperam o próximo "gate". Portanto, se a oviposição for do tipo "gated", a periodicidade do processo é de 8 dias, mas a ocorrência, em cada inseto, é registrada em picos discretos, separados por 24 horas, como mostrado na fig.4.1. Se não for do tipo "gated", o processo de formação dos ovos leva 8 dias, com a deposição, em cada inseto, registrada de forma contínua, ao longo do dia. A existência de um "gate" no ritmo de oviposição consistiria num circadiano (24 horas) acoplado a um infradiano (8 dias). Isso tornaria o experimento de PRC bastante interessante, pois verificaríamos o efeito do pulso tanto sobre o ciclo infradiano como sobre o circadiano: estaríamos verificando de que maneira o pulso atuaria, num sistema formado por dois osciladores acoplados.

No próximo capítulo, vamos apresentar a metodologia utilizada na parte experimental de nosso trabalho, e a análise estatística empregada na verificação da significância dos resultados. No capítulo 6, vamos discutir os resultados e apresentar as principais considerações que nortearam a construção do modelo, do ponto de vista da teoria dos osciladores, procurando

esclarecer a natureza dos ritmos observados e dos acoplamentos que possam existir no sistema.

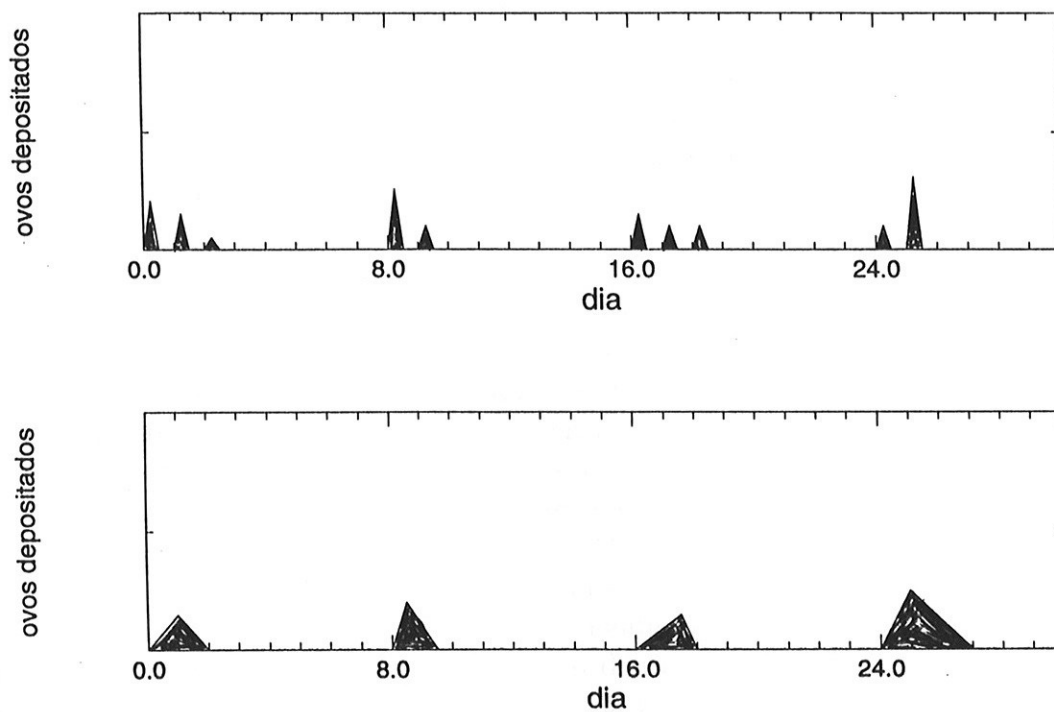


Figura 4.1: Comparação entre um ritmo de oviposição de periodicidade 8 dias, na presença e ausência de um "gate" circadiano. a) com "gate", a deposição de ovos é registrada em picos discretos separados entre si por 24 horas. b) sem "gate", a ocorrência é registrada de forma contínua

Capítulo 5

Parte Experimental

Inicialmente, apresentamos as principais recomendações e procedimentos na montagem de um protocolo experimental em cronobiologia. Em seguida, apresentamos uma descrição da metodologia empregada na nossa experiência, os resultados obtidos e a significância dos dados, avaliada através de testes estatísticos.

5.1 Metodologia de Investigação em Cronobiologia

A ocorrência de ritmos biológicos cobre toda a escala filogenética animal e vegetal. A pesquisa em cronobiologia progride com o acúmulo de evidências experimentais em diversas espécies. É necessário um mínimo de padronização que permita a comparação de resultados observados em diferentes espécies, em bases seguras. Por isso, existe uma série de recomendações que devem ser levadas em conta ao se proceder à elaboração de protocolos de experiências em cronobiologia.

Em cada experimento, devemos especificar a espécie, o sexo e a idade dos indivíduos a serem investigados. Devemos especificar, também, o tipo de ciclo de claro-escuro a que está sujeito o indivíduo: a duração da parte clara e escura, a intensidade e frequência da luz, a maneira, lenta ou abrupta, como se processa a alteração entre claro e escuro. As medidas devem ser sempre especificadas quanto à fase em que a observação é realizada em relação ao ciclo de claro-escuro.

Sincronizadores em potencial, como a temperatura, som, odores, umidade e disponibilidade alimentar precisam ser rigidamente controlados, para que não haja a superposição de sincronizações secundárias.

A coleta de dados deve ser efetuada em intervalos de tempo menores do que a periodicidade que se quer registrar, sendo recomendado, por exemplo, para o caso circadiano, uma observação a cada 4 horas. Recomenda-se também a verificação de pelo menos três ciclos completos para caracterizar os parâmetros essenciais do ritmo: o período, a amplitude e a acrofase (fase de maior amplitude da onda).

Estes procedimentos mínimos evitam que a mesma experiência apresente diferentes valores em diferentes laboratórios, pois uma das condições essenciais para a validação e confiabilidade de um experimento é que os resultados sejam reproduzíveis sob as mesmas condições (Reinberg, Smolensky 1983).

Devemos evitar expor o indivíduo a situações não-permissivas, como por exemplo luzes intensas, ou condições de temperatura e umidade muito abaixo ou acima daquelas do habitat natural da espécie em estudo. Devemos evitar, também, técnicas invasivas que possam mascarar os ritmos, alterando os resultados, ou seja, provocando o aparecimento artificial de frequências ou a amplificação da amplitude da forma da onda, provocados pelas respostas diretas dos organismos a fenômenos ambientais não usuais (Aschoff 1988).

Além de todos esses cuidados, ao se proceder a medidas em grupos de indivíduos, devemos sempre ter em conta diferenças inter-específicas, inter-individuais e intraindividuais nos parâmetros das oscilações (Pittendrigh, Daan 1976), sendo necessário uma adequada análise estatística para cada experimento cronobiológico.

5.1.1 Metodologia de Obtenção da Curva de Resposta de Fases

Além de todas as recomendações gerais na montagem de um protocolo experimental em cronobiologia, alguns procedimentos específicos devem ser realizados em experimentos que visam à construção de uma Curva de Resposta de Fases (PRC). Esses experimentos consistem na determinação da direção (atrasos ou adiantamentos) e intensidade dos deslocamentos de fase provocados por pulsos externos em um ritmo biológico.

É necessário estabelecer uma situação de livre-curso antes e depois da aplicação do pulso ao organismo. No início do experimento, portanto, quando o organismo é retirado do meio ambiente e submetido à situação controlada do laboratório, é preciso esperar a passagem de muitos ciclos para se estabilizar o livre-curso, extinguindo-se assim os pós-efeitos das condições ambientais anteriores.

Estabelecido o ritmo, é preciso registrar muitos ciclos em livre-curso para obter o período τ e as características gerais desse ritmo. Após atingida essa fase, são aplicados os pulsos. Após cada pulso, é preciso registrar muitos ciclos para detectar transientes. A metodologia desses registros consiste naquela adotada para o registro do livre-curso, descrita na seção anterior.

O resultado será uma PRC com pontos indicando, em cada fase, o deslocamento médio de fase provocado pelo pulso: essa média é resultante dos valores obtidos para cada inseto que levou o pulso na mesma fase. No caso ideal, cada inseto deve levar apenas um pulso e, como a idade influencia a resposta do indivíduo aos pulsos (Saunders 1982), todos os indivíduos precisam ter a mesma idade, no início da construção de uma PRC. Quando for necessário submeter um indivíduo a um novo pulso, é preciso esperar, antes, o estabelecimento de novo livre-curso. Se o tempo de vida do indivíduo, em relação ao tempo dos transientes, for muito curto, esse procedimento se inviabiliza. Para isso, é preciso ter acesso a uma grande quantidade de indivíduos, o que nem sempre é possível, mas a replicação dos pontos é essencial para uma boa estatística.

Além disso, é preciso especificar, para cada PRC, a intensidade e a duração do pulso, além de qualidades específicas da natureza de cada estímulo.

Definição das Fases

A determinação da fase do ciclo em que o pulso é aplicado precisa ser especificada, ao considerarmos que cada indivíduo apresenta ligeiras variações na periodicidade do seu ciclo.

Consideramos duas classificações, a fase absoluta e a fase relativa. Seja N o número de divisões de fase para o ciclo.

Ao adotarmos a fase absoluta, consideramos como unidade de fase o período médio do ciclo de todos os indivíduos dividido por N , $T_{\text{médio}}/N$. Dessa forma, independentemente do período médio de cada indivíduo, a fase

em que cai o pulso é considerada na unidade $T_{\text{médio}}/N$.

Ao adotarmos a fase relativa, utilizamos uma escala de fases diferente para cada indivíduo: dividimos o período médio de cada indivíduo por N e, dessa forma, indivíduos com periodicidades maiores têm unidades de fase maiores. A fase relativa em que cai o pulso é medida nesta nova unidade.

Essas diferenças estão mostradas na fig.5.1. Quando o pulso não é instantâneo, mas apresenta uma certa duração, consideramos a fase em que a metade do pulso cai, nas unidades de fase adotadas, como mostra a fig.5.1.

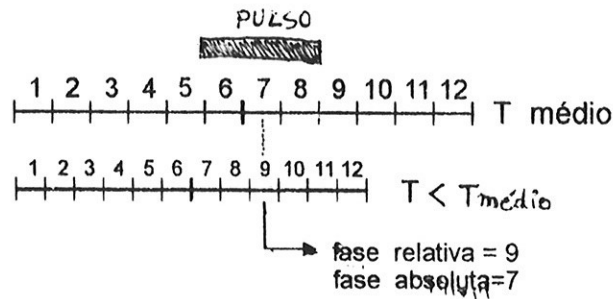


Figura 5.1: Fase relativa e fase absoluta, considerando, na figura superior, um ciclo médio, e na inferior, um ciclo de período anormalmente curto

Verificamos que as PRCs determinadas, separadamente, considerando as fases relativas ou absolutas não apresentavam diferenças significativas, sendo apresentados, aqui, as PRCs considerando fases absolutas.

5.2 A Obtenção Experimental da Curva de Resposta de Fases

A experiência consiste na construção de PRCs dos ciclos infradianos de muda cuticular e de oviposição dos colêmbolos, sob pulsos de temperatura. Numa primeira etapa, registramos esses ritmos em livre-curso, para caracterizar os seus períodos e as suas relações de fases. Submetemos grupos de insetos a pulsos de temperatura em fases diferentes de seus ciclos para, em seguida, retorná-los às condições iniciais, sob as quais continuamos o registro dos efeitos do pulso.

Verificamos as PRCs para três diferentes durações dos pulsos de temperatura (20°C para 25°C): 3h, 8h e 24h.

5.2.1 Materiais e Métodos

Espécie

O colêmbolo da espécie *Folsomia candida* (Collembola, Isotomidae) é um inseto que pode ser encontrado tanto em regiões profundas como próximo às entradas das cavernas. Vivem sobre solo arenoso e alimentam-se de fungos, sendo encontrados em cavernas do mundo todo. Têm cerca de 1mm de comprimento, são cegos e seus corpos são despigmentados (fig.5.2).

A espécie *Folsomia candida* apresenta uma série de características que favorecem a sua escolha num protocolo de experimento de PRC: reproduz-se facilmente, permitindo a obtenção de grandes quantidades de indivíduos da mesma geração, o que favorece uma eventual substituição em caso de morte; são todas fêmeas, reproduzindo-se por partenogênese, diminuindo, dessa forma, diferenças interindividuais; apresenta vida média de quatro meses, o que é apropriado para estas experiências que necessitam de pelo menos um mês de observação do inseto adulto.

A muda cuticular ou ecdise é a finalização do ciclo de renovação da cutícula tegumentar, que consiste na síntese e deposição de quitina sobre as células dérmicas; as lâminas de quitina agregam-se e moléculas de proteínas e outros compostos são incorporadas entre elas, formando a nova cutícula. Quando essa cutícula está completamente impermeabilizada, ocorre o desprendimento entre as duas e a cutícula velha é descartada. Descartada, essa cutícula ainda preserva todos os contornos do corpo do inseto, das antenas

às pernas. Para esse inseto, a muda ocorre com uma periodicidade de aproximadamente 4 dias.

Sendo a espécie partenogenética, a oviposição independe de fecundação. Os óvulos amadurecem por ação hormonal e os eventos de oviposição mostram um período de 8 dias.



Figura 5.2: Fotografia aumentada dos colêmbolos, com escala 1:20.

Condições Gerais

Insetos adultos da mesma geração foram depositados, individualmente, em pequenos recipientes de vidro de 5 cm de diâmetro, como mostrado na fig.5.3. Na primeira experiência, utilizamos 180 insetos e na segunda 240 insetos. Esses constituem os números iniciais dos insetos. Os vidros continham substrato de gesso e carvão (1:1) que era umedecido repetidamente com pincel, de modo a manter a umidade relativa muito alta (> 90%). O carvão é empregado para absorver gases liberados, além de proporcionar fundo preto, onde os insetos, as cutículas depositadas e os ovos, todos brancos, podem ser

5.2 A Obtenção Experimental da Curva de Resposta de Fases 60

mais facilmente localizados, por contraste. Sobre este substrato era renovada, a cada dois dias, uma gota de emulsão de fermento biológico, mantendo, assim, disponibilidade alimentar constante.

A temperatura era mantida constante em 20°C, através de ar condicionado. A variação devida ao pulso foi dentro da faixa suportável pelos insetos. Esses foram mantidos em escuro constante, pois seus corpos despigmentados estão completamente adaptados à sobrevivência em regiões afóticas. A umidade foi mantida dentro das condições ideais para o inseto e a textura do substrato garantia uma superfície porosa, que lhe permitia locomover-se apoiado nas garras das pernas (Fig.5.2). Cada inseto foi mantido em um recipiente de tamanho suficiente para garantir condição não estressante.



Figura 5.3: Insetos mantidos individualmente em frascos de vidro

Coleta de Dados

As observações eram feitas em janelas ou intervalos de 8 horas, sendo realizadas às 7h, 15h e 23h, diariamente. A cada janela correspondia um número.

As observações eram realizadas ao microscópio, sob luz infra-vermelha, verificando se, naquela janela, cada inseto tinha mudado de cutícula ou se tinha depositado ovos. Caso positivo, anotávamos, na lista de cada inseto, o número da janela em que havia sido observado o evento. Quando a oviposição ocorria em mais de uma janela seguida, considerávamos o número da primeira janela. Dessa forma, nossos dados de muda cuticular e de oviposição constituíram séries dos números das janelas em que foram detectados esses eventos, respectivamente, em cada inseto.

Trabalha-se, geralmente, com os valores assumidos por uma variável, em intervalos constantes de tempo, conhecendo-se, dessa forma, a amplitude e a forma de onda do ritmo. No nosso caso, temos acesso somente a eventos-marcos de um ciclo: cada evento indica o começo de um novo ciclo. Esses dados são, porém, suficientes para indicar os períodos e as relações de fases entre os eventos, informações suficientes para se trabalhar com PRCs.

Quando a muda ou a oviposição eram detectados, as cutículas ou ovos eram removidos após o registro.

Levando em conta o tempo de registro de livre-curso, os pulsos e os registros de seus efeitos, a construção de cada PRC implicou cerca de 40 dias de observação.

Pulso de Temperatura

A submissão ao pulso consistia em grupos de insetos, correspondentes a diferentes fases, serem colocados na estufa, à temperatura de 25°C e escuro constante. Depois de permanecer na estufa durante o tempo estabelecido, esses insetos eram retornados à temperatura constante inicial de 20°C, para continuação do registro.

Realizamos experiências com três diferentes pulsos de temperatura: 3h, 8h e 24h de duração, sendo sempre a alteração de 20°C para 25°C.

Na primeira experiência, utilizamos 110 insetos. Verificamos 4 ciclos completos de muda e submetemo-los ao pulso de 3 horas. Em seguida ao registro dos efeitos do pulso, deixando-os completar mais dois ciclos em condições constantes, submetemo-los ao pulso de 8 horas.

Na segunda experiência, utilizamos 180 insetos. Verificamos 6 ciclos completos de muda e submetemo-los ao pulso de 24 horas. Após o retorno às condições constantes, prosseguimos o registro de mais 5 ciclos de muda, correspondentes a 2 ciclos de oviposição.

5.2.2 Resultados

Características Gerais dos Ciclos

O ciclo de muda cuticular apresentou um período médio de 4 dias e o ciclo de oviposição um ciclo de 8 dias. Verificamos que o episódio de oviposição ocorria a cada dois episódios de muda cuticular, mantendo, em relação a este, uma diferença de fase constante de 16h. Chamamos "1ª muda" (M1) a muda seguida de oviposição e "2ª muda" (M2) ao ciclo sem oviposição, como mostrado na fig.5.4a.

Verificamos, também, a ocorrência casual (1%) de insetos que nunca depositavam ovos. Nesse caso, o ciclo de muda cuticular apresentava um período médio de 5 dias, conforme fig.5.4b.

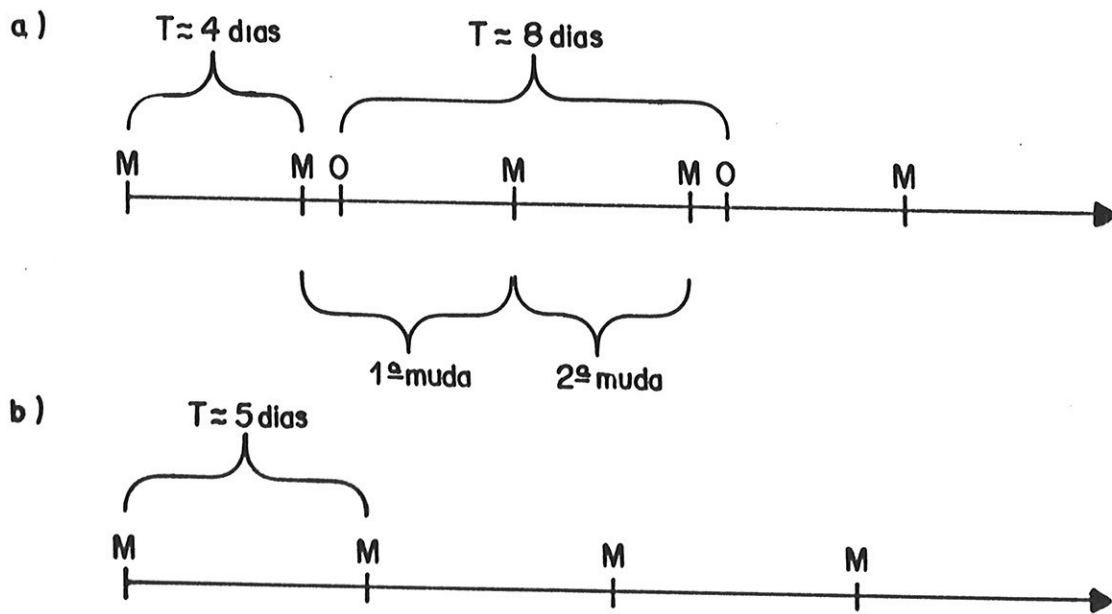


Figura 5.4: a) Ciclos de muda cuticular e de oviposição dos colêmbolos, especificando a primeira e a segunda mudas, em relação ao ciclo de oviposição. b) ciclo de muda cuticular em insetos que não apresentavam oviposição.

5.2 A Obtenção Experimental da Curva de Resposta de Fases 63

Na fig.5.5, apresentamos a ocorrência da muda cuticular e de oviposição dos insetos em livre curso, da segunda experiência.

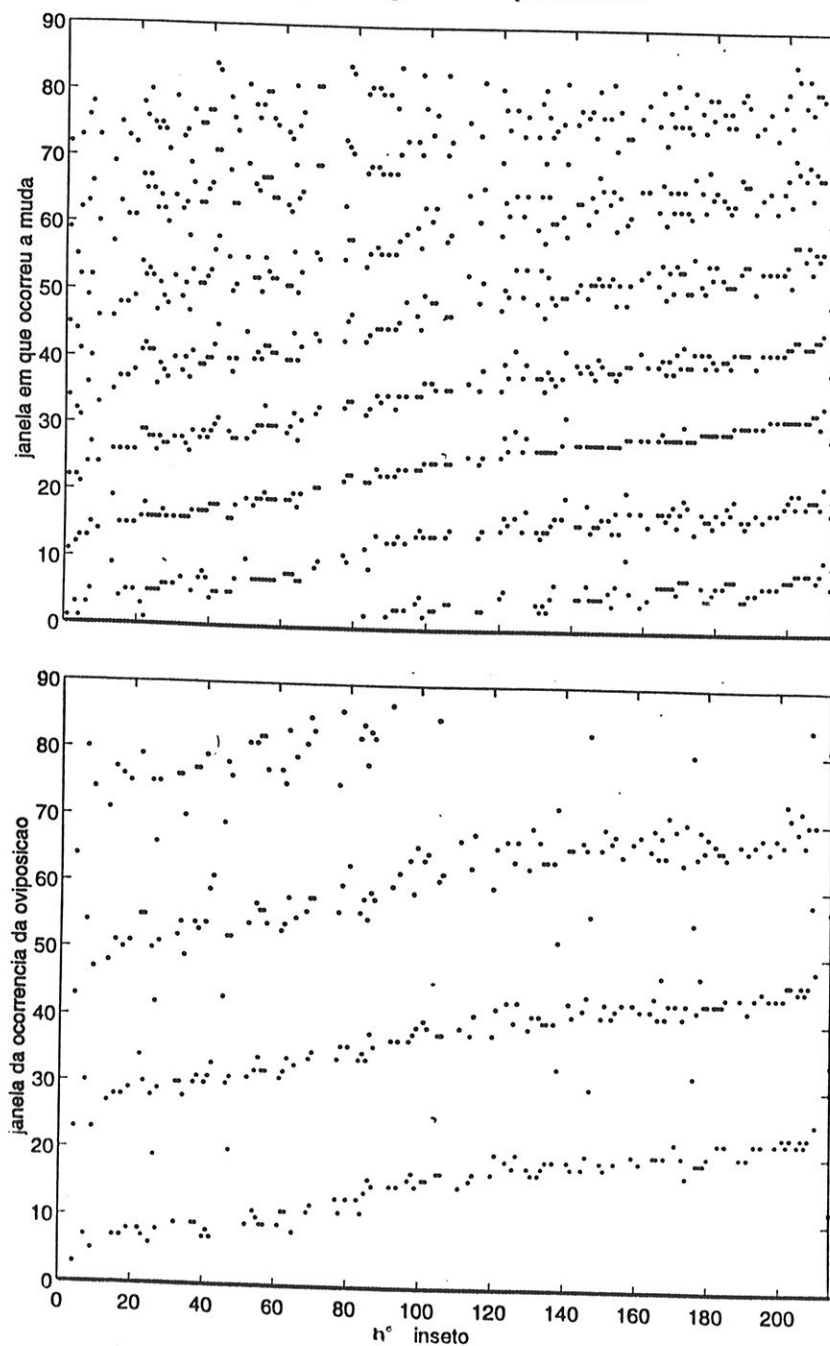


Figura 5.5: Ocorrência da a)muda cuticular e b)oviposição nos insetos em livre curso. Nas abscissas, estão indicados os insetos e nas ordenadas as janelas onde foram detectados os eventos

Verificação de “Gates”

Se a oviposição, com periodicidade de 8 dias, apresentasse um “gate” circadiano, ela ocorreria a cada 8 dias, mas num estreito horário preferencial do dia, sendo detectado um episódio residual no dia seguinte, naquele mesmo horário, como explicado no cap.4:

Observamos que o processo de oviposição estava acontecendo durante uma ou mais janelas seguidas de observação, sem horário preferencial. Considerando que cada janela correspondia a um intervalo de 8 horas, verificamos eventos de oviposição como os ilustrados na fig.4.1.b, levando-nos a descartar, desta forma, a possibilidade de haver “gate” acoplado ao ritmo de oviposição dos colêmbolos.

A ecdise também ocorria sem horário definido, ao longo do dia.

Determinação das Fases das PRCs

Resolvemos considerar separadamente uma PRC para M1 (1ª muda) e outra para M2 (2ª muda), com o objetivo de verificar diferenças.

Na primeira experiência, em que utilizamos pulsos de 3h e de 8h, tivemos no final 65 insetos divididos em 12 grupos. Cada grupo foi submetido ao pulso em uma das 6 fases em que foram divididos os ciclos de M1 e M2. O ciclo de oviposição, portanto, foi automaticamente dividido em 12 fases, como mostra a fig.5.6. As fases estão numerados de 2 em 2, pois na segunda experiência utilizamos algumas fases intermediárias.

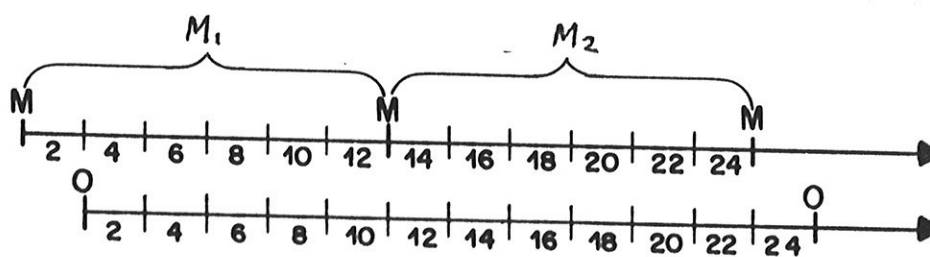


Figura 5.6: Determinação das fases da PRC

Na segunda experiência, em que utilizamos um pulso de 24h, tivemos, até o primeiro ciclo após o pulso, 180 insetos divididos em 12 grupos. O registro prosseguiu até o quinto ciclo de muda após o pulso, com um número cada vez menor de insetos sobreviventes.

5.2 A Obtenção Experimental da Curva de Resposta de Fases 65

A PRC é apresentada como T_f/T_m em função da fase Φ , como ilustrado na fig.5.7, sendo:

T_f : período do ciclo submetido ao pulso: tempo entre o último evento de muda ou oviposição antes de levar o pulso e o primeiro evento depois do pulso;

T_m : média dos períodos dos ciclos em livre-curso medidos antes do pulso, sob condições constantes.

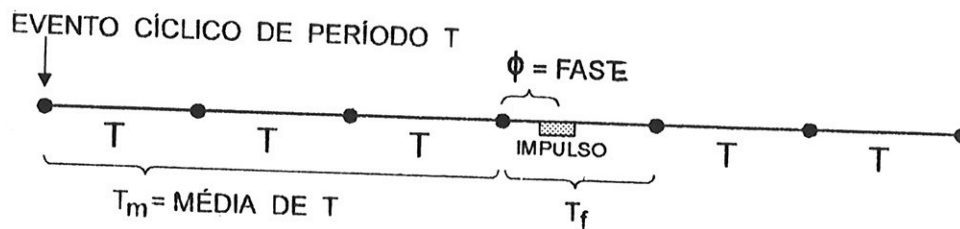


Figura 5.7: T_m e T_f , que definem a PRC

Características Gerais das PRCs

As PRCs assim obtidas apresentam, basicamente, atrasos de fase $T/T_m > 1$.

As PRCs de muda cuticular e de oviposição com pulsos de 3h e 8h apresentam valores muito próximos à linha $T/T_m = 1$, que corresponde a não haver nenhum efeito do pulso.

As PRCs de muda cuticular e de oviposição com pulso de 24h, por outro lado, exibem claras dependências de fase.

Na fig.5.8, apresentamos as PRCs de muda cuticular de 3h, 8h e 24. As fases consideradas são as absolutas.

Na fig.5.9, apresentamos as PRCs de oviposição de 3h e 24h.

5.2 A Obtenção Experimental da Curva de Resposta de Fases 66

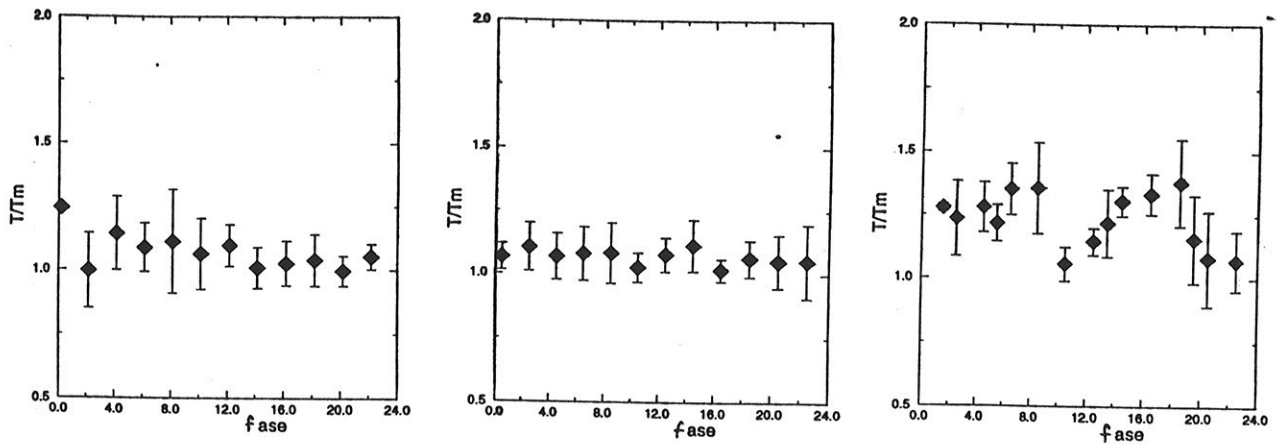


Figura 5.8: Resultados das PRC de muda cuticular: as abscissas correspondem às fases absolutas em que os insetos receberam o pulso (20°C a 25°C) e as ordenadas correspondem aos valores médios de T/T_m . a) pulso de 3h. b) pulso de 8h. c) pulso de 24h.

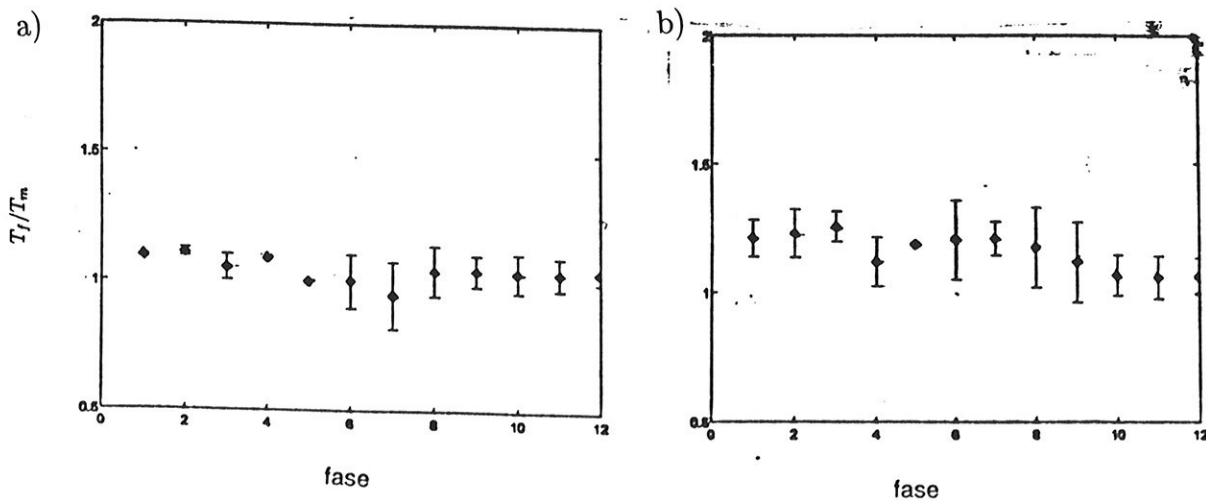


Figura 5.9: Resultados das PRC de oviposição: as abscissas correspondem às fases absolutas em que os insetos receberam o pulso (20°C a 25°C) e as ordenadas correspondem aos valores médios de T_i/T_m . a) pulso de 3h. b) pulso de 24h.

Características Gerais da Curva de Adiantamentos/Atrasos

Apesar das PRCs apresentarem somente atrasos de fase ($T/T_m > 1$), esse fato reflete os valores médios dos resultados obtidos sobre muitos insetos, não ocorrendo atrasos para alguns deles. O valor médio, muitas vezes, encobre valores aberrantes menos freqüentes, cuja ocorrência precisa ser considerada. No nosso caso, gostaríamos de saber em que grau adiantamentos de fase ($T/T_m < 1$) também ocorreram, sendo encobertos pela maioria que se atrasou.

Em cada fase, contamos o número de insetos que se adiantaram e que se atrasaram. Fizemos gráficos de Nad/Nat (Número de adiantamentos/ Número de atrasos) em função da fase, os quais estão apresentados nas figs.5.10 e 5.11.

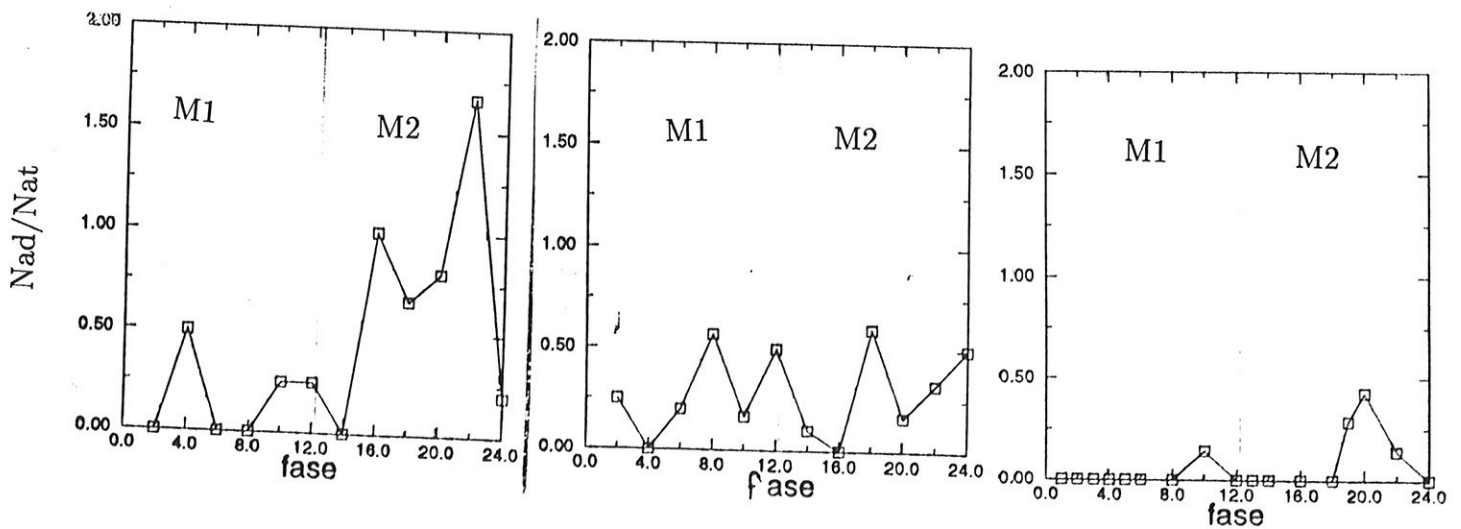


Figura 5.10: (Número de adiantamentos)/(Número de atrasos) em cada fase da muda a)PRC de 3h. b)PRC de 8h. c)PRC de 24h.

5.2 A Obtenção Experimental da Curva de Resposta de Fases 68

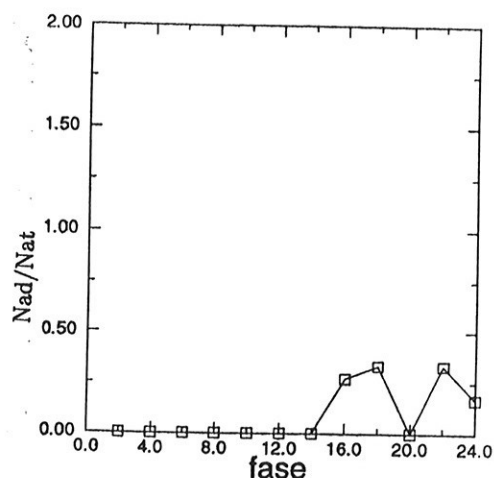


Figura 5.11: (Número de adiantamentos)/(Número de atrasos) em cada fase da PRC de oviposição, pulso de 24h.

Na curva Nad/Nat de muda do pulso de 3h, verificamos um ténue aumento do número de adiantamentos em M2, em relação a M1.

Na curva Nad/Nat de muda do pulso de 8h, aparentemente não verificamos nenhuma dependência significativa dos resultados com a fase.

Na curva Nad/Nat de muda do pulso de 24h, verificamos claros picos de ocorrência de adiantamentos nas fases finais de cada ciclo de muda, sendo mais intenso em M2 do que em M1. Também notamos a ausência completa de adiantamentos nas primeiras fases de cada ciclo. A curva ad/at de oviposição apresenta, também, picos de adiantamento nas últimas fases e ausência nas primeiras, explicitando mais uma vez a semelhança com a forma básica da curva da muda.

Apesar de ténue, a tendência observada na curva de 3h está de acordo com a curva de 24h.

Verificamos, nessas duas curvas, uma clara diferença entre os comportamentos de M1 e M2, diferença esta que não era tão clara nas formas das PRCs baseadas nos valores de T/Tm.

Ressaltamos que as figuras foram apresentadas na mesma escala, para efeito de comparação entre as curvas. Verificamos uma diminuição geral do número de adiantamentos, se observarmos, na ordem, as curvas de 3h, 8h para 24h.

5.3 Análise Estatística

5.3.1 Teste de Normalidade

Primeiramente, examinamos a distribuição das observações efetuadas, para orientar na escolha dos métodos estatísticos a serem utilizados. Os testes mostraram que o conjunto dos resultados observados em cada uma das PRCs de muda cuticular apresentava uma distribuição normal, possibilitando o uso de métodos paramétricos de bioestatística como o ANOVA (Zar 1996).

Os resultados estão apresentados na fig.5.12

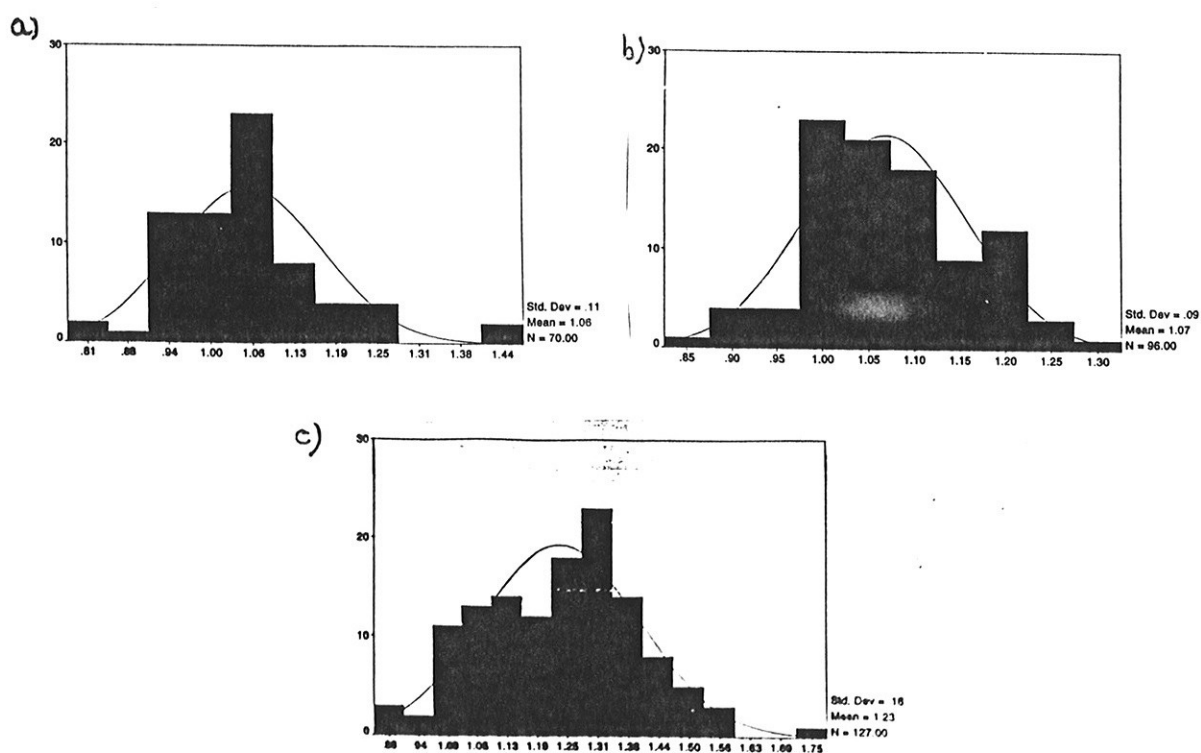


Figura 5.12: Comparação da distribuição do conjunto de resultados obtidos com curvas de distribuições normais em cada uma das PRCs. a)PRC 3h. b)PRC 8h. c)PRC24h

5.3.2 Verificação de Dependência de Fase dos Resultados

Verificação com base nos valores T/T_m

Apesar do pulso de 24h provocar efeitos com clara dependência de fase, os efeitos dos pulsos de 3h e de 8h são aparentemente difíceis de serem distinguidos de flutuações decorrentes de diferenças interindividuais.

Para verificar formalmente a dependência de fase dos resultados, utilizamos o método **one-factor ANOVA**, em que consideramos como variável dependente T/T_m e o fator como a fase. Adotamos como limite de confiabilidade $\alpha = 0,05$, ou seja, consideramos dependência significativa do fator para resultados com o valor da probabilidade $P < 0,05$ (Testes de dependência de fases trabalham com a hipótese de que os dados não apresentam essa dependência: se o resultado for associado a uma probabilidade $P < 0,05$, então a sua ocorrência é tão pouco provável que podemos descartar a hipótese inicial) (Zar 1996). Os resultados da muda estão esquematizados na Tabela 1 e da oviposição de 24h na Tabela 2:

Muda Cuticular		
Pulso	ANOVA	Kruskall Wallis
3h	$0,1 < P < 0,25$	$0,25 < P < 0,5$
8h	$0,25 < P$	$0,5 < P < 0,75$
24h	$P < 0,0005$	$0,005 < P < 0,01$

Oviposição		
Pulso	ANOVA	Kruskall Wallis
24h	$0,01 < P < 0,025$	$0,01 < P < 0,025$

Tabela 5.1: Resultados dos testes de verificação de dependência de fases da curva, com base nos valores de T/T_m

Os resultados apontaram variações dos valores de T/T_m decorrentes de flutuações nas experiências de 3h e de 8h: dessa forma, a conclusão aponta não haver diferenças significativas entre as fases. Por outro lado, a dependência de fase da curva de muda e oviposição com pulsos de 24h foram confirmadas.

O método **Kruskall-Wallis** (Zar 1996), um pouco menos preciso do que o método ANOVA, confirmou as mesmas conclusões.

Na ausência de uma dependência global dos resultados de 3h e 8h com as fases, realizamos testes múltiplos entre as fases: verificamos se havia diferença entre: fase1 e fase2, fase1 e fase3, fase2 e fase3, e assim por diante. O teste utilizado foi o **Mann-Whitney** (Zar 1996), o qual verifica, para dois conjuntos de dados, a possibilidade de ambos terem sido coletados de uma mesma população. Esse teste detectou diferença significativa apenas entre os pares de fases mais extremos das curvas de 3h e 8h, fases estas que serão descritas mais adiante, quando apresentarmos o teste de Fisher.

Dessa forma, apesar de não termos detectado dependência de fase global nos valores de T/T_m das PRCs com pulsos de 3h e 8h, a diferença significativa, em pelo menos duas fases extremas, constitui um indicativo mínimo de dependência de fase.

Verificação com base nos valores de adiantamentos/atrasos

Consideramos, como alternativa à verificação da dependência de fases, a utilização dos valores de adiantamentos e atrasos obtidos em cada fase.

Temos os seguintes valores das diversas experiências, apresentados em forma de tabela de contingência:

muda 3h											
fase	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Nad	0	1	0	0	1	1	0	3	4	4	5
Nat	1	2	6	4	4	4	3	3	5	5	3

muda 8h											
fase	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Nad	1	0	2	4	1	2	1	0	3	1	2
Nat	4	9	10	7	6	4	10	4	3	5	6

muda 24h											
fase	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Nad	0	0	0	0	1	0	0	0	0	5	1
Nat	11	12	16	5	7	4	16	10	12	14	7

Tabela 5.2: Tabelas de contingência com o número de atrasos e de adiantamentos verificados em cada fase para mudas, com pulsos de 3h, 8h e 24h.

Diferentemente da seção anterior, em que tínhamos, para cada fase, os valores de T/T_m obtidos para grupos de insetos, desta vez temos, para cada fase, Número de atrasos e Número de adiantamentos. Um teste similar ao ANOVA, para verificação de dependência global de fases, para o caso de tabelas, é o teste **Chi-Quadrado** (Zar 1996). Esse teste verificaria a dependência de fase das relações obtidas entre os valores de adiantamentos e atrasos.

A utilização do teste Chi-Quadrado, no entanto, requer certas condições que não são observadas nos nossos dados: nenhum valor na cela deve ser menor do que 1 e não mais que 20% dos valores das celas deve ser menor do que 5. Estas são condições para se evitar viés no teste.

Sem outros recursos, portanto, para verificar dependências globais de fase, recorreremos a métodos de verificação localizados de diferenças entre fases, da mesma forma como utilizamos o teste Mann-Whitney na seção anterior. O correspondente para dados em forma de tabela é o teste exato de Fisher (Zar 1996).

O teste exato de Fisher foi utilizado para verificar dependência de fase entre os valores extremos observados: aquelas fases que apresentaram a maior e a menor relação entre adiantamentos e atrasos. Verificamos, inicialmente, na fig.5.13, as posições das fases extremas.

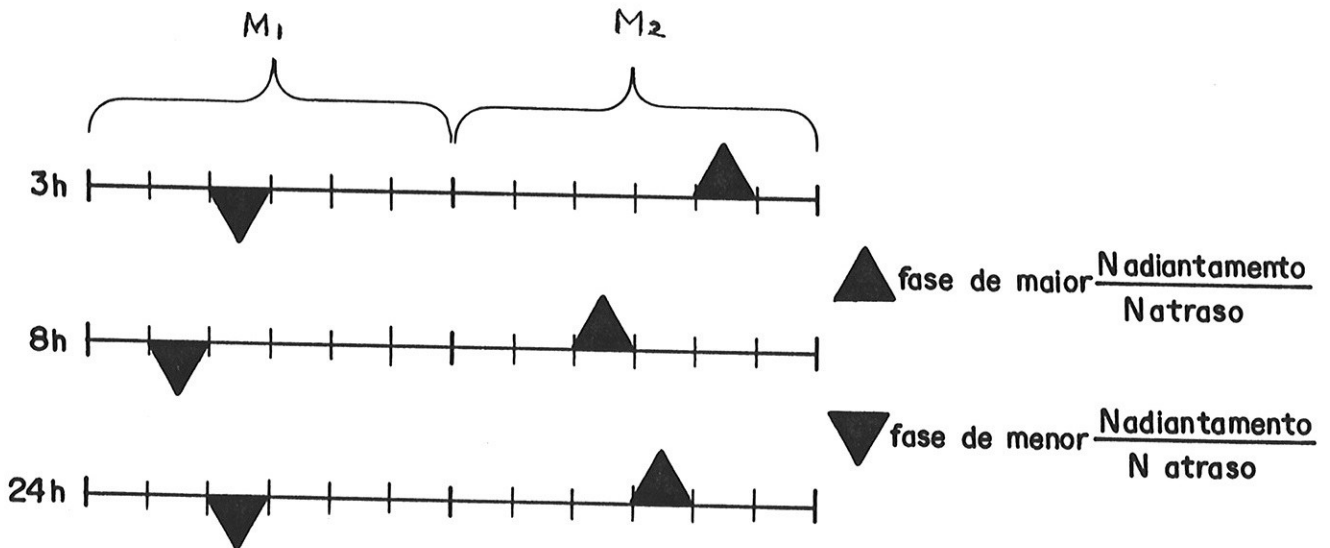


Figura 5.13: Fases Extremas das curvas de muda 3h, 8h e 24h

Em todas essas figuras, verificamos que a fase de menor adiantamento ocorre em M1 e a fase de maior adiantamento ocorre em M2.

Na avaliação do teste, consideramos novamente $\alpha = 0,05$, sendo consideradas fases significativamente diferentes a partir de $F < 0,05$ (F é a

estatística desse teste e corresponde diretamente ao valor de P). O teste exato de Fisher aponta diferença significativa entre todos esses pares de extremos, confirmando os resultados do teste de Mann Whitney, que já os havia detectado com base nos valores T/T_m .

Avaliação entre fases extremas da 1ª e 2ª muda			
Pulso	3h	8h	24h
F	0,027	0,044	0,035

Tabela 5.3: Resultados dos testes de verificação de diferença significativa entre as fases extremas dos ciclos de muda. Os valores de F satisfazem a condição $F < 0,05$.

O teste foi realizado, também, para verificar a dependência de fase entre as fases extremas dentro de cada muda, como apresentado na fig.5.14.

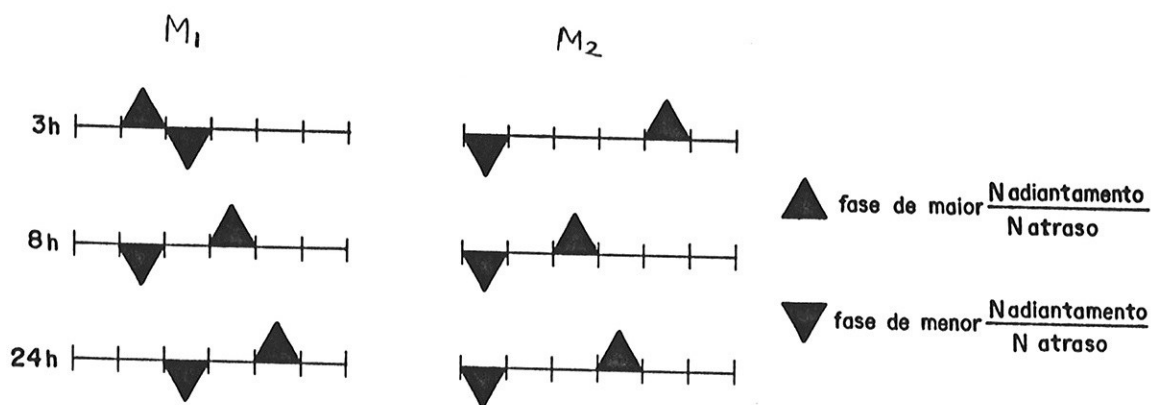


Figura 5.14: Fases extremas das curvas de muda 3h, 8h e 24h, considerando separadamente M_1 e M_2 .

Verificamos, inicialmente que, com a exceção de M_1 da curva de 3h, todas as fases extremas mínimas de adiantamento localizam-se à esquerda (fase anterior) relativamente às fases de extremos adiantamentos.

O teste exato de Fisher forneceu um resultado significativo apenas entre as fases extremas apresentadas por M2 da curva de 24h ($F = 0,036$). O teste Mann Whitney tinha apresentado diferença significativa, também, entre as fases extremas de M2 de 8h.

Apesar da clara significância dos resultados, quando a comparação da proporção de adiantamentos era feita entre as fases extremas dos ciclos M1 e M2, essa significância tornou-se mais difícil de detectar, ao considerarmos as fases extremas dentro de M1 e M2, separadamente.

5.3.3 Verificação de Dependência de Fase considerando o Grau de Adiantamento

O teste **One Sample Wilcoxon** (Zar 1996) foi utilizado para verificar o grau de ocorrência de adiantamentos nas várias fases. Esse teste verifica se a mediana de um conjunto de dados é maior ou menor do que certo limiar.

Agrupamos todos os valores de Nad/Nat das fases da 1ª muda e da 2ª muda, comparando, desta forma, o grau de ocorrência dos adiantamentos em cada muda.

Considerando $Nad/Nat = 1/2$ como referência, obtivemos:

Grau de ocorrência de adiantamentos na 1ª e 2ª muda						
Pulso	3h		8h		24h	
muda	1ª	2ª	1ª	2ª	1ª	2ª
Resultado	$M < 0,5$	$M > 0,5$	$M < 0,5$	$M < 0,5$	$M < 0,5$	$M < 0,5$

Tabela 5.4: Resultados do Teste One-Sample Wilcoxon de verificação do Grau de ocorrência de adiantamentos, nos ciclos de muda. Indicados os valores da mediana M.

Verificamos, assim, que na 2ª muda da curva de 3h, temos mediana superior a 0,5, correspondendo às fases de maior ocorrência de adiantamentos. Esse fato está de acordo com o comportamento geral observado na fig.5.10.

5.3.4 Verificação de Diferenças entre M1 e M2

Utilizamos o teste **Two Factor ANOVA** (Zar 1996) para verificar diferenças significativas entre as curvas da 1ª e 2ª mudas, com base nos valores

de T/T_m , dos resultados do pulso de 24h.

Verificamos uma diferença significativa entre essas curvas ($0,005 < P < 0,01$), apesar dessa diferença não ser tão fácil de se verificar a olho nu, como era o caso da diferença mais explícita dos atrasos e adiantamentos.

5.3.5 Verificação de Transientes

Utilizamos novamente o teste **Two Factor ANOVA** para verificar a existência de transientes no efeito do pulso de 24 horas sobre o ciclo de muda cuticular, do qual registramos mais cinco ciclos completos após a tomada do pulso.

O número de insetos, porém, foi diminuindo muito, de modo que após o segundo ciclo, a tendência observada já era de dispersão da PRC, devido às flutuações interindividuais. Apresentamos, portanto, somente as curvas obtidas considerando os três ciclos de muda após o pulso, na fig.5.15.

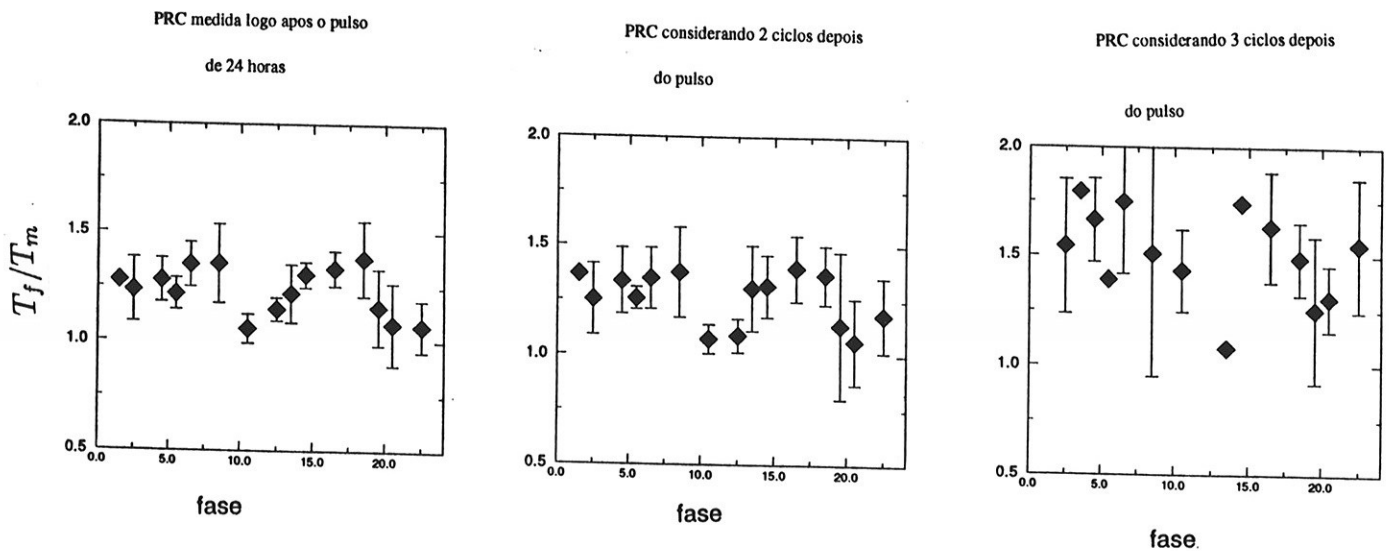


Figura 5.15: PRCs considerando os três primeiros ciclos de muda após o pulso

O teste não forneceu diferença significativa entre as curvas, demonstrando não ter ocorrido efeito transiente do pulso de 24h sobre o ciclo de muda cuticular.

Realizamos a construção de três PRCs, com pulsos de temperatura ($20^{\circ} \rightarrow 25^{\circ}$) com diferentes durações: 3h, 8h e 24h. Todas as curvas apresentaram atrasos de fase. O teste ANOVA e Kruskal-Wallis detectaram dependência significativa de fases somente para as PRCs de muda ($P < 0,0005$) e de oviposição ($0,01 < P < 0,025$) com pulso de 24h. Testes múltiplos entre fases conseguiram detectar diferença significativa dos atrasos observados nas fases extremas (aquelas que apresentaram o maior e menor atraso), nas PRCs com pulsos de 3h e 8h. Essas diferenças constituíram um indicativo mínimo de dependência de fase nas curvas obtidas com pulsos de 3h e 8h.

Apesar das PRCs apresentarem somente atrasos de fase, esse fato refletiu os valores médios dos resultados obtidos sobre muitos insetos, não ocorrendo atrasos para alguns deles. O número de insetos que se adiantaram mostrou-se claramente dependente da fase, como verificamos através dos gráficos apresentados e através da significância dos mesmos, medida pelo teste Exato de Fisher.

Verificamos, além disso, diferenças significativas entre as PRCs de M1 e M2, tanto com base nos valores de T/T_m como nos valores de N_{ad}/N_{at} . Por outro lado, PRCs transientes não demonstraram diferenças significativas.

Apresentamos, neste capítulo, os resultados experimentais obtidos e a análise estatística realizada. No capítulo seguinte, retomaremos esses resultados na discussão de suas principais implicações.

Capítulo 6

Discussão dos Resultados e Modelo

Vamos apresentar os principais aspectos observados no sistema analisado, destacando as suas peculiaridades e, em seguida, as considerações que nortearam a elaboração do modelo, proposto neste capítulo, para os ritmos infradianos dos insetos cavernícolas.

6.1 Principais Aspectos Observados

Os pulsos de temperatura provocaram somente atrasos de fases, tanto nos ciclos de muda como nos de oviposição. A magnitude desses atrasos era dependente da fase, sendo essa dependência similar em ambos os ciclos. É muito difícil encontrar, na literatura, Curvas de Resposta de Fases (PRC) que tenham essa característica pois, como vimos, a maioria delas apresenta atrasos e adiantamentos, tendo essa propriedade um papel central num oscilador que funcione como um relógio biológico (Pittendrigh e Daan 1976).

Uma possível causa desses resultados é a natureza do pulso que empregamos para obter os deslocamentos de fase: utilizamos pulsos de temperatura e alguns dos poucos relatos na literatura de PRCs, com apenas atrasos de fase, foram obtidos com pulsos de temperatura. Isso não constitui regra geral, no entanto, pois pulsos de temperatura também podem provocar atrasos e adiantamentos. Vamos tratar deste aspecto na seção 6.2.

Não foram detectados transientes nos deslocamentos de fases observados.

Como a ação de "zeitgebers" ocorre de forma instantânea num oscilador, a presença de ciclos transientes decorrentes de uma perturbação externa são identificados com um processo envolvendo controle de um ritmo por um oscilador subjacente. Vamos tratar deste aspecto na seção 6.3

O efeito do pulso de temperatura foi claramente diferente entre os ciclos de muda M1 e M2 (1ª muda e 2ª muda, respectivamente, seguidas e não por oviposição). Esse fato é notório pois, quando o ritmo de muda cuticular é visto isoladamente, não há diferença entre M1 e M2, uma vez que os insetos não sofrem metamorfose e já atingiram o estado adulto, tendo sido essa distinção feita para caracterizar a muda seguida ou não por oviposição. Geralmente, uma PRC de um ritmo é construída sem se levar em conta outros ritmos, no mesmo organismo. Diferentes resultados de PRCs em M1 e M2 chamam a atenção para o cuidado que se precisa ter, ao considerarmos um ritmo, com a possível influência de outros ritmos acoplados. Os ritmos infradianos de muda cuticular e de oviposição devem estar acoplados, de acordo com observações feitas neste trabalho: a relação de fases é constante entre eles (16h); a periodicidade da muda cuticular naqueles poucos insetos que não apresentam oviposição é maior do que nos demais. Vamos tratar deste aspecto na seção 6.3

6.2 Considerações sobre a Natureza do Pulso

As principais propriedades dos deslocamentos de fase em osciladores biológicos apresentadas no cap.3 baseiam-se, fundamentalmente, nos resultados obtidos em experiências de PRC com estímulos de luz. Como nós utilizamos pulsos de temperatura na construção das PRCs, apresentamos algumas considerações sobre a natureza do pulso que provoca deslocamentos de fase nos ritmos e, em particular, sobre o pulso de temperatura.

Existe uma grande diversidade de estímulos capazes de provocar deslocamentos de fase nos osciladores biológicos circadianos. Pesquisas recentes têm procurado verificar a dependência das respostas dos osciladores a estímulos de diferentes naturezas (Mrosovsky 1995)(Ralph 1992)(Smith 1992).

O trabalho mais completo, nesse sentido, foi realizado com hamsters, num levantamento das PRCs registradas sobre o ciclo circadiano de atividades desses animais, empregando mais de 20 estímulos diferentes (Smith 1992). Foi verificado que a grande maioria dos estímulos encaixava-se em dois grupos,

o grupo dos estímulos fóticos (que produziam PRCs semelhantes à da luz) e o grupo dos não-fóticos. O parâmetro utilizado para essa classificação foi, em cada PRC, a fase de máximo deslocamento negativo e a fase de transição dos deslocamentos positivos e negativos. As diferentes PRCs de um mesmo grupo tinham esses parâmetros muito próximos. Mais surpreendentemente, a diferença de fase entre esses parâmetros, para os dois grupos, era de 11-13 horas (180°), como mostrado na fig.6.1.

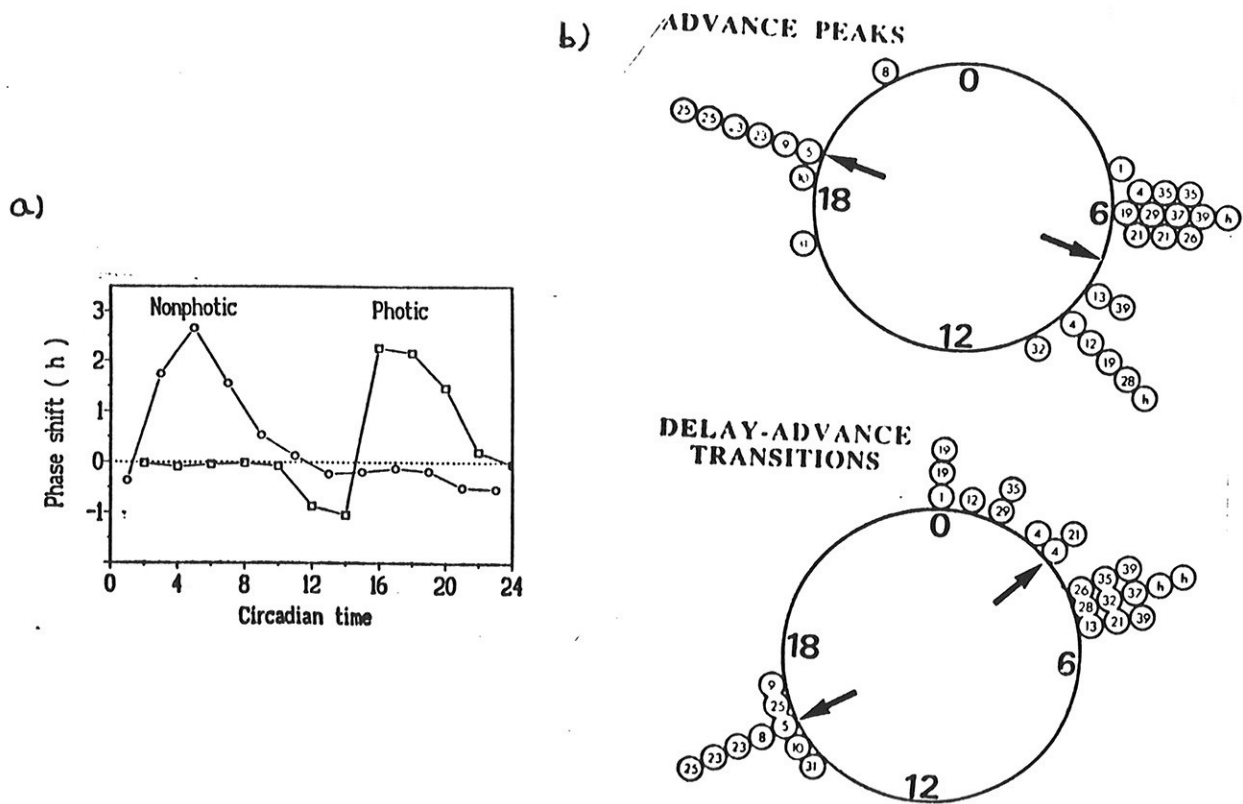


Figura 6.1: Efeitos de estímulos fóticos e não-fóticos. a) Típicas PRCs dos dois grupos de estímulos, extraído de (Takahashi et al 1984). b) análise gráfica do agrupamento das fases de máximo deslocamento negativo (acima) e transição de atraso para adiantamento (abaixo), para 29 PRCs. A posição angular corresponde à hora correspondente a essas fases nas várias PRCs, sendo cada número correspondente ao autor de cada PRC, listado em (Smith 1992).

Esses resultados, somados a evidências anatômicas (Smith 1992), têm sugerido fortemente a existência de dois caminhos ou mecanismos que mediam os efeitos de deslocamentos de fase provocados pelos diversos estímulos, em osciladores circadianos de hamsters.

Sugerindo os caminhos do processo de sincronização, as PRCs fornecem, desse modo, fortes pistas na elucidação da organização do relógio, nas diferentes espécies.

Estímulos de Temperatura

Sincronizações do relógio biológico por ciclos de temperatura têm sido observadas em plantas e animais **pecilotermos**. Esses são animais que regulam sua temperatura de acordo com a temperatura ambiental e entre eles se enquadram os insetos. Aves e mamíferos são os únicos seres capazes de manter regulada a temperatura do corpo, independente da temperatura ambiente, e são chamados homeotérmicos. O levantamento das PRCs de hamsters, para diferentes estímulos, relatado na seção anterior, não incluiu o estímulo de temperatura, por se tratar de homeotermos.

Em pecilotermos, foram verificadas a capacidade de ciclos de temperatura sincronizarem os ritmos, em escuro constante (Roberts 1962)(Beck 1980) e a influência conjunta de ciclos de luz e de temperatura, variando a relação de fases desses dois ciclos: apesar de ambos os “zeitgebers” atuarem sobre o oscilador, o ciclo de luz tende a ser dominante nesses experimentos, indicando o que ocorre, provavelmente, na natureza (Pittendrigh 1958).

Nos colêmbolos cavernícolas *Folsomia candida*, já foram verificados que pulsos de temperatura com periodicidades diferentes causam efeitos diferentes na sobrevivência e longevidade dos insetos (Marques et al, 1987).

O mapeamento da atuação da temperatura sobre o relógio é menos conhecido, por não haver uma evidência anatômica (como no caso da luz, que passa inicialmente por um fotorreceptor (Page 1985)) nem evidências das bases bioquímicas (Goldbeter 1996) de um canal de ligação específico ao oscilador. Os deslocamentos de fase poderiam ser resultantes da ação direta da temperatura sobre o oscilador, como no caso da luz, ou da reação generalizada do organismo diante da mudança de temperatura, como esquematizado na fig.6.2.

A verificação de que a temperatura modificava diretamente a fase do oscilador foi realizada em baratas (*Leucophaea maderae*). Nesses insetos, sabe-se

que o oscilador que controla o ritmo de atividade está localizado nos lóbulos ópticos. Um lóbulo óptico teve suas ligações cortadas, ficando neuralmente isolado. A seguir, técnicas de esfriamento localizado foram aplicadas, separadamente, no lóbulo intacto, no lóbulo cortado e na região mediana do cérebro, longe dos lóbulos. O deslocamento de fase ocorreu somente no primeiro caso, comprovando a ação direta da temperatura sobre o oscilador (Page 1981).

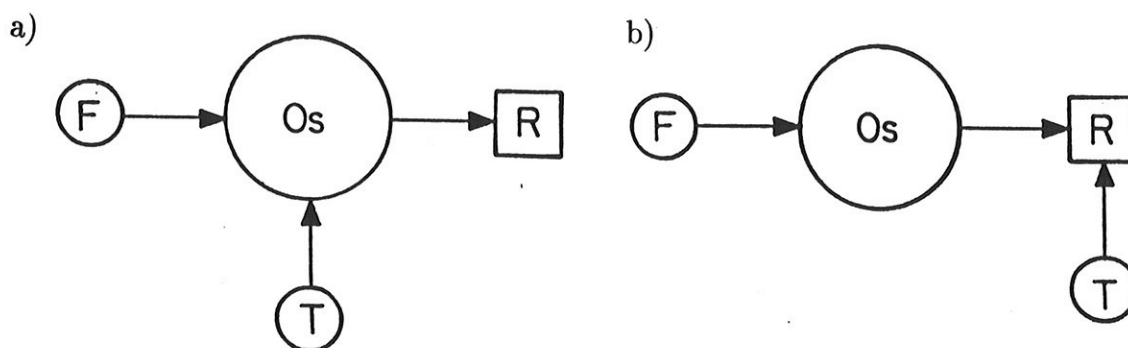


Figura 6.2: Duas possibilidades de atuação da temperatura, com deslocamento de fase: a) atuação direta no oscilador b) atuação direta no ritmo

Como os colêmbolos são cegos e apresentam regressão dos lóbulos ópticos, não havia sentido em se realizar um teste semelhante com eles. Dessa forma, os insetos foram mantidos na estufa, submetendo-os, integralmente, à mudança de temperatura. Os deslocamentos de fase obtidos, porém, consistem apenas em atrasos, sendo as PRCs do Tipo 1. Uma das possibilidades dessa característica observada pode estar no fato de termos utilizado pulsos de temperatura.

Alguns trabalhos têm registrado PRCs com pulsos de temperatura com apenas atrasos de fase (Roberts 1962)(Wiedemann 1977a). No trabalho de Roberts, foram verificados efeitos diferentes, para o mesmo ritmo de atividades da barata (*Leucophaea maderae*), com a aplicação de pulsos de luz e de temperatura: pulsos de luz produziam atrasos e adiantamentos; pulsos de temperatura produziam somente atrasos de fase. Além disso, pulsos de temperatura provocavam deslocamentos de fase grandes em fases insensíveis à luz, sugerindo um mecanismo diferente da ação da temperatura em relação à da luz.

Por outro lado, existem muitos outros relatos que indicam uma ação da temperatura sobre o relógio, semelhante à da luz.

Um trabalho bastante conhecido de PRC por pulsos de temperatura foi realizado com o ritmo de eclosão da mosca (*Drosophila pseudoobscura*), em escuro constante (Zimmermann 1968). O oscilador foi submetido a degraus positivos e negativos de variação da temperatura (aumento ou diminuição, respectivamente, de uma temperatura constante para outra constante) nas várias fases de um ciclo. Foi verificado que o deslocamento de fase ocorria logo nos momentos da mudança de temperatura, sugerindo um efeito discreto do tipo não-paramétrico semelhante ao da luz. Degraus positivos geravam adiantamentos em todas as fases e degraus negativos geravam sempre atrasos. Em outros organismos, foram observados efeitos exatamente opostos (Dreising e Nielsen 1971) mas, de qualquer maneira, a direção do deslocamento de fase (adiantamento ou atraso) parece ser determinada, num organismo, pela direção da variação de temperatura. Por outro lado, quando pulsos finitos de temperatura, nesse trabalho, eram aplicados ao oscilador, ao invés de degraus, os deslocamentos resultantes consistiam em adiantamentos ou atrasos, dependendo da fase, sendo o pulso finito interpretado como um degrau positivo seguido por um degrau negativo. PRCs com adiantamentos e atrasos de fase, provocados por pulsos de temperatura, são citados em Hastings et al (1991).

Foi observado no trabalho de Zimmermann, também, que pulsos com aumento de temperatura causavam exatamente deslocamentos opostos a pulsos com diminuição de temperatura, nas diversas fases: na fase em que o aumento de temperatura causava um atraso, a diminuição da mesma causava adiantamento e vice-versa. Pulsos de luz submetidos a organismos mantidos em escuro constante produzem deslocamentos de fase também opostos a pulsos de escuro submetidos a organismos mantidos em claro constante. Existem, portanto, muitas semelhanças nos efeitos observados por estímulos de luz e de temperatura.

O principal indicativo, porém, de que a causa dos atrasos de fase observados na nossa experiência não seja a natureza do estímulo, é a verificação de PRCs do Tipo 0 provocados por pulsos de temperatura, em outras experiências (Winfrey 1980) (Lindberg e Hayden 1974). Buscamos, portanto, as causas da obtenção apenas de PRCs do Tipo 1 na própria natureza do oscilador subjacente aos ritmos infradianos dos colêmbolos.

6.3 Discriminação do Oscilador através de uma PRC

A PRC constitui um instrumento de discriminação do oscilador subjacente, quanto às suas dimensões (Lakin-Thomas 1995). A dimensão corresponde ao número de variáveis dinâmicas necessárias para a representação de um sistema físico e determina os tipos de PRCs que podem resultar de perturbações externas.

Sistemas Multidimensionais

As trajetórias do pêndulo e do ciclo-limite enquadram-se na mesma classificação de oscilador, do ponto de vista da dimensão: ambos são representados por duas variáveis (por exemplo, fase e velocidade angular) e são chamados **relógios não-simples**. Esses sistemas multidimensionais, dos quais trataremos do caso de sistemas com duas dimensões, respondem a perturbações externas com PRCs do Tipo 1 e Tipo 0 e apresentam um ponto de singularidade no espaço de fases, como explicado no cap.3.

No espaço de fases representado pelas coordenadas (r, Φ) , o pêndulo e o ciclo-limite são expressos por curvas fechadas. Uma perturbação nesses sistemas corresponde, como visto no cap.3, a um vetor de deslocamento numa única direção das coordenadas. Esses sistemas podem ter cessação de suas oscilações quando uma perturbação única leva o sistema ao ponto de singularidade.

Anéis

Um outro modelo de oscilador é aquele representado apenas por uma variável, a fase, constituindo o **anel**.

O anel é classificado em dois tipos de sistemas: **ampulhetas e relógios simples** (Winfrey 1980)(Lakin-Thomas 1995).

A **ampulheta** consiste num sistema representado apenas pela variável fase, que cessa ao completar um ciclo: é preciso virar a ampulheta, ou impulsioná-la ao fim de cada ciclo, para que ela recomece novo ciclo. Nesse sentido, a ampulheta é um anel não-auto-sustentado.

O **relógio-simples**, por sua vez, recomeça automaticamente cada ciclo. Um relógio simples é constituído por uma seqüência de ampulhetas inter-

ligadas, que correspondem a estágios do ciclo: cada estágio leva um certo intervalo de tempo para se completar e o fim de cada estágio desencadeia o início do próximo estágio. O final do último estágio desencadeia o primeiro, recomeçando o ciclo que, dessa forma, adquire caráter auto-sustentado.

Num ciclo do tipo anel, o sistema segue sempre uma única direção, na sucessão dos estágios que dependem, cada qual dos anteriores, para poderem começar, como numa corrida de revezamento, em que cada corredor está posicionado numa posição (fase) do ciclo da pista: em cada momento, existe apenas um corredor ativado, sem a chegada do qual o próximo não pode começar; apesar de envolver vários corredores, a situação geral de uma equipe pode ser representada pela posição em que o único corredor ativo se encontra. Da mesma forma, um ritmo biológico representado por um anel envolve uma série de processos encadeados e, portanto, é estruturalmente complexo, mas a sua representação matemática é mais simples, por essa dependência dos vários estágios limitarem a trajetória à única dimensão. Vamos nos restringir, daqui em diante, aos relógios simples, que constituem os anéis que recomeçam automaticamente os ciclos.

Um relógio simples, ao ser perturbado, apresenta somente PRCs do Tipo 1. Por ser representado em uma dimensão, tem sua trajetória mais limitada, no sentido que é preciso sempre, para passar de uma fase a outra, passar por todas as fases intermediárias: todos os estágios que constituem o relógio simples precisam ser rigorosamente completados. Nesse sentido, um deslocamento de fase não é produzido por um salto instantâneo de fase, como ocorre num ciclo limite. Deslocamentos de fase são medidos em relação a um relógio idêntico que não sofreu a perturbação: se algum estágio do relógio sofreu uma aceleração, sua fase final será maior do que no relógio não-perturbado, de forma que temos um adiantamento de fase. Se, por outro lado, ele sofreu uma desaceleração, a comparação com a fase do relógio não perturbado mostrará um atraso. Uma metáfora comumente empregada para ilustrar essa propriedade é o rolo de filme que pode ser acelerado ou desacelerado, sem jamais poder aparecer uma cena abrupta de outra parte da estória antes que as cenas anteriores tenham aparecido.

Uma PRC do Tipo 0 nunca ocorre num relógio simples, como acontece com osciladores do tipo ciclo-limite, como mostrado na fig.6.3. Nessa figura, mostramos a ocorrência periódica de um evento-marco de um ciclo-limite, com periodicidade T . Pulsos são administrados em diferentes fases desse ciclo e mostramos em que fase o próximo evento ocorre, após o pulso. Quando o

pulso é fraco, eventos ocorrem mais tarde ou mais cedo, sendo essa magnitude e essa mudança de direção feita de forma contínua, resultando numa PRC do Tipo 1. Quando o pulso é forte, por sua vez, a magnitude do deslocamento de fase ultrapassa o limite de uma representação contínua ($\Delta\Phi > 180^\circ$), sendo necessário representá-lo com uma descontinuidade. Quando a PRC é do tipo 1, existe uma correspondência biunívoca ($\Phi \rightarrow \Phi'$) entre todas as fases do ciclo; quando é do **Tipo 0** a relação ($\Phi \rightarrow \Phi'$) mapeia as fases iniciais para apenas um intervalo limitado de fases Φ' , não sendo biunívoca, propriedade essa que um sistema unidimensional não pode apresentar (Winfree 1980).

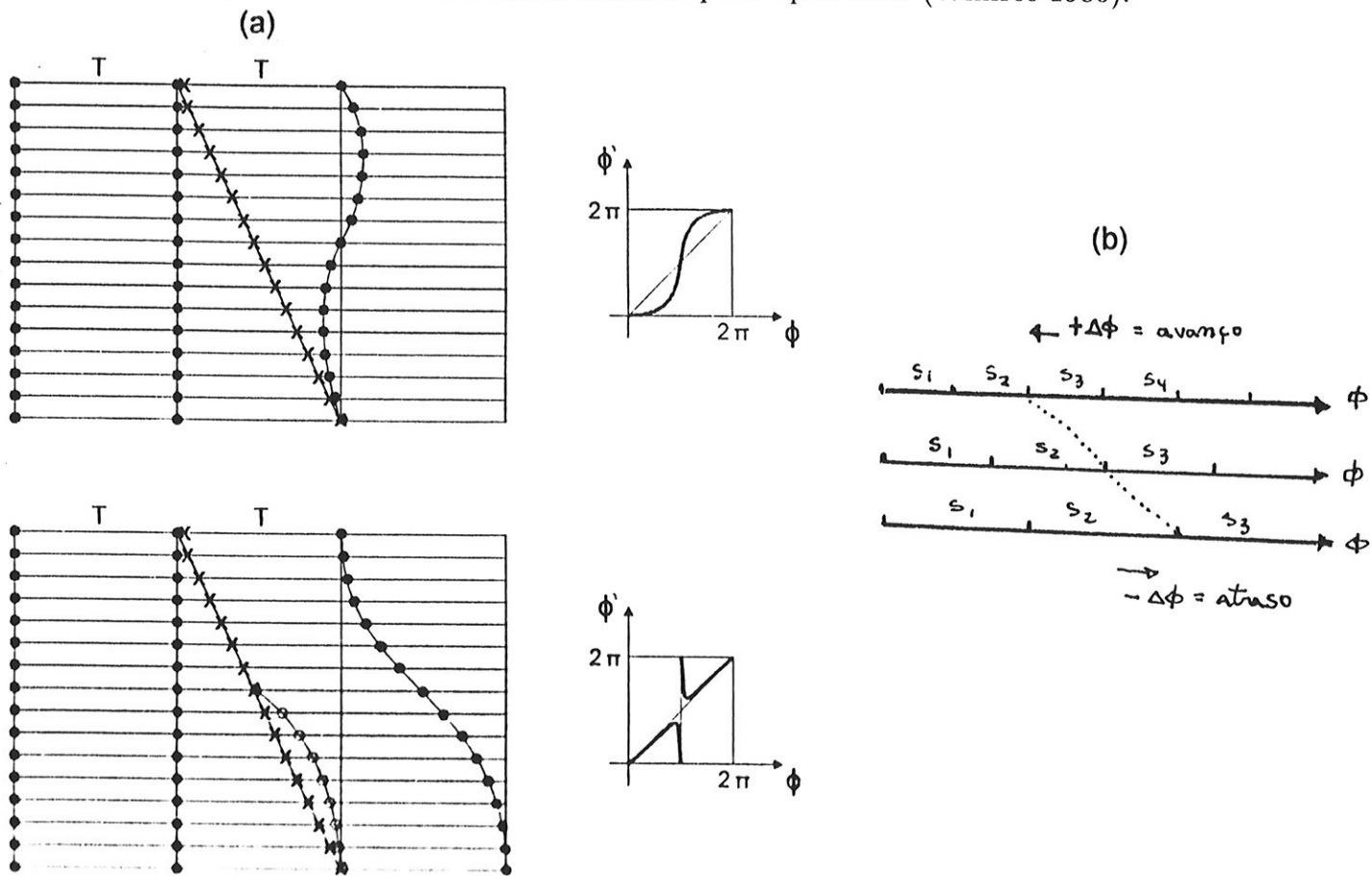


Figura 6.3: Possíveis deslocamentos de fase no oscilador. a)deslocamentos de fase no ciclo-limite. b)deslocamentos de fase no relógio simples

6.4 Ciclos-Limites e Relógios Simples

Historicamente, o modelo unidimensional de relógio simples surgiu como primeira proposta na descrição dos ritmos biológicos. A analogia direta com um relógio do qual se sabe apenas a fase facilitava essa associação com os ritmos biológicos, tendo sido largamente proposto nos períodos de 1950 a 1960. O modelo de relógio simples foi largamente popularizado por F. Brown, junto com a sua idéia de que os ritmos circadianos eram indicadores diretos dos "relógios" geofísicos externos (Winfree 1980). Pittendrigh também utilizou esse modelo, diante da formulação de um sistema interno de medição da passagem do tempo (Winfree 1980). Mesmo hoje em dia, a menos que o trabalho de cronobiologia se baseie explicitamente em equações que geram um ciclo-limite, o modelo intuitivo utilizado ao tratar de ritmos consiste apenas em um relógio unidimensional (Winfree 1980).

Diante do fato de que ciclos externos deveriam sincronizar esses relógios simples, surgiu, pela primeira vez, a idéia de um acerto de fases entre ritmos por ciclos externos com periodicidades diferentes, tendo sido sugerida uma resposta dependente da fase do relógio simples a estímulos externos: acelerações e desacelerações em maior ou menor grau, dependentes da fase (Winfree 1980). Experiências de PRC demonstraram as primeiras limitações do modelo de relógio simples: apesar de ser bastante eficiente e intuitivo do ponto de vista descritivo de uma oscilação biológica, era insuficiente na explicação de propriedades como a PRC do Tipo 0 e singularidades.

O ciclo-limite, pelas suas propriedades identificadas nos comportamentos dos ritmos biológicos, como a estabilidade da amplitude, PRCs do Tipo 1 e Tipo 0, singularidades, acabou sendo largamente associado a osciladores biológicos, desde a proposta de Pavlidis (Pavlidis 1967), que marcou um salto qualitativo na área de modelamento matemático dentro da cronobiologia. Desde então, cada vez mais comportamentos têm sido explicados através desse modelo, estendendo-se para o acoplamento de osciladores e bases de mecanismos da ritmicidade.

Nem todos os ritmos, porém, são bem descritos através do modelo de ciclo-limite, sendo alguns, apesar de pouco mencionados, ainda melhor identificados com os relógios simples.

O modelo de relógio simples tem sido proposto na representação de alguns ritmos biológicos auto-sustentados específicos, como da mitose celular (Tyson e Sachsenmaier 1978) e da ovulação (Lacker et al 1989), da qual se sabe que

é resultante de uma seqüência de estágios hormonais interligados. Esses processos não correspondem à dinâmica contínua associada ao ciclo-limite, mas à sucessão cíclica de eventos descontínuos.

6.5 Relógio Simples Subjacente aos Ritmos de Muda e de Oviposição

Eventos Subjacentes aos Ritmos de Muda

Os ritmos de muda cuticular e de oviposição, no inseto *Folsomia candida* são resultantes de uma liberação encadeada de hormônios. Cada liberação dura um certo intervalo de tempo e cada evento ocorre somente depois de completado o anterior (Palévody e Grimal 1976).

A verificação de uma PRC do Tipo 0 e a existência de uma singularidade que, quando alcançada, provoca a arritmicidade, são indicativos de um oscilador do tipo ciclo-limite. Nossas PRCs apresentaram apenas PRC do tipo 1, que corresponde à única resposta de um relógio simples a estímulos que modifiquem as fases.

Se os ritmos estudados consistirem num relógio simples, cada evento hormonal interligado tem um papel funcional direto na constituição do ritmo, ao invés de um sistema que seja controlado em todo o ciclo por um oscilador separado.

Ritmos de muda cuticular em outros insetos apresentam, freqüentemente, "gates" circadianos: existe um relógio circadiano que controla o evento da ecdise. Estudos minuciosos das bases hormonais desses eventos apontam para um ritmo também constituído por uma seqüência de eventos hormonais interligados, estando o relógio circadiano associado à liberação do primeiro evento hormonal, que vai desencadear todos os demais (Truman 1972a). Não verificamos "gates" circadianos em nosso sistema, sendo os eventos hormonais desacoplados de qualquer relógio, gerando sua própria ritmicidade.

Ausência de Transientes

Dessa forma, a temperatura deve estar atuando diretamente nos eventos que constituem o ritmo, desacelerando ou acelerando esses processos, e

um dos fortes indicativos dessa ação direta é a ausência de transientes nos deslocamentos de fase observados.

Transientes são bastante visíveis no trabalho de PRC do ritmos e esporulação do fungo (*Pilobolus sphaerosporus*) (Bruce, Pittendrigh 1960) (fig.6.4). Nesse trabalho, o ritmo circadiano de liberação dos esporos foi submetido a pulsos de luz, nas várias fases do ciclo e foram observados somente atrasos de fase. Esses atrasos se completaram somente depois de três ciclos transientes, nos quais os ritmos foram gradualmente acertando a fase final. Ritmos circadianos são necessariamente controlados por um relógio circadiano, sendo esses transientes resultantes da resposta mais lenta do ritmo controlado diante da mudança de fase no relógio.

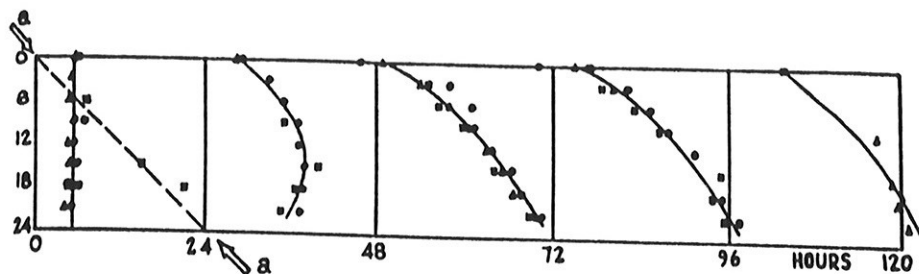


Figura 6.4: Transientes nos atrasos de fase observados nas PRCs de ritmos de esporulação, por pulsos de luz, extraído de (Bruce, Pittendrigh 1960)

Alguns relatos de PRCs têm apontado transientes muito mais rápidos em atrasos de fase, em relação aos apresentados pelos adiantamentos (Moore-Ede 1980). De qualquer modo, essa propriedade não parece ser generalizada. PRCs com atrasos, como os mostrados na fig.6.4 costumam apresentar transientes bastante evidentes.

As bases hormonais dos ciclos de muda e de oviposição sugerem fortemente um relógio simples subjacente a esses ritmos biológicos. PRCs do tipo 1 e ausência de transientes fortalecem esse modelo.

Acoplamento dos Ciclos de Muda e de Oviposição

Os dois ciclos, M1 e M2, devem estar submetidos à influência assimétrica do acoplamento com o ciclo de oviposição. Os pulsos de temperatura desaceleram ambos os ciclos, numa taxa diferente em cada ciclo. Interpretamos

que esse efeito da temperatura foi forte o suficiente nas fases em que nenhum inseto apresentou adiantamento: as primeiras fases dos ciclos de muda e da oviposição. Um pico na curva de (Nad/Nat & fase) figs.5.10,11 pode significar que a ação da temperatura não foi forte o suficiente para todos os insetos, e para alguns indivíduos, ainda se observaram adiantamentos, resultantes de pulsos nas fases finais dos ciclos de muda e de oviposição. Ao verificarmos sucessivas curvas (Nad/Nat & fase) para pulsos cada vez mais longos e, portanto, mais eficazes na prevenção de adiantamentos (3h, 8h, 24h), verificamos a tendência desses picos irem diminuindo a sua amplitude.

Nesse sentido, podemos interpretar que, não havendo o acoplamento entre a muda e a oviposição, os tamanhos dos picos em M1 e M2 seriam iguais. Sendo o efeito de prevenção de adiantamento maior nas primeiras fases dos ciclos de muda e de oviposição, o efeito somado implica em maiores prevenções em M1, pois corresponde às primeiras fases do ciclo da oviposição. Desta forma, M1 e M2 apresentam picos de adiantamentos nas últimas fases de seus ciclos, mas o pico em M2 é maior do que em M1, como podemos verificar na fig.6.5, em que mostramos juntos os efeitos do mesmo pulso de temperatura de 24h nos ciclos de muda e de oviposição.

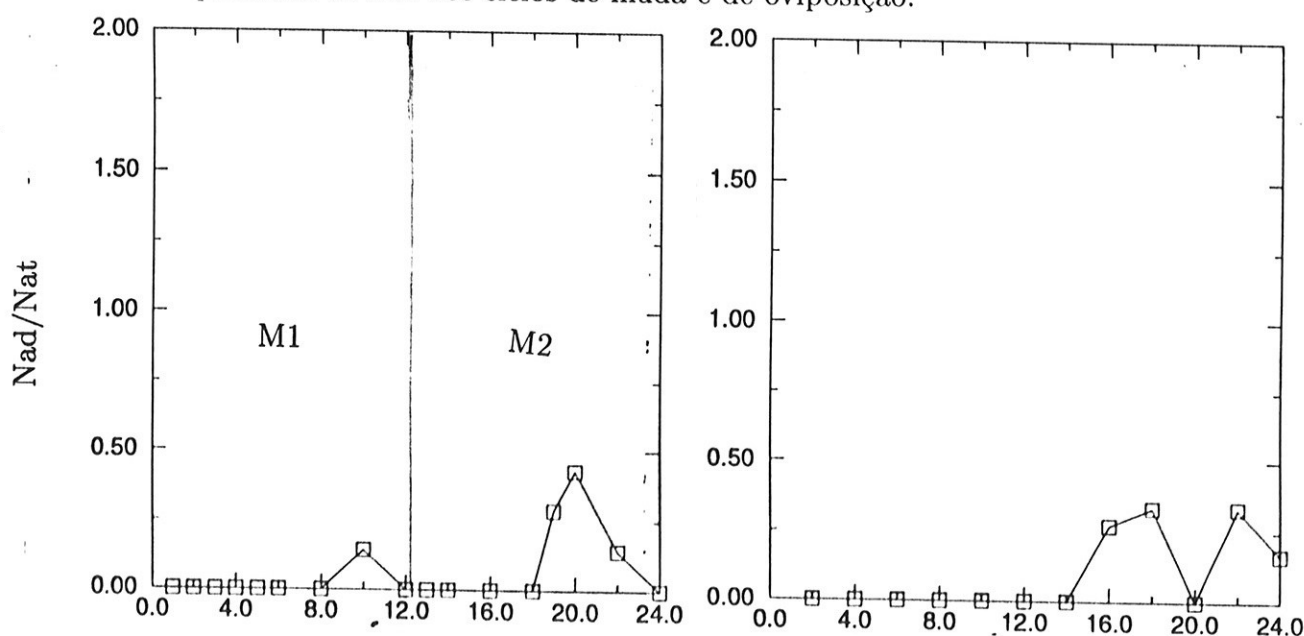


Figura 6.5: Nad/Nat em função da fase, para os ciclos de muda e de oviposição, sob pulsos de $20^{\circ} \rightarrow 25^{\circ}$ com duração de 24h

Quando estímulos agem sobre osciladores acoplados, eles podem atuar sobre os dois osciladores ou sobre apenas um deles, sendo o efeito propagado ao outro, através do acoplamento (Kopell 1994). No nosso caso, a temperatura agiu claramente sobre os dois ritmos, tendo sido observado o efeito do acoplamento na resposta final do ritmo.

Modificação da Velocidade num Relógio Simples

A atuação de um estímulo externo sobre um relógio simples, acelerando ou desacelerando o ciclo, constitui um efeito paramétrico.

Os pulsos de temperatura, com durações diferentes de 3h, 8h e 24h, devem estar atuando de forma paramétrica sobre os ritmos de muda e de oviposição, como explicado na seção 3.4.1. Caso o efeito fosse não-paramétrico, como observado nos trabalhos apresentados na seção 6.2, as PRCs resultantes de pulsos com durações crescentes não apresentariam a diferença significativa observada.

Consideremos um relógio simples da forma:

$$\dot{\Phi} = G + I \cos \Phi \quad (6.1)$$

para parâmetros $G = 1$ e $I = -0,99$, a velocidade angular desse sistema é apresentada na fig.6.6.

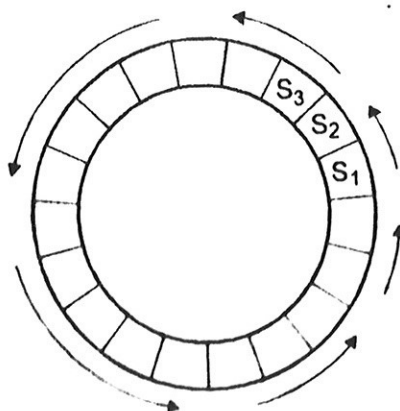


Figura 6.6: Velocidade do relógio simples da eq.6.1. S_n correspondem aos estágios discretos que integram o sistema.

Quando submetido a um estímulo paramétrico de duração M , o deslocamento de fase ($\Phi \rightarrow \Phi'$) provocado é dado pela relação:

$$\frac{d\Phi}{G + I \cos 2\pi\Phi} = dt \quad (6.2)$$

$$M = \int_0^M dt = \int_{\Phi}^{\Phi'} \frac{d\Phi}{G + I \cos 2\pi\Phi} \quad (6.3)$$

$$\Phi' = \frac{1}{\pi} \operatorname{arctg} \left\{ \sqrt{\frac{(G+I)}{(G-I)}} \operatorname{tg} \left\{ M\pi \sqrt{(G^2 - I^2)} + \operatorname{arctg} \left[\sqrt{\frac{(G-I)}{(G+I)}} \operatorname{tg} \pi\Phi \right] \right\} \right\} \quad (6.4)$$

A partir do mapa $\Phi'(\Phi)$, podemos calcular os deslocamentos de fase $\Delta\Phi$ como função da fase Φ , obtendo a PRC que tem as mesmas características básicas das observadas para a muda e oviposição fig.5.8 e 5.9, sendo formada apenas por atrasos, com maiores atrasos nas fases médias dos ciclos, como mostrado na fig.6.7.

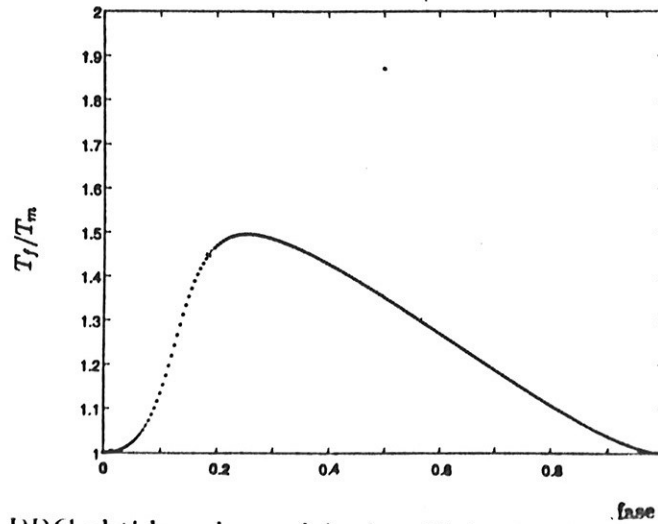


Figura 6.7: PRC obtida pelo modelo de relógio simples da eq.6.4, submetido ao efeito paramétrico de um estímulo que desacelera os processos em taxas diferenciadas com a fase.

O mapa $\Phi'(\Phi)$ apresenta somente atrasos de fases e iterações tendem para o ponto fixo em $\Phi_0 = 0, 2\pi$, não apresentando ciclos periódicos estáveis. Isto significa que, se pulsos periódicos forem administrados aos insetos, independentemente da periodicidade destes pulsos, sempre haverá um pulso coincidindo com algum episódio de ecdise ou oviposição, mas não haverá uma relação de fase estável entre os pulsos e esses episódios.

Vamos considerar o efeito do acoplamento do ciclo de oviposição sobre a muda. Consideremos Φ_A e Φ_B as fases dos ciclos A e B, sendo a periodicidade do ciclo B duas vezes a periodicidade do ciclo A, como é a relação entre a muda e a oviposição. Consideremos A1 e A2 os dois ciclos A que ocorrem a cada ciclo B. Temos as seguintes equações:

$$\dot{\Phi}_A = G - I \cos \Phi_A \quad (6.5)$$

$$\dot{\Phi}_B = G - I \cos(\Phi_B) = G - I \cos(\Phi_A/2) \quad (6.6)$$

Considerando um acoplamento assimétrico sobre o ciclo A, diretamente relacionado com o ciclo B, temos:

$$\dot{\Phi}_A = G - I \cos \Phi_A + \epsilon(G - I \cos \Phi_B) \quad (6.7)$$

A partir dessa nova expressão, integrando numericamente, verificamos que um dos efeitos desse acoplamento é a diminuição do período do ciclo A e outro, a assimetria entre a PRC de A1 e A2, como mostrado na fig.6.8. Os insetos que não apresentavam oviposição (fig.5.4) tinham, de fato, periodicidade maior da muda.

Note-se que, apesar de estarmos utilizando equações específicas para representar os ciclos de muda e de oviposição, a abordagem que usamos não é do tipo explícito, como explicado no cap.3: escolhemos um relógio simples que fosse representado por um sistema de equações bastante simples e que reproduzisse convenientemente as principais propriedades observadas. Não é possível, no entanto, identificar os termos dessa equação com o que realmente constitui o ciclo biológico, por se tratar de uma abordagem matemática qualitativa de um processo biológico. A mesma abordagem é utilizada quando se escolhe a equação de van der Pol como protótipo de sistema que apresenta ciclo-limite, como apresentado no cap.3.

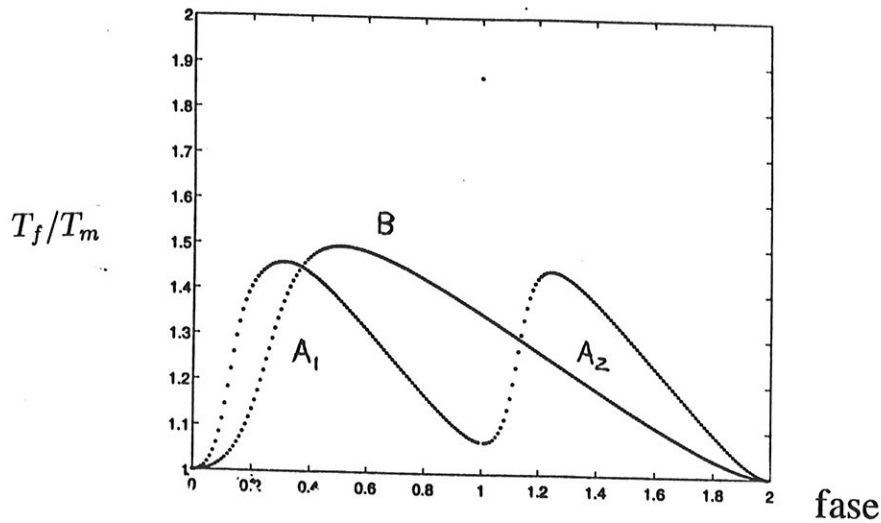


Figura 6.8: Diferenças nas formas das PRCs dos ciclos A1 e A2, considerando o acoplamento com um ciclo B, que tem o dobro do período de A. Mostramos as PRCs de A1, A2 e B, com $G = 1$, $I = -0,99$.

Efeitos da temperatura sobre relógios biológicos são bastante variados, não sendo possível generalizar se a atuação é ou não semelhante à da luz. No entanto, o fato de já terem sido observadas PRCs do Tipo 0 com pulsos de temperatura é um forte indicativo de que o motivo de termos obtido apenas PRCs do Tipo 1 com atrasos deva ser mais profundo, levando-nos a investigar outros fatores.

Classificações dos ritmos ajudam a entender melhor a estrutura do sistema de temporização biológica, dada a enorme variedade dos mesmos. Ritmos biológicos são classificados de acordo com muitos critérios, sendo o principal a periodicidade em relação ao ciclo de 24 horas: ritmos circadianos, ultradianos e infradianos. Um segundo critério é a existência de correlatos geofísicos nas periodicidades: ritmos controlados por relógios biológicos e ritmos sem correlatos geofísicos. Um outro critério que deve ser enfatizado é a natureza do oscilador subjacente, quanto à dimensão dinâmica: ritmos do tipo ciclo-limite e relógios simples. Essa dimensão determina os tipos de PRCs que o oscilador pode apresentar.

Verificamos que osciladores do tipo ciclo-limite, associados à maioria dos ritmos biológicos, responde com PRCs do Tipo 1 e Tipo 0, além de apresentar

singularidades. Osciladores unidimensionais, classificados com anéis, respondem apenas com PRC do Tipo 1, devido às limitações de sua trajetória, no espaço de fases. Relógios simples são os anéis auto-sustentados e são associados a ritmos constituídos por uma seqüência de eventos discretos interligados, cada evento dependendo do término do anterior para se iniciar. Esse modelo é associado a alguns poucos ritmos específicos, como os da mitose celular e ovulação.

Verificamos, através das simulações, que um modelo de relógios simples acoplados sujeito ao efeito paramétrico da temperatura pode representar convenientemente os principais aspectos observados nos resultados experimentais. O efeito não-paramétrico, dominante no processo de sincronização do relógio circadiano pela luz, tem sido apontado como essencial para a preservação da precisão de um oscilador que funcione como um relógio: ele provoca saltos instantâneos de fase. O efeito não-paramétrico, por sua vez, induz uma mudança de fase via desaceleração ou aceleração de um ciclo, pouco apropriado para atuar num processo de sincronização do relógio.

Os processos de discriminação entre ciclos-limites e relógios simples envolvem a identificação de PRCs do Tipo 0 e singularidades. Identificados, eles servem para descartar o relógio simples. No nosso caso, associamos o modelo de relógio simples aos ritmos observados, justamente pela ausência dos critérios de sua exclusão, o que torna uma prova mais fraca. Nesse momento, a leve abertura da caixa-preta, verificando os processos subjacentes ao ciclo de muda, que correspondem a liberações encadeadas de hormônios (Palévody e Grimal 1976), vem corroborar mais fortemente a proposta deste modelo. A ausência de transientes, por sua vez, também sugere um sistema que não apresenta um oscilador separado, controlando as fases: a temperatura atuou diretamente sobre o ritmo.

Ritmos infradianos são pouco estudados quanto à sua natureza, mesmo em seres que vivem em ambientes sujeitos a sincronizações. O modelo de relógio simples para os ritmos infradianos de muda e oviposição, nos colêmbolos cavernícolas, mostrou-se bastante apropriado, chamando a atenção para uma classificação diferente para ritmos representados por uma dinâmica discreta, em relação aos ritmos do tipo ciclo-limite. Baseados em argumentos da teoria dos osciladores, verificamos como um oscilador dessa natureza tem sua trajetória no espaço de fases mais limitada, refletindo no único tipo de PRC que pode produzir e na impossibilidade de ser sincronizado de forma estável por estímulos externos, se suas PRCs apresentarem

somente atrasos.

O relógio simples é considerado até mesmo como uma das alternativas de modelos de ritmos infradianos circanuais, que constituem ritmos com fortes correlatos geofísicos e que podem estar associados, portanto, a um oscilador separado controlando suas periodicidades (Mrosovsky 1970).

As bases hormonais dos ritmos de muda e de oviposição são genericamente iguais nos demais insetos, mesmo naqueles que apresentam "gates". O "gate", aparentemente, parece exercer controle ao longo de todo o ciclo, como ocorre na maioria dos ritmos circadianos, mas pode estar acoplado ao desencadeamento de apenas um dos estágios do relógio simples (Truman 1972a): esse estágio só começa quando o anterior tiver completado e se o "gate" estiver aberto. Podemos, possivelmente, interpretar os ritmos de muda e oviposição da maioria dos insetos como um relógio simples associado a um relógio circadiano em apenas um evento. No caso específico dos colêmbolos cavernícolas, esses mesmos ciclos não estariam acoplados a um relógio, consistindo num ritmo "puro".

Conclusões

Realizamos, neste trabalho, experimentos de Curvas de Respostas de Fases (PRC) (Pittendrigh, Daan 1976) com ritmos infradianos observados em colêmbolos cavernícolas (Marques et al 1987). Nossa principal motivação era a possibilidade de desenvolver um trabalho interdisciplinar na área de cronobiologia, elaborando protocolos experimentais e modelando os resultados, do ponto de vista de sistemas dinâmicos. As motivações cronobiológicas desses experimentos baseavam-se na possibilidade de contribuir para um maior entendimento dos ritmos infradianos, uma vez que os mesmos eram pouco estudados.

Nossas experiências tiveram como resultado PRCs com apenas atrasos de fases. Esse tipo de curva é pouco comum, na literatura, pois PRCs costumam apresentar adiantamentos e atrasos de fase, sendo essa característica essencial para a sincronização por ciclos ambientais.

A dimensão de um sistema, no espaço de fases, determina os tipos de PRCs que o oscilador pode apresentar. Ciclos-limites correspondem a osciladores com mais de uma dimensão, enquanto relógios simples, associados a ritmos constituídos por uma seqüência de eventos discretos interligados, correspondem a um sistema unidimensional que está limitado a apresentar somente PRCs com característica topológica do Tipo 1 (Winfree 1980). Verificamos, através das simulações, que um modelo de relógios simples acoplados, sujeitos ao pulso paramétrico da temperatura, pode representar, convenientemente, os principais aspectos observados nos resultados experimentais: PRCs com apenas atrasos de fase; PRCs diferentes para a muda seguida e não por oviposição; diferentes períodos para ciclos da muda em insetos que apresentam ou não a oviposição.

Os processos de discriminação entre ciclos-limites e relógios simples envolvem a identificação de PRCs com a característica topológica do Tipo 0 e

singularidades de fase (Winfree 1980). Identificados, eles servem para descartar o relógio simples. No nosso caso, associamos o modelo de relógio simples aos ritmos observados, justamente pela ausência dos critérios de sua exclusão, mas a verificação dos processos subjacentes ao ciclo de muda, que correspondem a liberações encadeadas de hormônios, veio corroborar a proposta desse modelo. A ausência de transientes também fortaleceu esse modelo, pois ela subentende ação direta sobre um ritmo. Transientes indicam a existência de osciladores separados controlando os ritmos (Pittendrigh, Daan 1976).

Ritmos infradianos são pouco estudados quanto à sua natureza, mesmo em seres que vivem em ambientes sujeitos a sincronizações. O modelo de relógio simples para os ritmos infradianos de muda e oviposição, nos colêmbolos cavernícolas, mostrou-se bastante apropriado, chamando a atenção para uma classificação baseada na dimensão de um oscilador. Baseados em argumentos da teoria dos sistemas dinâmicos, verificamos como um oscilador dessa natureza tem sua trajetória no espaço de fases mais limitada, refletindo no único tipo de PRC que pode produzir e na impossibilidade de ser sincronizado de forma estável por estímulos externos, se sua PRC apresentar somente atrasos.

As bases hormonais dos ritmos de muda e de oviposição são genericamente iguais nos demais insetos, mesmo naqueles que apresentam "gates" (Pittendrigh, Skopik 1970). Podemos interpretar os ritmos de muda e oviposição da maioria dos insetos como um relógio simples acoplado a um oscilador circadiano em apenas um evento, e os ritmos dos colêmbolos como o mesmo relógio, sem esse oscilador. Ele pode ter sido perdido, da mesma forma como a visão, no longo processo de adaptação ao ambiente de cavernas, consistindo num ritmo "puro".

Apresentamos, no início desse trabalho, os tipos de modelamentos matemáticos de sistemas biológicos, classificados segundo dois pontos de vista: abordagens com equações explícitas, quando o objetivo do modelamento era a representação dos mecanismos que geram um comportamento biológico, identificando as variáveis e parâmetros com elementos dos sistemas reais (Friesen 1993); abordagens sem equações explícitas, quando o objetivo do modelamento era a caracterização direta dos dados, como empregadas na caracterização de caos observado experimentalmente, ou voltadas aos comportamentos genéricos de um sistema, independentemente de especificidades (Winfree 1980).

Utilizamos o segundo tipo de abordagem no nosso trabalho, desenvol-

vendo um modelo qualitativo de relógio simples para descrever os ritmos estudados. Modelos com equações explícitas são elaborados na medida da possibilidade de se conhecer, profundamente, todos os processos que estão gerando a ritmicidade, de forma a poder identificar, ponto a ponto, variáveis das equações com os processos envolvidos. Isso requer um experimento voltado para a bioquímica das reações subjacentes, não constituindo o enfoque de uma experiência de PRC. Nosso experimento considerou o mecanismo detalhado como “caixa-preta” e nosso modelo procurou caracterizar de forma qualitativa esse mecanismo, esclarecendo a natureza do mesmo e a sua descrição como oscilador.



Bibliografia

- Abardanel H.D.I. 1989 . *Prediction and System Identification in Chaotic Nonlinear Systems: Time Series with Broadband Spectra*. Physics Letters A 138:401.
- Aihara K., Numajiri T., Matsumoto G., Kotani M. 1986, *Structures of Attractors in Periodically Forced Neural Oscillators*. Physics Letters A 116:313-317.
- Andronov A.A., Chaikin C.E. 1949. *Theory of Oscillations*. Princeton University Press.
- Aronson D.G., Johnson K.A., Loros J.L., Dunlap J.C. 1994. *Negative Feedback Defining a Circadian Clock: Autoregulation of the Clock Gene "frequency"*. Science 263:1578-1584.
- Aschoff J. 1960 . *Exogenous and Endogenous Components in Circadian Rhythms*. Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology 25:11-28.
- Aschoff J., 1987. *Masking of Circadian Rhythms by 'Zeitgebers' as Opposed to Entrainment*. In:W.Th.J.M.Hekken, G.H.Kerkhof & W.J.Rietveld (eds), Trends in Chronobiology. London Pergamon Press, 149-161.
- Aschoff J., Pöppel E., Wever R. 1969. citado em Moore-Ede et al, 1982.
- Babloyantz A., Destexhe A. 1986 . *Low-Dimensional Chaos in an Instance of Epilepsy*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:3513-3517.
- Bai Lin H. 1989. *Elementary Symbolic Dynamics and Chaos in Dissipative Systems*. World Scientific, Singapore.
- Bak P., 1986. *The Devil's Staircase*. Physics Today 38-45.

- Beck.S., 1980. *Insect Photoperiodism*. Academic Press.
- Bélair J., Glass L. 1985. *Universality and Self-Similarity in the Bifurcations of Circle Maps*. *Physica* 16(D):143-154.
- Benedito-Silva A. 1997. *Relógios Biológicos - Modelos. em Cronobiologia: Princípios e Aplicações*. Marques N., Menna-Barreto L. eds. EDUSP.
- Bernard C. 1926 . *Leçons sur les phénomènes de la vie communs aux animaux et aux végétaux*. Paris, J-B. Baillière et fils.
- Block G., Wallace S. 1982. *Localization of a Circadian Pacemaker in the Eye of a Mollusc, Bulla*. *Science* 217:155-157.
- Bruce V., Weight F., Pittendrigh C.S. 1960. *Resetting the Sporulation Rhythm in Pilobolus with Short Light Flashes of High Intensity*. *Science* 131, 728-730.
- Bünning E. 1957. *Opening Address: Biological Clocks*. Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology. 1-9.
- Campbell A., Gonzalez A.,Gonzalez D.,Piro O.,Larrondo H.,1989.*Isochrones and the Dynamics of Kicked Oscillators*. *Physica A* 155:565-584.
- Cannon W.B. 1929. *Organization for Physiological Homeostasis*. *Physiol. Rev.* 9:399-431.
- Chen S., Billings S.A. 1992. *Neural Networks for Nonlinear Dynamic System Modelling and Identification*. *Int.J. Control* 56 (2):319-346.
- Chialvo D.R., Apkarian V., 1993. *Modulated Noisy Biological Dynamics: Three Examples*. *Journal of Statistical Physics* 70:375-391.
- Chiba Y. , Cutkomp L.K., Halberg F. 1973. *Circaseptan (7-day) Oviposition Rhythm and Growth of Springtail, Folsomia candida (Collembola: Isotomidae)* *J.Interdiscipl.Cycle Research* 4 1:59-66.
- Collet P., Eckmann J.P. 1980. *Iterated Maps on the Interval as Dynamical Systems*. Birkhauser, Basel.

- Constantino R.F., Desharnais R.A., Cushing J.M., Dennis B., 1997. *Chaotic Dynamics in an Insect Population*. Science 275:389-391.
- Cutkoupmp L.K., Marques M.D., Snider R., Cornélissen G., Wu J.& Halberg F..1987.*Chronobiologic View of Molt and Longevity of Folsomia candida (Collembola) at different ambient temperatures*.In:J.E.Pauly & L.E. Scheving (eds.), *Advances in Chronobiology*. New York:Alan R.Liss, Inc.,249-256.
- Daan S., Beersma D. 1984. *Circadian Gating of Human Sleep-Wake Cycles*. In *Mathematical Models of the Circadian Sleep-Wake Cycle*, Moore-Ede and Czeisler (Eds).
- Daan S., Berde C. 1978.*Two Coupled Oscillators: Simulations of the Circadian Pacemaker in Mammalian Activity Rhythms*. Journal of Theoretical Biology 70:297-313.
- De Coursey P.J. 1959. *Daily Activity Rhythms in the Flying Squirrel, Glaucomus volans*. PH.D. Thesis, University of Wisconsin.
- De Haan R.L., 1967. In *Factors Influencing Myocardial Contractility*. R. D. Tanz., F. Cavaler, J. Roberts eds. Academic Press.
- D'Humieres D., Beasley M.R., Huberman B.A, Libchaber A. 1982 *Chaotic States and Routes to Chaos in Forced Pendulum*. Physical Review A 26,6 3483-3496
- Ding E. 1987. *Analytical Treatment for a Driven Oscillator with a Limit Cycle*. Physical Review A 35, 6:2669-2683.
- Ding M. 1993, *Quasi-Periodic Forcing:is It Relevant in Biological Oscillators?* Proceedings of The International Society for Optical Engineering -Chaos in Biology and Medicine, SPIE, California, 2036:220:233.
- Ditto W. 1993. *Chaos in Biology and Medicine*. Proceedings of the International Society for Optical Engineering, SPIE, San Diego.
- Dreisig H., Nielsen E.T. 1971. *Circadian Rhythm of Locomotion and its Temperature Dependence in Blatella germanica*. Journal of Experimental Biology 54:187-198.

- Dunlap J.C., Feldman J.F. 1988. *On the Role of protein Synthesis in the Circadian Clock of Neurospora crassa*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:1096-1100.
- Elbert T., Ray W., Kowalik Z., Skinner J., Graf K., Birbaumer N. 1994. *Chaos and Physiology: Deterministic Chaos in Excitable Cell Assemblies*. Physiological Reviews 74, 1:1-47.
- Enright J.T. 1970. *Ecological Aspects of Endogenous Rhythmicity*. Ann. Rev. Ecol. Syst. 1:221-238.
- Enright J.T. 1980. *Temporal Precision in Circadian Systems: A Reliable Neuronal Clock from Unreliable Components?* Science 209:1542-1545.
- Fiedler Ferrara N., Cintra Prado C. 1994. *Caos: uma Introdução*. Edgard Blücher Ltda.
- Friesen W.O., Block G.D., Hocker C.G. 1993. *Formal Approaches to Understanding Biological Oscillators*. Annu.Rev.Physiology 55:661-681.
- Garfinkel A., Spano M., Ditto W., Weiss J. 1993. *Controlling Cardiac Chaos*. Science 257:1230-1235.
- Gillet J.1962. *Contributions to the Oviposition-Cycle by the Individual Mosquitoes in a Population*. Journal of Insect Physiology 8:665-681.
- Glass L., Mackey M. 1988. *From Clocks to Chaos: the Rhythms of Life*. Princeton University Press.
- Glass et al. série de artigos publicados por Glass e seus colaboradores, listados em Keener P., Glass L.
- Glass L., Hunter P., McCulloch A. eds. 1991. *Theory of Heart*. Springer Verlag.
- Goldberger A.L., West B.J. 1987. *Chaos in Physiology: Health or Disease? em Chaos in Biological Systems*. H. Degn, A.V. Holden, L.F. Olsen eds. Plenum Publishing Corp. 1-3.

- Goldbeter A. 1996. *Biochemical Oscillations and Cellular Rhythms-the Molecular Bases of Periodic and Chaotic Behavior*. Cambridge University Press.
- Goodwin B.C. 1965. *Oscillatory Behavior in Enzymatic Control Processes*. *Advances in Enzyme Regulation* 3:425-438.
- Grassberger P. , Procaccia I., 1983. *Measuring the Strangeness of Strange Attractors*. *Physica* 9D:189-208.
- Guckenheimer J. , Holmes Ph. 1983. *Nonlinear Oscillations, Dynamical Systems, and Bifurcations of Vector Fields*. Springer, Berlin.
- Gwinner E. 1981. *Circannual Systems Handbook of Behavioral Neurobiology v.4 Biological Rhythms*. Ed.Aschoff.
- Hastings J.W., Rusak B., Boulos Z. 1991. *Circadian Rhythm: The Physiology Timing em Neural and Integrative Animal Physiology*. Prosser C. eds. John Wiley Sons.
- Hagedorn P. 1984. *Oscilações Não-Lineares* Edgard Blücher ed. SP.
- Hodgkin A.L. , Huxley A.F., 1952. *A Quantitative Description of Membrane Current and its Application to Conduction and Topology*. *Journal of Physiology*, 117:500-544.
- Jensen M.H. , Bak P., Bohr T., 1984. *Transition to Chaos by Interaction of Resonances in Dissipative Systems. I.Circle Maps*. *Physical Review A*, 30, 4:1960-1969.
- Johnsson A. , Karlsson H.G., 1972. *A FeedBack Model for Biological Rhythms - I. Mathematical Description and Basic Properties of the Model*. *Journal of Theoretical Biology* 36:153-174.
- Kaneko K. 1986. *Collapse of Tori and Genesis of Chaos in Dissipative Systems* World Scientific, Singapore.
- Kaplan D.T., Furman M.I., Pincus S.M., Ryan S.M., Lipsitz L.A.,1991. *Aging and the Complexity of cardiovascular Dynamics*. *Biophysics Journal* 59:945-949.

- Karlsson H.G. , Johnsson A., 1972. *A Feedback Model for Biological Rhythms. II. Comparisons with Experimental Results, Especially on the petal Rhythm of Kalanchöe.* Journal of Theoretical Biology 36:175-194.
- Kawato M. , Suzuki R., 1980. *Two Coupled Neural Oscillators as a Model of the Circadian Pacemaker.* Journal of Theoretical Biology 86:547-575.
- Keener J.P., Glass L., 1984. *Global Bifurcations of a Periodically Forced Non-linear Oscillator.* Journal of Mathematical Biology 21:175-190.
- Koehler W.K. , Fleissner G. 1978. *Internal Desynchronization of Bilaterally Organized Circadian Oscillations in the Visual System of Insects.* Nature 274:708-710.
- Konopka R.J. , Pittendrigh C.S., Orr D., 1989. *Reciprocal Behavior Associated with Altered Homeostasis and Photosensitivity of Drosophila Clock Mutants.* J.Neurogenet. 6:1-10.
- Kopell N. 1994 *Chains of Coupled Oscillators* Handbook of Neuroscience.
- Kostelich E.J. , Yorke J.A., 1990. *Noise Reduction: Finding the Simplest Dynamical System Consistent With the Data.* Physica D 41:183-196.
- Kuramoto Y., 1984. *Chemical Oscillations, Waves, and Turbulence.* Springer Verlag, Berlin.
- Lacker H.M., Feuer M.E., Akin E., 1989 . *Cell to Cell Signaling Through Circulatory Feed-Back: a Mathematical Model of the Mechanism of Follicle Selection in the Mammalian Ovary.* em *Cell to Cell Signalling: from Experiments to Theoretical Models.* A. Goldbeter, ed. Academic Press, London, pp.359-385.
- Lakin Thomas 1995. *A Beginner's Guide to Limit Cycles, their Uses and Abuses* Biological Rhythm Research 26,2 , 216-232.
- Lindberg R.G. 1974. *Entrainment by Temperature Cycles in the Little Pocket Mouse* Chronobiologia 1:356-361.
- Lloyd A.L., Lloyd D., 1995. *Chaos: Its Significance and Detection in Biology.* Biological Rhythm Research 26:233-252.

- Longtin A., 1991. *Mechanisms of Stochastic Phase Locking*. Chaos 5, 1:209-215.
- Lotka A.J., 1920. *Undamped Oscillations Derived from the Law of Mass Action*. Journal of American Chemical Society 42:1595.
- Marques M.D. , Cutkomp L.K., Cornelissen G., Marques N., Halberg F. 1987 *Life Span of Springtail on 12-Hr Shifts at Varying Intervals of 12-Hr Alternation in Ambient Temperature* Advances in Chronobiology, Part A, 257-264.
- Marques N. 1997. *Intermodulação de Frequências dos Ritmos Biológicos*. em *Cronobiologia: Princípios e Aplicações*. Marques N., Menna-Barreto L. eds. EDUSP.
- May R.M. 1976. *Simple Mathematical Models with Very Complicated Dynamics*. Nature 261:459-467.
- Menaker M. 1974. *Circannual Rhythms in Circadian Perspective*. In E.T. Pengelley (Ed.), *Circannual Clocks*. Academic press, 507-520.
- Mende W. , Herzel H., Wermke K., 1990. *Bifurcations and Chaos in Newborn Infant Cries*. Physics Letters A, 145,8,9:418-424.
- Metropolis N., Stein M.L., Stein P.R., 1973. *On Finite Limit Sets for Transformations on the Unit Interval*. Journal of Combinatorial Theory, 15, 1:25-44.
- Miller J., 1993. *On the Nature of the Circadian Clock in Mammals*. American journal of Physiology 264.(Regulatory Integrative Comp.Physiology.33):R821-R832.
- Minorsky N., 1962. *Nonlinear Oscillators*. D.Van Nostrand Company, Inc, New Jersey.
- Mizogushi A. , Ishizaki H. 1982. *Prothoracic Glands of the Saturnid Moth *Samia cynthia ricini* Possess a Circadian Clock Controlling Gut Purge Timing*. Proc. Natl. Acad. Sci. 79:2726-2730.
- Moore-Ede M.C., Czeisler C.A. 1984. *Mathematical Models of the Circadian Sleep-Wake Cycle*. Raven Press New York.

- Moore-Ede M.C. , Sulzman F.M. 7 Fulher C.A. 1982. *The Clock that Time Us*. Physiology of the Circadian Timing System. Cambridge: Harvard University Press.
- Mrosovsky N. 1970. *Mechanisms of Hibernation Cycles in Ground Squirrels: Circannual Rhythm or Sequence of Stages*. Pennsylvania Academy of Science, 44,172-175.
- Mrosovsky N. 1990. *Rheostasis - The Physiology of Change*. Oxford University Press.
- Mrosovsky N. 1995. *A Non-Photic Gateway to the Circadian Clock of Hamsters* Proceedings of Ciba Foundation Symposium: Circadian Clocks and their Adjustments 154-174.
- Murray J.D. 1989. *Mathematical Biology* Springer-Verlag
- Neville A.C. 1975. *Biology of the Arthropod Cuticle*. Springer Berlin.
- Nicolis G., Prigogine I. 1989. *Exploring Complexity*. R. piper GmbH & Co. KG Verlag, Munich.
- Ogata K., 1982. *Engenharia de Controle Moderno*. Prendice Hall do Brasil.
- Ott E., Grebogi C., York J.A., 1990. *Controlling Chaos*. Physical Review Letters 64 (11):1196-1199.
- Packard N.H., Crutchfield J.P., Farmer J.D., Shaw R.S., 1980. *Geometry from a Time Series*. Physical Review Letters 45, 9:712-716.
- Page T.L., Caldarola P.C., Pittendrigh C.S. 1977. *Mutual Entrainment of Billaterally Distributed Circadian Pacemakers*. Proc. Natl. Acad. Sci. 74:1277-1281.
- Page T.L., 1981a . *Effects of Localized Low-Temperature Pulses on the Cockroach Circadian Pacemaker*. American Journal of Physiology 240:R144-R150.
- Page T.L., 1985. *Clocks and Circadian Rhythms em Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Phenomenology*. Pergamon Press, Oxford.

- Page T.L., 1994. *Time is the Essence: Molecular Analysis of the Biological Clock*. Science 263:1570-1572.
- Palévodi C. , Grimal A. 1976. *Variations Cytologiques des Corps Allates au Cours du Cycle Reproducteur du Collembole Folsomia candida*. Journal Insect Physiology 22:63-72.
- Pavlidis T., 1967a. *A Mathematical Model for the Light Affected System in the Drosophila Eclosion Rhythm*. Bulletin of Mathematical Biophysics 29:291-310.
- Pavlidis T. 1967b. *A Model for Circadian Clocks*. Bulletin of Mathematical Biophysics 29:781-791.
- Pavlidis T. 1969 *Populations of Interacting Oscillators and Circadian Rhythms*. Journal of Theoretical Biology.22:418-436.
- Petersen E., 1980. *A Limit Cycle Interpretation of a Mosquito Circadian Oscillator*. Journal of Theoretical Biology, 84:281-310.
- Pittendrigh C.S. 1954. *On the Temperature Independence in the Clock System Controlling Emergence Time in Drosophila*. Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash) 40:1018-1029.
- Pittendrigh C.S. Bruce V.G. 1959. *Daily Rhythms as Coupled Oscillator Systems and their relation to Thermo and Photo-periodism* In:Photoperiodism and Related Phenomena in Plants and Animals, R.B. Withrow, ed.AAAS, 475-505.
- Pittendrigh C.S. 1966. *The Circadian Oscillation in Drosophila pseudoobscura pupaera model for the photoperiodic clock*. Z.Pflanzenphysiol.,54:275-307.
- Pittendrigh C.S., Daan S.1976. Journal of Comparative Physiology-A e B, 106-3.
- Pittendrigh C.S., Minis D. 1964. *The Entrainment of circadian Oscillations by Light and Their Role as Photoperiodic Clocks*. The American Naturalist, 98:262-294.

- Pittendrigh C.S., Skopik S.D. 1970. *Circadian Systems. V. The Driving Oscillation and the Temporal Sequence of Development*. Proc. Nat. Acad. Sci. 65:500-507.
- Pittendrigh C.S..1981.In:J.Aschoff (ed), *Handbook of Behavioral Neurobiology. Biological Rhythms*. New York:Plenum Press.
- Pöppel E. 1972. *Oscillations as Possible basis for Time Perception*. em *The Study of Time- Proc. of the 1º Conference of the International Society for the Study of Time*. West Germany. Springer Verlag.
- Ralph M.R.,Mrosowsky N. 1992. *Behavioral Inhibition of Circadian Responses to Light* Journal of Biological Rhythms 7:353-359.
- Reinberg A., Smolensky M.H., 1983. *Biological Rhythms and Medicine: Cellular, Metabolic, Physiopathologic and Pharmacologic Aspects*. Springer Verlag N.Y.
- Roberts S.K.F. , 1962. *Circadian Activity Rhythms in Cockroaches. II- Entrainment and Phse Shifting*. J. Cell Comp. Physiol. 67:473-486.
- Rosbash M.,1995. *Molecular Control of Circadian Rhythms*. Curr.Opinion Genet. Devel. 5:662-668.
- Ruelle D . 1990. *Deterministic Chaos:the Science and the Fiction*. Proceedings of the Royal Society of London A 427:241-248.
- Ruelle D. 1994. *Where Can One Hope to Profitably Apply the Ideas of Chaos?* Physics Today 24-30.
- Ruelle D. , Takens F., 1971. *On the Nature of Turbulence*. Communications in Mathematical Physics, 23 (1971):167-192.
- Saunders D.S. 1981. *Insect Photoperiodism* Handbook of Behavioral Neurobiology 4, Biological Rhythms. Aschoff (Ed).
- Saunders,D.S. 1982. *Insect Clocks* Pergamon Press.London.
- Shiryayev A.N. 1987. *Selected Works of A.N. Kolmogorov* volIII: Information Theory and the Theory of Algorithms. Kluwer Academic Publishers.

- Sismondo E. 1990. *Synchronous, Alternating, and Phase-Locked Stridulation by a Tropical Katydid*. Science, 249:55-58.
- Smith R.D., Turek F.W., Takahashi J.S. 1992. *Two Families of Phase-Response Curves Characterize the Resetting of the Hamster Circadian Clock* American Journal of Physiology, 262:R1149-R1153.
- Swade R.H. , Pittendrigh C.S. 1967. *Circadian Locomotor Rhythms of Rodents in the Arctic*. American Naturalist 101:431-466.
- Sweeney B.M. , Hastings J.W. 1960. *Effect of Temperature Upon Diurnal Rhythms*. Cold spring Harbor Symp. Quant. Biol. 25:87-104.
- Takahashi J.S., DeCoursey P.J., Bauman L., Menaker M. 1984. *Spectral Sensitivity of a Novel Photoreceptive System Mediating Entrainment of Mammalia Circadian Rhythms*. Nature 308:186-188.
- Takahashi J.S., Kornhauser J.M., Koumenis C., Eskin A., 1993. *Molecular Approaches to Understanding Circadian Oscillators*. Annu. Rev. Physiol. 55:729-753.
- Takens F., 1981 em *Proc. of the Symp. on Dynamical Systems and Turbulence, Univ. of Warwick*. Springer 1979-1980.
- Taylor W., Krasnow R., Dunlap J.C., Broda H., Hastings J.W., 1982. *Critical Pulses of Anisomycin Drive the Circadian Oscillator in Gonyaulax Towards Its Singularity*. J. Comparative Physiology 148:11-25.
- Truman J.W. , 1972a. *Physiology of Insect Rhythms - 1. Circadian Organization of the Endocrine Events Underlying the Moulting Cycle of Larval Tobacco Hornworms*. Journal of Experimental Biology 57:805-820.
- Tyson J. , Sachsenmaier W., 1978. *Is Nuclear Division in Physarum Controlled by a Continuous Limit Cycle Oscillator?* Journal of Theoretical Biology 73:723-738.
- Ulmann K. , Caldas I.L., 1997. *Transitions in the Parameter Space of a periodically Forced Dissipative System*. Chaos, Solitons & Fractals 7: 1913-1921.

- Van der Pol B. Van der Mark J., 1928. *The Heartbeat Considered as a Relaxation Oscillation, and an Electrical Model of the Heart*. Philosophical Magazine 6:763-775.
- Volterra V. , 1926. *Fluctuations in the Abundance of a Species Considered Mathematically*. Nature 118:558-560.
- Waterhouse J.M. , Minors D.S. 1994. *Human Circadian Rhythms and Masking. em Evolution of Circadian Clock. Proc. of the Fifth Sapporo Symp. on Biological Rhythm*. Hokkaido University Press, Sapporo.
- Weber F. 1985. *Postmolt Cuticle Growth in a Cockroach: in vitro Deposition of Multilamellate and Circadian-Like Layered Endocuticle*. Experientia 41:398-400.
- Weitz C.J., 1996. *Circadian Timekeeping: Loops and Layers of Transcriptional Control*. Commentary Proc. Natl. Acad. Sci 93:14308-14309.
- Wever R. 1979. *The Circadian System of Man: Results of Experiments Under Temporal Isolation* Springer-Verlag.
- Wever R. 1982. *Circadian Rhythms of Finches Under Steadily Changing Light Intensity: Are Self-Sustaining Circadian Rhythms Self Excitatory?* J. Comp. Physiol. 140:113-119.
- Wiedemann G. , 1977a. *Two Activity peaks in the Circadian Rhythm of the Cockroach Leucophaea maderae*. Journal of Interdisciplinary Cycle Research 8:378-383.
- Winfree A.T. 1967. *Biological Rhythms and the Behavior of Populations of Coupled Oscillators* J.Theoretical Biology 16,15-42.
- Winfree A., 1980. *The Geometry of Biological Time* Springer-Verlag, New York.
- Zar J. 1996. *Biostatistical Analysis* Prentice Hall, New Jersey.
- Zimmermann W., Pittendrigh C., Pavlidis T., 1968. *Temperature Compensation of the Circadian Oscillation in Drosophila Pseudoobscura and its Entrainment by Temperature Cycles*. Journal Insect Physiology 14:669-684.

"...mas aquela longa noite lhe fizera compreender que o tempo depende dos relógios e das mudanças de luz: não havia relógio e a luz recusava-se a mudar. Na realidade, ninguém sabe quanto tempo pode durar um segundo de sofrimento. Pode durar o tempo de um purgatório ou toda a eternidade ."

Graham Greene