Giovane Carreira Improta

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

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

> São Paulo 2021

VERSÃO CORRIGIDA

Giovane Carreira Improta

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

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

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

Orientadoras: Gisele Akemi Oda Verónica S. Valentinuzzi

São Paulo 2021

FICHA CATALOGRÁFICA

Improta, Giovane Carreira Sincronização por fotoperíodos naturais e artificiais, de verão e de inverno, em roedores subterrâneos (Ctenomys aff. knighti) / Giovane Carreira Improta; orientadora Gisele Akemi Oda --São Paulo, 2020. 62 p. Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia. 1. ritmos biológicos. 2. fotoperiodismo. 3. roedores subterrâneos. 4. cronobiologia. 5. roda de atividade. I. Oda, Gisele Akemi, orient. II. Título.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. John Fontenele Araújo

Dra. Rafaela Bruno

Dra. Samira Chahad-Ehlers

Sisure Akimi Oda

Profa. Dra. Gisele Akemi Oda Orientadora

"And the instincts of humanity were catered to by having the activities of Eternity tailored to an arbitrary twenty-four 'physiohour' day, with a solemn assumption of day and night, today and tomorrow."

> Isaac Asimov, The End of Eternity (Primeira edição, 1955)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Gisele e Verónica, por serem orientadoras exemplares, sempre muito atenciosas e pacientes. Obrigado por não desistirem de mim, mesmo quando nem eu acreditava no que estava fazendo. Obrigado pelo cuidado que vai muito além da academia, e que me faz, a cada dia, uma pessoa melhor: incentivando meu espanhol tanto quanto a corujinha do Duolingo, dando dicas de postura/alongamento e filmes; por todas as conversas e por ajudar em momentos difíceis (como as desventuras depois de comer locro).

À Mirian Marques que me mostrou a importância do rigor com os conceitos cronobiológicos, tanto para se organizar melhor nos próprios pensamentos, quanto para apreciar melhor protocolos inventivos.

À Johana Barros, que além de dedicação e habilidade impecável como técnica, que tornaram esse trabalho possível, me apresentou ao autêntico choripan riojano e outras delícias.

Aos meus companheiros de laboratório, Milene Jannetti, Jefferson Silva, Patricia Tachinardi, Danilo Flôres e Tamiris Yassumoto, pela parceria que vai dos scripts e discussões de artigo, até as tentativas (frustradas) de ver neve em Anillaco, a cozinha compartilhada e momentos de desabafo no bandejão/comedor do CRILAR.

À minha banca no exame de qualificação, composta pelos Prof. Dr. André Frazão Helene, Márcio Reis Custódio e Pedro Augusto C.M. Fernandes, pelas dicas bastante oportunas e por ajudar a enxergar novos padrões nos meus dados.

Ao Prof. Horacio de La Iglesia, que sempre deu sugestões valiosas nos congressos e também aceitou participar do meu comitê de acompanhamento.

A todos do CRILAR, incluindo os cachorros, pela hospitalidade inigualável e paciência na minha compreensão intermitente do espanhol.

Aos meus amigos de forma geral, que vou ordenar mais ou menos pelo tempo que conheço para tentar ser justo: Bruna, Moniky, Thais, Andressa, Mariana, Sanches, Renan, "Satânicos" (mesmo os murchos), Tatu, Andrômeda, Taffa, Queima, Gabi e BBX. Seja pelos perrengues, pelos rodízios de sushi, pelas vergonhas (que espero que não contem para ninguém), pelas pré-estreias mais hypadas do cinema, pelos Community Days, Interbios/BIFEs, pelas noites jogando Switch, pelos plantões jornalísticos e groselhagens. Vocês fizeram a diferença e tenho certeza de que sabem por que estão aqui e o quanto são importantes para mim.

Aos "Deshi": Barreto, Hein, Majin, Mona e Torrone. Não consigo imaginar como teria sido minha graduação (e minha vida no geral) sem a companhia de vocês, mas certamente seria pior (e olha que já vivemos em uma realidade que não é das melhores). Sempre podemos contar uns com os outros em momentos difíceis e para aqueles devaneios que vão longe demais. Amo vocês, seus "bobões".

À Rebecca Sugar e Masahiro Sakurai (e suas respectivas equipes) pelos valiosos momentos de distração e por me inspirarem com seus trabalhos realizados com muita dedicação e carinho.

E por último, mas, definitivamente, não menos importante, a minha família, em especial, meus pais, João Luiz e Maria de Fátima, por todo carinho e por sempre acreditarem no meu potencial e fazerem tudo ao alcance deles para me apoiar.

Obrigado a todos que cumprem o isolamento social e aos profissionais no combate à pandemia.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, bolsa do CNPq (130689/2018-1) e auxílio da FAPESP (2017/19680-2).

SUMÁRIO

Resumo07
Abstract
Introdução Geral
1.1. Ritmos biológicos09
1.1.1. Propriedades dos ritmos biológicos
1.1.2. Ritmo diário de atividade/repouso10
1.1.3. Sincronização dos ritmos circadianos11
1.1.4. Fotoperíodo14
1.2. Investigação do fotoperiodismo em um roedor subterrâneo: o
tuco-tuco15
1.2.1. O modelo animal
1.2.2. Indicações preliminares de sazonalidade e fotoperiodismo em
Ctenomys aff. knighti16
1.3. Local de estudo17
Hipóteses e objetivos gerais
Artigo publicado: "Annual variation of daily activity patterns and its
dependence on photoperiod: a quick overview"20
Manuscrito a ser submetido: "Photoperiod modulation of running-wheel
activity patterns and aftereffects in a subterranean rodent, the tuco-tuco"27
Conclusões gerais
Considerações finais43
Referências Bibliográficas45
Suplementos

RESUMO

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

Palavras-chave: cronobiologia, sincronização, fotoperiodismo, roedores subterrâneos, pósefeitos.

ABSTRACT

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

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

INTRODUÇÃO GERAL

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

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

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

1.1 Ritmos Biológicos

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

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

1.1.1. Propriedades dos ritmos biológicos

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

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

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

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

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

1.1.2. Ritmo diário de atividade/repouso

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

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

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



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

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

1.1.3. Sincronização dos ritmos circadianos

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

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

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



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

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

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



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

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

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



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

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

1.1.4. Variação Anual do Fotoperíodo

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

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

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

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

1.2.1. O modelo animal

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



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

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

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

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

1.2.2. Indicações preliminares de sazonalidade e fotoperiodismo em <u>Ctenomys aff.</u> <u>knighti</u>

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

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



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

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

1.3. Local do estudo

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



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

HIPÓTESES E OBJETIVOS GERAIS

Temos, como principais hipóteses:

I. Os tuco-tucos, apesar de serem roedores subterrâneos, apresentam capacidade de medição fotoperiódica, a ciclos diários de diferentes fotoperíodos, da mesma forma como outros roedores epígeos.

II. Os pós-efeitos dos animais submetidos a diferentes fotoperíodos irão reter informações da sincronização anterior, aumentando α nos fotoperíodos de fotofase curta, com diminuição em fotofase longa; em τ espera-se um aumento ou diminuição progressiva quanto mais extremo for o fotoperíodo experimental.

III. Tuco-tucos expostos previamente a fotoperíodos de dias curtos (capturados no inverno) e de dias longos (capturados no verão) apresentam diferentes padrões de sincronização para o mesmo fotoperíodo artificial.

Para testar essas hipóteses, temos como objetivos gerais:

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

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

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

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

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

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

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

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

A seguir apresentamos os principais achados e discussões do trabalho, contendo um artigo já publicado na revista *Sleep Science* em 2020, e um manuscrito ainda a ser submetido a uma revista da área.

ARTIGO PUBLICADO

Annual variation of daily activity patterns and its dependence on photoperiod: a quick overview

Autor

Giovane Carreira Improta

Afiliação

Laboratorio Binacional Argentina-Brasil de Cronobiologia, Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

Referência

Improta G.C. Annual variation of daily activity patterns and its dependence on photoperiod: a quick overview, in XV Latin-American Symposium on Chronobiology. Sleep Sci.2020;13(0): 59-62 DOI: 10.5935/1984-0063.20200015

Artigo de acesso livre (*open access*), licenciado sob Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License.

Resumo

Os ciclos ambientais do planeta Terra, como o ciclo claro/escuro diário (CE) e variação fotoperiódica anual (razão entre a duração dia/noite), podem sincronizar ritmos endógenos com períodos de 24h e 1 ano, respectivamente. Aqui, algumas evidências que apontam para uma interconectividade entre a sincronização dos ritmos circadianos e anuais serão brevemente expostas, apresentando de maneira mais notável a modulação anual dos ritmos diários de atividade/repouso em condições de campo e de laboratório.

Palavras-chave

Ritmos anuais, ritmo de atividade, sazonalidade, fotoperiodismo, mamíferos, infradiano.

Abstract

Earth's environmental cycles, such as daily light/dark (LD) and annual photoperiodic variation (ratio between day/night duration), can synchronize endogenous rhythms with periods of 24h and 1 year, respectively. Here some evidence pointing to an interconnectivity between the synchronization of circadian and annual rhythms will be briefly presented, most notably presenting the annual modulation of the activity/rest daily rhythms in field and lab conditions.

Keywords

Annual rhythms, activity rhythm, seasonality, photoperiodism, mammal, infradian.

1. Article

Life on Earth is subject to the influence of several regular natural cycles, most notably astronomical and geophysical ones. Synchronization of internally generated rhythms by environmental cues has conferred a great selective advantage on living organisms in our cyclic environment.

Among the endogenous biological rhythms, the best known are the circadian rhythms, called in this way (from the latin *circa+diem*) because they have a period of "about a day" (period of the Earth's day = 24h). The persistence of rhythms, with a period close to 24h under constant darkness (DD) was the central evidence that triggered the study of these rhythms. The structures responsible for the generation and regulation of endogenous circadian rhythms are called circadian oscillators¹ and, in mammals, they are anatomically located in the suprachiasmatic nuclei (SCN) of the hypothalamus². Circadian oscillators are synchronizable by environmental cycles called *Zeitgebers*. Zeitgebers' signals are able to induce adjustments in the dynamics of the oscillator thus attuning their timing in a process called entrainment.

Among the many rhythms that organisms can express in a circadian manner, the activity/rest rhythm is especially interesting because the temporal niche, associated with the daily light/dark (LD) cycle, allocates a set of behaviors in time thus optimizing energy expenditure and, essentially, the chance of individual survival and continuity of the lineage. Being active at a particular phase of day or night has enormous ecological significance, and it is through this timing system that organisms can anticipate various cyclical environmental challenges^{3,4}.

Under isolated conditions, some properties of self-sustained endogenous rhythms can be better studied, one of the most important being the period of oscillation (τ) in the absence of *Zeitgebers*. Biological rhythms with periods other than 24h are known as ultradian when their period is shorter than a day's duration (τ <24h), and infradian in the case of rhythms with a period longer than one day (τ >24h), as is the case with the circalunar and circannual rhythms. The latter display τ close to a year and is often synchronized by environmental cycles with periods of 1 year.

Despite the great reliability of the daily natural light/dark cycle generated by the Earth's rotational motion around its axis, the ratio between the duration of the two phases of this cycle (photophase - light phase, i.e. "day" and scotophase - dark phase, i.e. "night") is not the same all year round. The ratio between photophase and scotophase of the daily cycle is called photoperiod.

The annual variation in the photoperiod is caused by a tilt of about 23.5° - also known as obliquity - in Earth's rotation axis (period = 24h) from the plane in which it orbits the Sun (period = 1 year). Given this tilt, the planet receives uneven solar radiation and as the planet keeps orbiting the Sun, the side that is tilted towards the sun changes regularly: At the solstices, the hemisphere that is tilted towards the Sun enters summer and presents a longer photophase and shorter scotophase ("long days"), and the opposite hemisphere enters winter, with shorter photophase and longer scotophase ("short days"). This is followed by an equinox in which photophase and scotophase have a similar duration (fall and spring) and then another solstice switches the hemisphere tilted towards the Sun. Several annual biological rhythms have been studied and these events are related to adopting a temporal strategy to overcome an environmental challenge imposed by seasons. These strategies are usually divided into 3 categories⁵:

- *Dormancy* in which the organism physiologically regulates a state of metabolic depression, as in the case of estivation (quite common avoiding high temperatures and desiccation in summer, especially in equatorial and tropical areas), hibernation (during winter in temperate and polar zones) and diapause;
- (ii) *Seasonal polyphenism* refers to the programmed change in morphological phenotype to a more suitable form for a given season, as in the case of changing the color and thickness of the layer of fur or feathers;
- (iii) *Migration*, which involves spatial dislocation. Instead of adjusting physiology and morphology while remaining in their habitat, populations move annually to specific areas with proper climatic conditions and improved food availability.

Whatever the strategy adopted to overcome seasonal environmental challenges, radical changes in metabolism, behavior and a considerable amount of energy are required, therefore, a series of preparatory actions need to be taken in anticipation of the occurrence of these phenomena. Additionally, reproduction is usually also associated with a specific phase of the year, thus increasing the need for efficient timing between all these events⁶.

Just as the daily LD cycle synchronizes most of circadian rhythms, the annual variation of the photoperiod is currently viewed as the most important synchronizer for several annual rhythms⁷. The photoperiodic cue is involved in preparations that trigger some annual phenomena, and many authors call it a "proximate factor" - *i.e.*, the cue is transduced and initiates preparations for changes (*e.g.* pre-migratory hyperphagia), but not necessarily triggers the strategy (*e.g.* migration) by itself.

The role of photoperiod as an annual *Zeitgeber* found experimental evidence when Gwinner⁸ demonstrated synchronized circannual rhythms synchronized to "annual" photoperiods with periods other than 12 months. To some extent, this is equivalent to the synchronization of individuals to LD cycles with periods other than 24 hours in the circadian scale.

Back to the daily scale, some properties of an animal's daily activity/rest rhythm are closely associated with a specific phase of the LD cycle, for example, the activity onset. Wildlife monitoring studies in bears have shown, for instance, that the onset of daily activity already occurs before being exposed to dawn light, indicating that before daily light exposure, there is physiological and behavioral anticipation conferred by internal rhythms synchronized by environmental cycles⁹. Importantly the activity onset followed the changes in photoperiod all year long, delaying or advancing its timing accordingly, to later or earlier times of dawn in winter and summer, respectively. Studies on captive brown bears¹⁰ exposed to controlled photoperiod changes showed that daily activity is highly modifiable by food availability and photoperiod in a "stereotypical seasonal fashion", especially at some phases of the year.

In nature, as shown by Daan and Aschoff¹¹ with daily activity monitoring on captive birds and rodents under natural photoperiodic changes, there is variation in the onset phase, and also in activity duration (α) of the daily activity/rest cycle of various species throughout the year. The annual activity pattern and its degree of change are strongly associated with the

annual variation of the photoperiod (being more marked the greater the latitude, given the obliquity).

In parallel to the records of animals under the natural annual variation of the photoperiod, laboratory studies are conducted focusing on activity patterns under different photoperiods. In captivity, it is possible to manipulate the photoperiod simply by changing the times of lights on and off of artificial light/dark cycles in the confined environment while other variables are kept at desired levels. Despite the loss of the natural environment elements and the reduced ecological value of measurements, important aspects of rhythms are elucidated when the system is investigated in controlled environments.

By setting lights on and off times, important aspects of the activity pattern become quantifiable as in the study conducted by DeCoursey and collaborators¹² in which they found that despite changes in α under different photoperiods, the phase relationship (ψ) - i.e. the time difference between a phase of the LD cycle (for instance, lights-off) and of the activity onset - remains stable, that is, the time of activity onset in a nocturnal animal, for instance, changes throughout the year but the interval between dusk and activity onset remains the same. The stability of the phase relationship was so pronounced that it was even proposed to use it to distinguish between nocturnal and diurnal species.

However, it was found that ψ remained fixed only within a specific range of photoperiods (those photoperiods close to LD 12:12). Out of this limit, unusual phase responses appeared and it became difficult to model exactly how daily activity patterns change in response to different photoperiods throughout all photoperiod ranges¹³. In addition to the modulation of ψ , another important aspect of the annual modulation of daily activity rhythm by photoperiod is its effects on the daily duration of activity (α) with longer activity during summer for a diurnal animal, for instance. To understand the mechanism in which the duration of activity (α) varied throughout the year, it was proposed that the circadian oscillator is composed of two coupled oscillators (i.e., E - evening and M - morning). In 1976, Pittendrigh and Daan¹⁴, proposed and indicated that this model explained more sparingly "seasonal patterns" such as those found by Daan & Aschoff's work in 1975¹¹. It is now accepted that there is an emerging annual modulation of the daily rhythm generated by two coupled oscillators. The annual modulation of daily activity rhythm can be a useful measure to further understand this dynamic and to test this model¹⁵.

Photoperiod is capable of modifying the function or even the internal arrangement of some structures responsible for daily rhythms regulation. In birds, it has been found that the pineal gland (responsible for the circadian rhythms in birds) changes the pattern in which it releases melatonin in response to photoperiodic information, even when the gland is surgically removed and maintained *in vitro*, meaning that this structure is able to keep a record of the photoperiodic history by itself¹⁶. The pineal gland acts as a regulatory organ in vertebrate animals by secreting melatonin, a neurohormone with a conspicuous annual variation of daily release pattern, resembling in some manner the annual modulation of the daily activity patterns.

In mammals, astounding electrophysiological evidence show the persistence of distinctive photoperiodic induced (while, *in vivo*) neuronal activity patterns on hamster SCN slices (this time, *in vitro*)¹⁷.

There is still much to be discovered, given the complexity and vastness of factors involved in the timing of annual rhythms, especially on how the photoperiodic cues are translated into modulation of daily rhythms throughout the year.

While photoperiods with natural-like photophase and scotophase ratios reveal the stability of ψ , with major and important ecological implications, experiments with extreme "short days" and "long days" photoperiods help us unveil the oscillator dynamics involved in the processing and expression of annual rhythmic patterns.

New investigations could benefit from studies of natural, extreme photic environments. In our group, we have studied the tuco-tuco (*Ctenomys* aff. *knighti*), a subterranean rodent that exposes itself to light in random times throughout the day¹⁸. They have shown evidence for seasonal difference in their daily activity patterns: tuco-tucos caught in winter and summer had significantly different α on running wheel activity under captive conditions¹⁹ It is important to point out that exhibiting an annual rhythm does not necessarily mean that the organism is, undoubtedly photoperiodic. Further investigations are taking place to determine if the nature of these yearly changes are due to other seasonal cues in the subterranean, or if the photoperiod cue is sufficient to induce these modulations on activity patterns, as appears to be the case in most of the other mammals across the phylogeny.

Another interesting aspect of investigating a subterranean animal relies on modeling how much light exposure is capable of giving enough information for annual photoperiodic processing in extreme photic environments such as burrows and caves.

2. Acknowledgements

This work was only possible because of the inestimable discussions with Gisele Oda, Verónica Valentinuzzi, Horacio de la Iglesia, Danilo Flôres, Patricia Tachinardi, Milene Jannetti, Jefferson Silva, and Tamiris Yassumoto. I would like to especially thank Gisele Oda for the thoughtful proofreading and overall writing assistance, Johanna Barros for exceptional technical assistance on current experiments, Patrícia Komeih Romero for providing crucial language help, and the XV Latin American Symposium on Chronobiology (LASC) organizing committee.

Funding: This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001, scholarship from CNPq and additional grant from FAPESP (2017/19680-2).

3. Sources of funding

Argentina: FONCyT—Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica [grant PICT 2013/2753]; CONICET—Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas [grant PIP-11220120100415CO]; CRILAR Institution was supported by CONICET—Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas [grant PUE- 201622920160100125]; Brazil: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) -Finance Code 001, scholarship from CNPq; additional grant from FAPESP (2017/19680-2).

4. Ethics committee approval - (Not the central focus of this work. Referencing only the 19th citation)

Capture and experiments approved by CEUA/IB-USP (São Paulo, Brazil) under the protocols nº 319/2018 and Secretaría de Ambiente - Ministerio de Producción y Desarrollo Local (La Rioja, Argentina) nº 062/2008.

5. References

1. Dunlap C, Loros JJ, DeCoursey PJ. Chronobiology: biological timekeeping, editors. Sinauer Associates, 2004.

2. Moore-Ede MC, Czeisler CA, Richardson GS. Circadian timekeeping in health and disease: basic properties of circadian pacemakers. New England Journal of Medicine. 1938; 309.8: 469-476.

3. Halle S, Stenseth NC, editors. Activity patterns in small mammals. Berlin, Heidelberd:Springler-Verlag; 2000. pp. 217-243.

4. Tomotani BM, Flôores DEFL, Tachinardi P, Paliza JD, Oda, GA, Valentinuzzi VS. Field and laboratory studies provide insights into the meaning of day-time activity in a subterranean rodent (Ctenomys aff. knighti), the tuco-tuco. PLoS One. 2012; 7(5), e37918.

5. Tauber MJ, Tauber CA, Masaki S. Adaptations to hazardous seasonal conditions: dormancy, migration, and polyphenism. In: Hufftaker CB, Rabb RL, editors. Ecological entomology. California: Raleigh; 1984.

6. Kenagy GJ, Bartholomew GA. Seasonal Reproductive Patterns in Five Coexisting California Desert Rodent Species: Ecological Archives M055-002. Ecological Monographs. 1985; 55(4): 371-397.

7. Gwinner E, Helm B. Circannual and circadian contributions to the timing of avian migration. In: Avian migration. Springer, Berlin, Heidelberg; 2003. pp. 81-95

8. Gwinner E. Circannual systems. In: Biological rhythms. Springer, Boston, MA; 1981, pp. 391-410

9. Fortin JK, Schwartz CC, Gunther KA, Teisberg JE, Haroldson MA, Evans MA, et al. Dietary adjustability of grizzly bears and American black bears in Yellowstone National Park. The Journal of wildlife management. 2013; 77(2):270-281.

10. Ware JV, Nelson OL, Robbins CT, Jansen HT. Temporal organization of activity in the brown bear (Ursus arctos): roles of circadian rhythms, light, and food entrainment. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology. 2012; 303(9):R890-R902.

11. Daan S, Aschoff J. Circadian rhythms of locomotor activity in captive birds and mammals: their variations with season and latitude. Oecologia. 1975; 18(4):269-316.

12. DeCoursey PJ. LD ratios and the entrainment of circadian activity in a nocturnal and a diurnal rodent. Journal of comparative physiology. 1972; 78(3):221-235.

13. Elliott JA. Circadian rhythms and photoperiodic time measurement in mammals. In: Federation proceedings. 1976; Vol. 35, No. 12, pp. 2339-2346.

14. Pittendrigh CS, Daan S. A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. Journal of comparative physiology. 1976; 106(3):223-252.

15. Flôres DEFL, Oda GA. Quantitative study of dual circadian oscillator models under different skeleton photoperiods. Journal of Biological Rhythms. Forthcoming 2020.

16. Brandstätter R, Kumar V, Abraham U, Gwinner E. Photoperiodic information acquired and stored in vivo is retained in vitro by a circadian oscillator, the avian pineal gland. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2000; 97(22):12324-12328.

17. Mrugala M, Zlomanczuk P, Jagota A, Schwartz WJ. Rhythmic multiunit neural activity in slices of hamster suprachiasmatic nucleus reflect prior photoperiod. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology. 2000; 278(4):R987-R994.

18. Flôres DEFL, Jannetti MG, Valentinuzzi VS, Oda GA. Entrainment of circadian rhythms to irregular light/dark cycles: a subterranean perspective. Scientific reports. 2016; 6, 34264.

19. Improta GC, Oda GA, Valentinuzzi VS. The dependence of daily patterns of activity on photoperiod in a subterranean rodent (*Ctenomys* aff. *knighti*): Effects on synchronization and aftereffects of entrainment [abstract]. XV Latin American Symposium on Chronobiology. 2019.

MANUSCRITO A SER SUBMETIDO

Photoperiod modulation of running-wheel activity patterns and aftereffects in a subterranean rodent, the tuco-tuco

Autores

Giovane Carreira Improta¹ Gisele Akemi Oda¹ Verónica Sandra Valentinuzzi²

Afiliações

¹Laboratorio de Cronobiologia Binacional Argentina-Brasil, Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil; ²Laboratorio de Cronobiología Binacional Argentina-Brasil, Centro Regional de Investigaciones Científicas y Transferencia Tecnológica (CRILAR), Entre Ríos y Mendoza, s/n, Anillaco, La Rioja, Argentina.

Referência

Ainda não publicado.

Resumo

O ritmo de atividade/repouso é estudado em diversas espécies e apresenta, além do componente rítmico diário, uma modulação da fase de atividade que é sincronizada às mudanças do fotoperíodo ao longo do ano. No laboratório, as diversas variáveis que correspondem a mudanças ambientais sazonais podem ser controladas, testando, isoladamente cada um destes componentes. Este estudo apresenta um protocolo que envolve a administração de fotoperíodos artificiais (fotofase longa: CE 21:3, CE 18:6 CE 15:9; fotofase curta: CE 9:15, CE 6:18 e CE 3:21) em Ctenomys aff. knighti, capturados no verão e no inverno, verificando os padrões gerais do arrastamento e dos pós-efeitos. Observamos que os diferentes fotoperiódico. Os fotoperíodos artificiais, em condições de laboratório, foram suficientes para estabelecer diferenças na duração da fase de atividade entre animais em fotofases de dias curtos e de dias longos. Verificamos que animais capturados no verão e no inverno possuem diferenças no tempo necessário para estabelecer relação de fase estável quando submetidos a fotoperíodos artificias, evidenciado pelo número de transientes. Não foi observada uma mudança direcionada ou com padrão evidente no período de livre curso sob diferentes fotoperíodos.

Palavras-chave

Ritmo de atividade, fotoperiodismo, fotoperíodo artificial, pós-efeitos, arrastamento.

Abstract

The daily activity / rest rhythm is studied in several species and exhibit a modulation of the activity phase that is synchronized with the changes in photoperiod throughout the year. In the laboratory, the complex environmental factors that correspond to seasonal environmental changes can be controlled by testing each of these components in isolation. This study presents a protocol that involves the administration of artificial photoperiods (long photophase: LD 21: 3, LD 18: 6 LD 15: 9; short photophase: LD 9:15, LD 6:18 and LD 3:21) in Ctenomys aff. knighti, captured in summer and winter, looking at the general patterns of entrainment and aftereffects. We observed that the different photoperiods synchronize the animals with different phase angles of entrainment in relation to the LD cycle and establish differences in the duration of daily activity phase. We found that animals captured in summer and winter have differences in the time required to establish a stable phase relationship when subjected to artificial photoperiods, evidenced by the number of transients. There was no change in direction or an evident pattern in the period of free-running rhythm under different photoperiods.

Keywords

Activity rhythm, photoperiodism, artificial photoperiods, aftereffects, entrainment.

1. Introduction

The alternation between activity and rest times throughout a day – the daily activity rhythm - has long been studied in several species, both in field and in laboratory conditions. While field studies were limited due to technical difficulties of continues measurements, laboratory studies have relied on automated monitoring which provide long-term recordings facilitating rhythmic analysis. Rhythmic studies in rodents have particularly benefitted from the use of running-wheels, which provide clear activity/rest rhythms long assumed to be reasonable proxies of their activity patterns in the field.

The manipulation of artificial light/dark (LD) cycles in lab conditions have enabled several experiments to understand mechanisms of entrainment of the circadian oscillator, located in the suprachiasmatic nuclei (SCN) in mammals, which generate daily activity rhythms (Dunlap *et al.*, 2004, Moore, 1983). While LD12:12 (12 hours of light and 12h of darkness) is the most commonly used photoperiod in several chronobiological experiments, some studies verified the effect on activity patterns of maintaining the 24h period but changing photoperiod. Because photoperiod varies throughout the seasons in the field, these experiments could provide a simplified model to understand the role of photoperiod in seasonal variation of daily activity patterns (Tackenberg *et al.*, 2020).

In the field, activity onset times in several species have been shown to follow twilight times, which vary throughout seasons. Diurnal animals, for instance, start their activity earlier in summer and later in winter, following dawn times which become earlier in summer. During winter months, on the other hand, they start activity later, following later dawn times. The inverse occurs for nocturnal animals, which often follow dusk times (Gwinner & Helm, 2003).

According to these observations, there is a fixed phase difference between dawn and dusk times and the animals' activity onset (phase angle of entrainment), for diurnal and nocturnal species, that is maintained throughout seasons (DeCoursey, 1972). In addition to activity onset times, the total daily duration of activity (α : time interval between daily activity onset and offset) also changes across seasons, being shorter in summer and longer in winter for nocturnal animals.

It has been shown that these phase differences on activity onsets and α variation with the LD cycles are replicated in photoperiod manipulation experiments in the lab, using running wheel activity rhythms of model rodent species (Pittendrigh & Daan, 1976). When photoperiod is varied, around the natural range of photoperiods experienced in the field, activity onset of nocturnal animals closely follows lights-off times of the LD cycle, starting earlier under shortday artificial photoperiods that mimic winter times (Elliott, 1976). In the lab, however, it is possible to test what happens when artificial photoperiods are varied from extremely short-day to long-day ranges, much outside the range that they face in the field. The resulting patterns are very complex and have been explained using mathematical modeling (Flôres & Oda, 2020).

New investigations could benefit from studies of wild species, adapted to extreme photic environments, such as the subterranean. In the present work, we replicated these photoperiod experiments in a subterranean rodent species endemic of South America, known as tuco-tuco (*Ctenomys sp.*) (Tomotani *et al.*, 2012). Our previous studies have shown that they adapt easily to lab conditions and display robust nocturnal running-wheel activity rhythms under LD12:12 conditions, free running in constant darkness, showing that they possess a functional timing system entrainable to LD cycles (Valentinuzzi *et al.*, 2009). Here we submitted tuco-tucos to LD cycles with different photoperiods, to verify if, besides 24h entrainment, they are able to distinguish long and short day photoperiods, which potentially can synchronize their seasonal rhythms in nature, as appears to be the case in most of the other mammals across the phylogeny (Bradshaw & Holzapfel, 2007).

2. Material and Methods

This study was conducted between 2016 and 2019 in CRILAR (*Centro Regional de Investigaciones Científicas y Transferencia Tecnológica*) in Anillaco, La Rioja, Argentina (28° 48' S; 66° 56' W; altitude: 1,350 m), amid tuco-tuco's (*Ctenomys aff. knighti*) natural habitat. At the summer solstice, photophase duration for the region is approximately 13 hours and 59 minutes. This length is 3 hours and 41 minutes longer than the photophase during the winter solstice, when the sunlight lasts for roughly 10 hours and 18 minutes (Time and Date AS, 2020). All captures were held between January and February for "summer animals" and during July for "winter animals", after the respective solstices.

2.1. Animals: trapping and housing

Tubular traps made of rigid plastic (PVC) were placed in the entrance of active burrows. The traps did not injure or offer any threat to animals' body integrity and, to minimize any discomfort and stress, each trap was checked at least every 2 hours. After each capture, animals were weighed and sexed in the laboratory, under natural illumination from the window and controlled temperature ($24 \ ^{\circ}C \pm 2$).

Each animal was designated to an acrylic cage (53x29x27cm), with wood shavings for bedding, *ad libitum* feeding (food pellets, carrots, sweet potato, and diverse native plants, with non-cyclical replacement times) and equipped with a running-wheel (23 cm in diameter, 10 cm wide, 1 cm between the bars). Wheels were connected to the ArChron Data Acquisition System (Simonetta System-Universidad Nacional de Quilmes, Buenos Aires) and their revolutions were recorded continuously at 5-minute intervals.

After each experimental season, the animals were kept in the lab under natural photoperiod (window), ensuring a consistent sample size among groups for subsequent seasons. The ratio between freshly-caught animals and the ones that were already previously housed was maintained around 2:1 to 1:1 within the experimental groups described in the next section, and as even as possible between different groups.

Capture and laboratory procedures were approved by *CEUA*/IB-USP under the protocols n° 319/2018 (São Paulo, Brazil); *CICUAL/Secretaría de Ambiente - Ministerio de Producción y Desarrollo Local* n° 062/2008; and by the National Council for the Control of Animal Experimentation (*CONCEA*), under registration number 252/2016 (Proc. 16.1.273.41.1) (La Rioja, Argentina).

2.2. Experimental Protocol

The experiments were carried out inside opaque insulation boxes, equipped with dedicated systems for ventilation and illumination (light phase: fluorescent white lights - 1000 lux; dark phase: dim red lights - 5 lux), each isolation box supporting up to four cages. Running-wheel activity was monitored under artificial LD cycles inside these boxes. Running-wheel activity was chosen because, among the rhythms measured in the laboratory, it provides the most robust rhythms. Since the quantity of captured animals varied throughout days, the first captured animals were kept in the animal room under the natural photoperiod for at most 6 days, until each experimental group was complete and the insulation box was closed, preventing further interventions during the experiment.

The experimental protocol consisted in two stages (20 days each): I. *Experimental Photoperiod*, and II. *Constant Darkness (DD)*.

In the first stage, animals were exposed to one of the following artificial <u>photoperiods</u> (PP) regimens:

- LD 3:21 (lights-on (L) from 11:00 to 14:00);
- LD 6:18 (L from 09:00 to 15:00);
- LD 9:15 (L from 08:00 to 17:00);
- LD 15:9 (L from 06:00 to 21:00);
- LD 18:6 (L from 04:00 to 22:00);
- LD 21:3 (L from 02:00 to 23:00).

"LD" is the abbreviation used in the field of Chronobiology to readily describe the duration of photophase (L) and scotophase (D). Note that all experimental regimens above have the same period (24h), given by the sum of L and D durations.

In the second stage, animals were kept under DD, so that aftereffects from the previous artificial PPs could be measured.

This protocol was applied on winter- and summer- animals, that is, individuals captured during "short" and "long-day" natural PPs, respectively. Therefore, animals were categorized based on whether the experimental PP [short photophase (L<12h) or long photophase (L>12h) day] matched or not the PP that was prevalent when captured. The terminology "*matching*" subgroup (gray box in *Figure 1*) stands for subgroups in which the artificial PP matches the previous regimen, e.g., summer-caught animal exposed to LD 15:9. On the other hand, "*mismatching*" subgroups (white box in *Figure 1*) correspond to animals exposed to artificial PPs, opposite to their previous natural PP. Figure 1 summarizes the protocol and displays the sequence of conditions in each experimental group.



Figure 1. Sequence of events represented in the left by the vertical dimension, from upper to lower items: capture in nature, followed by the laboratory manipulations of experimental photoperiods (stage I) and finally DD (stage II). The distribution of the winter and summer animals in a Matching (left gray box) and a Non-Matching (right white box) group are indicated. The different artificial photoperiods used in each subgroup during the first experimental phase in the lab are expressed in hours of light followed by hours of dark. Sample size of each subgroup is specified below each column.

2.3. Data Analysis

Activity rhythms were plotted in El Temps (Diéz-Noguera, Universitat de Barcelona, 1999) and used to guide the following analysis, indicating general phase stability and overall patterns. Analysis of the actograms was done through visual inspection by three independent observers assisted by the "point-and read" tool of El Temps. Determination of daily activity onset was required to calculate phase angle of entrainment with respect to the LD cycle as well as determination of the free-running period in constant conditions. Other calculations and plots were conducted in R (R Core Team, 2019).

Considering the transitions involved in this protocol (*i.e.*, natural PP to artificial PP and finally to constant darkness), each part of the actogram represents a completely different moment of the animal's temporal reorganization (*e.g.*, first days of stage II – DD – exhibit aftereffects of the previous regimen (stage I), while, as time in DD elapses, a free-run is evidenced).

Activity rhythm parameters (onset, α) for each experimental stage were calculated based on selected intervals (3-4 days) to assure representative values in each actogram. For example, in animals in long-day PP regimens, negative masking by light interferes. In these

cases, we used the initial days under DD to quantify those parameters. This was based on Tomotani et al (2009) where it was shown that aftereffects of previous LD entrainment provide unmasked patterns of the endogenous component of entrained activity. For τ in the free-running DD condition, we considered day-by-day activity onsets, fitting a line through the onsets and evaluating the inclination. In some cases, activity offsets or smaller congruent segments of actograms were used to achieve this goal. Abnormal patterns (*e.g.*, unhealthy animals) were excluded from the analysis, adding to an unequal sample size among groups.

Kruskal-Wallis test was used to compare groups and T-student test was used for comparisons of activity duration (α) between summer (long photophase) and winter (short photophase) animals. All correlations were calculated under Kendall's rank correlation coefficient, a non-parametric alternative to Pearson's correlation, more suitable for cases containing smaller sample sizes, outliers, and tied values. Kendall's coefficient (tau) is also capable of indicating monotonic correlations, rather than only linear ones. This advantage comes with the trade-off of being more conservative in the numeric value of the correlation estimation (Akoglu, 2018). Most of the data is presented as 'mean \pm standard deviation', except where indicated.

3. Results

3.1. ENTRAINMENT PATTERNS UNDER ARTIFICIAL PHOTOPERIODS

3.1.1. Phase Angle of Entrainment

To verify if subterranean species are able to encode photoperiodic information, we tested the effects of different artificial PPs on tuco-tucos' daily activity patterns by verifying the phase relationship between daily activity onset times and lights-off times.

As already known for tuco-tucos under lab conditions, wheel-running activity occurred mainly during the dark phase (Figure 2). Pronounced activity bouts during the light phase occurred only in few individuals, under extremely long-day regimens (LD 21:3 and LD 18:6). For photic regimens in which the activity abruptly seemed inhibited during light phase, such as shown in Fig. 2F, activity onset and α were deduced from the first days under constant DD condition, when masking effects of lights are removed and previous entrainment patterns are maintained due to aftereffects.



Figure 2. Representative actograms of running wheel activity under artificial photoperiods from an extremely short photophase (left), and gradually increasing towards de right towards an extremely long photophase. The actograms shown here are from animals freshly caught and that were part of the "matching previous PP" subgroup. PP regimen is indicated by the LD bars (black for D and white for L phases) on top of each actogram. Animal ID and gender are also indicated on the top. Background colors are white for the light phase and dark gray for the dark phase.

Overall data, without distinguishing the photic antecedents (i.e., matching or mismatching subgroups), represented in figure 3A, shows that activity onset times track lights-off more prominently between PPs LD 15:9 and 9:15. Despite being already outside the natural PP range of La Rioja region, these photoperiods better approximate the natural one. The closest phase relation between lights-off and activity onset were observed in LD 12:12 (-0.12h. i.e., 0.12h after the lights were turned off) and LD 15:9 (+0.35h), both within the "natural range". As the artificial PP moved into the shorter-day direction (LD 18:6 and 21:3), this phase relation to lights-off tended to more negative values, while the opposite occurred for longer-day directions (LD 6:18 and 3:21). This pattern indicates that activity onset is not a direct response to the time of lights-off. Kruskal-Wallis test indicated that there is a difference in phase relationship between activity onsets and lights-on obtained in different artificial photoperiods groups ($\chi^2_{(5)} = 50.091$, p= 1.327e-09), the same can be said regarding phase relationship to lights-off ($\chi^2_{(5)} = 51.988$, p= 5,426e-10).

The activity onset pattern does not track lights-on or lights-off indefinitely, but rather, a complex process is displayed in which lights-on is tracked in short photophases (L< 12h) and lights-off is tracked in long photophases(L> 12h) (Fig. 3). Accordingly, Dunn's multiple comparisons post-hoc test have shown that there is no significant difference among pairs within long photophase (LD 21:3, 18:6 and 15:9) and short photophase (LD 9:15, 6:18 and 3:21) regimens. On the other hand, long and short photophase groups presented significant pairwise comparison differences, except for LD 15:9 which only shows significant differences with LD 3:21, but not with LD 6:18 and 9:15; the pairwise comparison between LD 21:3 and 9:15 was also not significant, although it was when lights-off was used as time reference. (*Supplemental Table S2 and S3- On "Suplementos"*).



Figure 3. Phase relationship between activity onset and the LD cycle during entrainment to artificial photoperiods from LD 21:3 to 3:21. The diagonal line represents the time of lights-off for each photoperiod indicated in the Y-axis. In A, squares (\Box) represent the general mean activity onsets for all measured individuals of each PP. In B, circles and triangles represent the general means of animals coming from previous PP that matched (\bigcirc) or mismatched (\triangle) the experimental artificial PP, respectively. The data in the LD 12:12 photoperiod (dark circle; •), "matching" and "mismatching" animals were obtained from a previous study in which animals had been caught between June and October 2007, n=8 (Valentinuzzi et. al., 2009). (A: Kruskal–Wallis test, p=1.327e-09, excluding data from LD12:12)

An increase in the standard deviations was detected the more the photoperiod diverged from LD 12:12, with the biggest values at the extreme photoperiods. We hypothesized that this divergence could be related to matching and mismatching subgroups responding differently to experimental PPs (in magnitude and rate of re-entrainment). For this reason, we verified if the responses of previously long-day and short-day animals to different artificial PPs could primarily diverge in the achieved phase relationship between onset time and the LD phase.

We also verified how many cycles it took to reach a stable phase (transients) for individuals in matching and mismatching subgroups. In Fig. 3B, we splitted the phase of entrainment attained by animals captured or previously maintained in photic conditions that matched (\bigcirc) or mismatched (\triangle) the artificial PP. Phase of entrainment in fact differed only between "matching" and "mismatching" animals under LD 6:18 (Mann–Whitney U test, p=0.042). LD 15:9 and 9:15 were the groups which presented the closest phase relations of activity onsets to lights-off and the most consistent values between these two subgroups (p>0.6).

Concerning general activity patterns, it is also important to point out that 13 actograms of all collected data lacked evidence of stable entrainment, showing patterns resembling relative coordination or no synchronization at all. This happened in six animals under LD 21:3 (5 from matching subgroup and one from mismatching), four animals under matching-LD 3:21 and three animals under matching-LD 18:6. One animal, previously exposed to mismatching-LD21:3 exhibited splitting in its free-running activity rhythm (Figure S12 on "Suplementos", animal #273).

3.1.2. Transient differences between matching and mismatching subgroups

In addition to the difference in the phase relationship to LD, we hypothesized a difference in the number of transients for entrainment in each of the subgroups, in which animals previously exposed to a mismatching PP would take more cycles to resynchronize.

Figure 4 summarizes the disparities between the matching and mismatching subgroups with respect to the number of transients. To establish a base for comparison, we only used short-day PP data. That was because masking of activity onset and offset by light in long-day PPs covered the progressive changes that would allow us to visualize the transients. The number of transients is statistically different between the subgroups of LD 3:21 (Fig.4B), which is the most extreme short-day photoperiod. Although all animals in matching subgroups under LD 6:18 and LD 9:15 had zero transients, the general distribution of the "mismatching" animals for the same PPs varied in a close range with no significant difference.



Figure 4. Comparison of transient lengths between "matching" and "mismatching" groups during entrainment to short-day artificial photoperiods. A: Selected actograms showing the transient cycles (indicated by brackets) under LD 3:21 for 'matching' (upper) and 'mismatching' (lower actograms) groups. Animal #220 was maintained in the lab and experienced these two scenarios (left column, top and bottom). The second column has data from freshly caught animals in winter and summer. B: Boxplots comparing values in animals subjected to different short-day photoperiods (LD 3:21, 6:18 and 9:15) and p-values using Wilcoxon signed-rank test.

3.2. AFTEREFFECTS OF ENTRAINMENTS TO ARTIFICIAL PHOTOPERIODS

Once animals are released into DD after entrainment to LD cycles, aftereffects can be observed. This phenomenon reflects long-term effects on the active phase duration (α) and on the free-running period (τ).

Figure 5 displays the general distribution of the data for α and τ obtained in each PP group as well as the order of the groups (from shorter to longer photophases) used in correlations tests. To analyze correlation of α with PP, we divided the experimental PP groups in two categories: Short L (LD 3:21, 6:18 and 9:15) and Long L (LD 15:9, 18:6 and 21:3). The mean α values for each of these categories differed significantly (Wilcoxon signed-rank test, p=00022). The mean α for Short L groups was 13.7 ± 2.1 hours while for Long L groups it was 11.8 ± 1.8 hours. Kendall's test showed no significant correlation between α and PP within Short L groups (p=0.95) and a weak positive, but significant (p=0.032), association between α and PP within Long L groups (Kendall's tau = 0.29).



Figure 5. Verification of photoperiod aftereffects in activity duration – " α " - and free-running period – " τ " -. A. Comparison of activity duration across all experimental PP groups, significant difference between Short L (LD:3:21, 6:18, 9:15; represented in darker gray) and Long L (LD 15:9, 18:6, 21:3; represented in lighter gray) group means (p=0.00022, Wilcoxon test). Each square represents the mean α measured for each animal during the first days of the DD-regimen. B. Distribution of average τ for each experimental PP, divided by groups matching (gray boxes and \bullet) and mismatching (white boxes and \blacktriangle) the prior PP. The dashed line represents a 24h period. No significant mean differences within each subgroup were detected. There was a significant negative correlation (Kendall's tau = -0.37) between τ values and progressively long photophases within matching subgroups, whereas no significant correlation was found within mismatching subgroups.

Figure 5B depicts free-running periods (τ) across all experimental PP groups, distinguishing matching and mismatching subgroups. This distinction was motivated because, at first glance, τ data looked differentially distributed between these subgroups. Pairwise comparison within each experimental PP showed no significant difference between these subgroups. However, a weak negative correlation between τ and photophase length was observed in the matching group (p= 0.0009, Kendall's tau = -0.37).

Confirming Valentinuzzi *et al.* (2009), τ was about 24h or longer in most individuals. Periods shorter than 24h were observed only 10 times (13,15% of evaluated animals), with 8 free-running individuals on Long L groups, 5 of them under LD 21:3-matching group alone.

4. Discussion and conclusions

4.1. ENTRAINMENT PATTERNS UNDER ARTIFICIAL PHOTOPERIODS

4.1.1. Phase Angle of Entrainment

Our measurements indicate that the circadian clock of tuco-tucos indeed process the photoperiodic information, resulting in differential patterns of activity during experimental photoperiods. In nocturnal animals, if activity were purely reactive to the presence or absence of light, it was to be expected that they would begin their activity as soon as the lights turned off and activity would occur over the whole scotophase, no matter the ratio between photophase and scotophase. We did not see this.

Under PPs more similar to the natural range (*i.e.*, LD 9:15 and LD 15:9), we verified that phase angles of entrainment are more aligned with lights-off, resembling in some manner, free living nocturnal

animals and their dynamic phase relations to sunrise and sunset throughout the year. In other groups, we saw a general tendency for *short* L photoperiods to exhibit the onset of activity after lights-off (negative angle of entrainment), while in *long* L photoperiods activity started hours before lights-off (positive angle of entrainment). This pattern is in accordance with data seen in other epigeous species (Elliott, 1976), and indicate that activity onset is not a mere response to the time of lights-off which varies throughout the seasons.

Given the characteristics of the phase response curve and what is predicted by mathematical modeling, it is known that for model rodents, activity patterns under short L tend to track the lights-on more prominently, while patterns arriving from long L regimens likely track lights-off more conspicuously (Flôres & Oda, 2020). Our data indicate that the same can be stated for tuco-tucos, since a line connecting short L points track the "lights-on vertical line", while the same for long L that track the slope of the "lights-off diagonal line".

Differently from what we first imagined, the increase in standard deviations on phase relationships as the PP becomes more extreme probably cannot be explained only by the fact that the experimental groups contained matching and mismatching subgroups in it, since only the LD 6:18 group showed a significant difference between the two subgroups (for psi). Even so, we can emphasize that the smallest difference between the subgroups occurs at LD 9:15 and 15:9, the least extreme groups within the experimental PP, and in which the expected impact of the animal's previous history would, hypothetically, have less influence. The response to extreme photoperiods probably has several peculiarities that go further beyond just the prior PP the animal was exposed to.

4.1.2. Transients

Transient's analysis showed us clearer distinctions between matching and mismatching subgroups. This was so despite the light masking that posed additional challenges, restricting our analysis just for short L PPs. "Skeleton" photoperiods could be used as a way to overcome those restraints, but this convenience would carry over other limitations as well (e.g., expected longer transients for all groups).

Animals from mismatching subgroups exhibited more transients when compared to animals from matching subgroups. This result was only significant between subgroups within LD 3:21, but it is important to note that, despite the small sample size, animals from matching subgroups presented zero transients on LD 6:18 and 9:15.

Among the differences that we expected to see between matching and mismatching subgroups, number of transients was the perfect example, since the previous PP directly affects how easily the rhythm will re-entrain to the next regimen, despite having no major effects on the phase angle of entrainment.

4.2. AFTEREFFECTS OF ENTRAINMENTS TO ARTIFICIAL PHOTOPERIODS

Once it is stated that the circadian clock of tuco-tucos in fact process the photoperiod information, establishing stable phase relations to experimental LD cycles, we turn our attention to aftereffects of entrainment. Much like winter and summer captured tuco-tuco's natural photoperiod aftereffects, our present experiments show that animals in short L / winter showed longer activity duration (α) than long L / summer animals under DD conditions. This evidence itself minimizes the possibility of this difference being due, for example, to the animal's physical state, due to the different availability of food in the two seasons, since artificial photoperiod alone together with *ad libitum* food and constant temperature was sufficient to promote a significant α difference under subsequent DD conditions.

Pittendrigh and Daan (1976) proposed that changes in the active phase (α) along the seasons are understood by a model of two-coupled oscillators (E - evening and M - morning), instead of the prevailing model of a single oscillator. This new model can explain more parsimoniously, the observed annual modulation in daily activity durations tuned by annual photoperiodic variations.

In addition to the α modulation observed in our data, the splitting phenomenon, present in Figure S12 (on "Suplementos", animal #273), is also explained by the two-oscillator model. In this case, evening and morning oscillators coordinate distinct components of activity bout that, in some extreme cases, can be expressed squeezed together, or pulled one from the other, until a new phase relationship is established.

Pittendrigh and Daan also were the first to investigate the aftereffects of different PPs in activity patterns, proposing that they would be displayed in different τ and α . Tackenberg *et. al.* (2020) conducted a broader study on the topic and, much like the findings in this work, found changes in α correlated with PPs, but did not perceive significant tendencies for τ .

Free-running period - τ - did not correlate with PP, or even within matching and mismatching subgroups, but it is remarkable that 5 of the 10 τ measures shorter than 24h occurred in the same subgroup: matching LD 21:3. This could be due to deeper effects that the prolonged exposure to long photophases induces, other than circadian entrainment. However, with the data we have collected so far, we cannot go further on these considerations.

4.3. ACTIVITY RHYTHMS AND REPRODUCTION

In mammals, the environmental light cyclical cue is perceived through the eyes, by intrinsically photosensitive retinal ganglion cells (ipRGCs), sending signals of this stimulus via the retinohypothalamic tract, reaching the SCN, where it is processed, entraining daily rhythms, adjusting their phase and period. At large, for some rhythms, the PP is, transduced in differential neuroelectric outputs in the SCN, resulting on modulated rhythms. The PP dependent changes in the angle of entrainment and the α of daily activity patterns is one of these results. Another output of this PP modulation is found on the daily pattern of pineal neurohormone melatonin, which is mainly controlled by the SCN. Long L PPs cause short daily melatonin rhythms and Short L PPs cause long daily melatonin rhythms. The duration of daily melatonin release is one of the main humoral outputs in the association of reproductive responses to short and long days. In this sense, it is expected that subterranean tuco-tucos have the potential to synchronize seasonal cycles, such as reproduction, by the annual variation of photoperiod.

5. Acknowledgements

This work was only possible because of the inestimable technical assistance from Johanna Barros in all experimental steps and remarkable discussions with Danilo Flôres, Patricia Tachinardi, Milene Jannetti, Jefferson Silva and Horacio de La Iglesia.

Funding: This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001, scholarship from CNPq and additional grant from FAPESP (2017/19680-2).

6. References

Akoglu, H. User's guide to correlation coefficients. *Turkish journal of emergency medicine*, 2018; *18*(3), 91-93.

Bradshaw, W. E., & Holzapfel, C. M. Evolution of animal photoperiodism. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 2007; *38*, 1-25.

DeCoursey PJ. LD ratios and the entrainment of circadian activity in a nocturnal and a diurnal rodent. Journal of comparative physiology. 1972; 78(3):221-235.

Diez-Noguera, A. El Temps, version 1, 1999; *Software available on the Web* at: < http://www.el-temps.com/>

Dunlap C, Loros JJ, DeCoursey PJ. Chronobiology: biological timekeeping, editors. Sinauer Associates, 2004.

Elliott JA. Circadian rhythms and photoperiodic time measurement in mammals. In: Federation proceedings. 1976; Vol. 35, No. 12, pp. 2339-2346.

Flôres DEFL, Oda GA. Quantitative study of dual circadian oscillator models under different skeleton photoperiods. Journal of Biological Rhythms. Forthcoming 2020.

Gwinner E, Helm B. Circannual and circadian contributions to the timing of avian migration. In: Avian migration. Springer, Berlin, Heidelberg; 2003. pp. 81-95

Moore-Ede MC, Czeisler CA, Richardson GS. Circadian timekeeping in health and disease: basic properties of circadian pacemakers. New England Journal of Medicine. 1938; 309.8: 469-476.

Pittendrigh CS, Daan S. A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. Journal of comparative physiology. 1976; 106(3):223-252.R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, 2019; Vienna, Austria. URL <<u>https://www.R-project.org/</u>>.

Tackenberg, M. C., Hughey, J. J., & McMahon, D. G. Distinct components of photoperiodic light are differentially encoded by the mammalian circadian clock. *Journal of Biological Rhythms*, 2020; 0748730420929217.

Time and Date AS. Sunrise and sunset calculator. 2020; https://www.timeanddate.com/sun/ (last accessed 29 June 2020).

Tomotani BM, Flôores DEFL, Tachinardi P, Paliza JD, Oda, GA, Valentinuzzi VS. Field and laboratory studies provide insights into the meaning of day-time activity in a subterranean rodent (Ctenomys aff. knighti), the tuco-tuco. PLoS One. 2012; 7(5), e37918.

Valentinuzzi, V. S., Oda, G. A., Araujo, J. F., & Ralph, M. R.. Circadian Pattern of Wheel-Running Activity of a South American Subterranean Rodent (Ctenomys cf knightii). *Chronobiology International*, 2009; 26(1), 14-27.

CONCLUSÕES GERAIS

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

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

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

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

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

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

CONSIDERAÇÕES FINAIS

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

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

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

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

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

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

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2017. Nobelprize.org. Nobel Media AB2014.Web.Disponívelem:<<u>http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2017/</u>>. Acesso em: 15 Mar2018.

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

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

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

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

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

SUPLEMENTOS

S1. Distribuição dos animais nos grupos experimentais

Tabela S1. Animais utilizados nos experimentos entre os anos de 2018 e 2019 identificando pelas colunas, respectivamente, a estação e ano em que houve a obtenção dos dados; o nome e número único de identificação; o sexo; a procedência (separando animais capturados naquela temporada - recém capturados (rc) - de outros animais que já estavam em cativeiro sob o fotoperíodo natural da janela – cativos (c)); o fotoperíodo experimental ao qual foram submetidos; e a se o fotoperíodo experimental seguia a tendência de dias curtos/longos da estação em que o experimento foi realizado (afim - "matching") ou não (oposto - "mismatching").

Estação	Ano	Nome	#ID	Sexo	Origem (<u>r</u> ecém <u>c</u> apturado/ <u>c</u> ativo)	Claro	Escuro	Tendência do Fotoperíodo
V	2018	Olguita	266	F	rc	21	3	afim
V	2018	Diana	260	F	с	21	3	afim
V	2018	Eleven	265	F	rc	21	3	afim
V	2018	Gesonel	257	F	с	21	3	afim
V	2018	Maui	262	М	с	21	3	afim
V	2018	Dolores	264	F	rc	21	3	afim
V	2018	Tucozilla	254	М	с	21	3	afim
V	2018	Merluza	253	F	с	21	3	afim
V	2018	Ghoul 2	311	М	с	21	3	afim
V	2018	Elsa	220	F	с	21	3	afim
V	2018	Menem	219	М	с	21	3	afim

V	2018	Valentina	247	F	с	18	6	afim
V	2018	BB-8	193	F	с	18	6	afim
V	2018	Rey	192	F	с	18	6	afim
V	2018	Joyce	267	F	rc	18	6	afim
V	2018	Mad Max	269	F	rc	18	6	afim
V	2018	Will	268	М	rc	18	6	afim
V	2018	Kelly Key	256	F	с	18	6	afim
V	2018	Carbon	172	М	с	18	6	afim
V	2018	Leonardo	242	М	с	18	6	afim
V	2018	Mr Pablo	249	М	с	18	6	afim
Ι	2018	Valentina	247	F	с	3	21	afim
Ι	2018	Elsa	220	F	с	3	21	afim
Ι	2018	Popis	272	F	rc	3	21	afim
Ι	2018	Ghoul 2	311	М	с	3	21	afim
Ι	2018	Diana	260	F	с	3	21	afim
Ι	2018	Quico	277	М	rc	3	21	afim
Ι	2018	Gesonel	257	F	с	3	21	afim
Ι	2018	Amanda	179	F	с	3	21	afim
Ι	2018	Sr Barriga	271	М	rc	3	21	afim

Ι	2018	Florinda	270	F	rc	3	21	afim
Ι	2018	Juana	213	F	с	3	21	afim
Ι	2018	Kelly Key	256	F	с	б	18	afim
Ι	2018	BB-8	193	F	с	б	18	afim
Ι	2018	Paty	278	F	rc	6	18	afim
Ι	2018	Rey	192	F	с	6	18	afim
Ι	2018	Girafales	274	М	rc	б	18	afim
Ι	2018	Carbon	172	М	с	б	18	afim
Ι	2018	Eleven	265	F	с	21	3	oposto
Ι	2018	Clotilde	275	F	rc	21	3	oposto
Ι	2018	Chaves	273	М	rc	21	3	oposto
V	2019	Rey	192	F	с	6	18	oposto
V	2019	Leonidas	300	М	rc	6	18	oposto
V	2019	Jon Snow	295	М	rc	6	18	oposto
V	2019	BB-8	193	F	с	б	18	oposto
V	2019	Ghoul 2	311	М	с	3	21	oposto
V	2019	Elsa	220	F	с	3	21	oposto
V	2019	Daenerys	294	F	rc	3	21	oposto
V	2019	Gesonel	257	F	с	3	21	oposto

V	2019	Noel	291	М	с	15	9	afim
V	2019	Natalina	290	F	с	15	9	afim
V	2019	Diana	260	F	с	15	9	afim
V	2019	Sansa	301	F	rc	15	9	afim
V	2019	Hodor	299	М	rc	15	9	afim
V	2019	Tyrion	298	М	rc	9	15	oposto
V	2019	Kelly Key	256	F	с	9	15	oposto
V	2019	Paty	278	F	с	9	15	oposto
V	2019	Solstício	292	М	с	9	15	oposto
Ι	2019	Netuno	326	F	rc	18	6	oposto
Ι	2019	Kelly Key	256	F	с	18	6	oposto
Ι	2019	Melisandre	290	F	с	18	6	oposto
Ι	2019	Orion	314	М	rc	18	6	oposto
Ι	2019	Ghoul 2	311	М	с	21	3	oposto
Ι	2019	Shiporo	336	F	rc	21	3	oposto
Ι	2019	Elsa	220	F	с	21	3	oposto
Ι	2019	Daenerys	294	F	с	21	3	oposto
Ι	2019	Arabella	325	F	rc	21	3	oposto
Ι	2019	Sol	313	F	rc	9	15	afim

Ι	2019	Marte	316	М	rc	9	15	afim
Ι	2019	Paty	278	F	с	9	15	afim
Ι	2019	Urano	335	F	rc	9	15	afim
Ι	2019	Hubble	321	F	rc	15	9	oposto
Ι	2019	Natalina	290	F	с	15	9	oposto
Ι	2019	Sansa	301	F	с	15	9	oposto
Ι	2019	Mamilo	337	М	rc	15	9	oposto

S2. Actogramas completos

As figuras de S1 a S19 correspondem aos actogramas de atividade em roda de todos os animais que participaram do experimento, subdivididos pelas temporadas de captura/experimentos entre 2018 e 2019. Todos os actogramas estão representados na forma de "*doubleplot*" para facilitar a observação de atividade noturna.

O protocolo experimental segue o descrito na seção de *Material and Methods (Artigo II)* e ilustrado na *Figure 1* na mesma seção. O protocolo conta com uma primeira etapa sob fotoperíodo artificial experimental (step I), seguido por uma etapa de escuro constante (step II). Em ambas as etapas, o sombreamento cinza dos actogramas corresponde a fase de escuro. As legendas estão em sua forma abreviada constando o fotoperíodo na notação "CE *horas de claro:horas de escuro*" e o subgrupo ao qual o fotoperíodo pertence em cada temporada (fotofase curta (C<12h): "afim" no inverno e "oposto" no verão; fotofase longa (C>12h): "afim" no inverno).





Figura S1. CE 18:6, subgrupo "afim".



Figura S2. CE 18:6, subgrupo "afim".



Figura S3. CE 18:6, subgrupo "afim".



Figura S4. CE 21:3, subgrupo "afim".



Figura S5. CE 21:3, subgrupo "afim".



Figura S6. CE 21:3, subgrupo "afim".

S.2.2. Grupos experimentais do inverno de 2018



Figura S7. CE 3:21, subgrupo "afim".



Figura S8. CE 3:21, subgrupo "afim".



Figura S9. CE 3:21, subgrupo "afim".



Figura S11. CE 6:18, subgrupo "afim".



Figura S12. CE 21:3, subgrupo "oposto".

S.2.3. Grupos experimentais do verão de 2019



Figura S13. CE 6:18, subgrupo "oposto".



hours hours hours Figura S15. CE 9:15, subgrupo "oposto".



hours

hours

Figura S16. CE 15:9, subgrupo "afim".

S.2.4. Grupos experimentais do inverno de 2019



Figura S19. CE 9:15, subgrupo "afim".



Figura S20. CE 15:9, subgrupo "oposto".

S3. Considerações sobre animais recém capturados e já cativos

O tempo de cativeiro alterará primordialmente a idade do indivíduo, o que por si só já é um fator que modifica os ritmos biológicos. Essa relação é uma questão complexa que requer uma investigação mais direcionada e com maior controle na idade dos indivíduos, o que dificilmente é possível em estudos com animais selvagens. Porém, com os dados obtidos, conduzimos uma rápida comparação entre animais recém capturados (rc) e os já cativos (c) do experimento de resposta à diferentes fotoperíodos articiais. Dentre os parâmetros destacáveis do padrão geral de atividade estão representados o *horário de início da atividade (activity onset)* - figura S21 e a *duração da atividade* (α) - figura S22:



Figura S21. Boxplot do horário de início da atividade em roda de animais recém-capturados (preto) e animais cativos (branco) com teste de Wilcoxon aplicado a cada par em cada um dos fotoperíodos experimentais, todos com o mesmo período de 24h (CE 3:21, 6:18, 9:15, 15:9, 18:6 e 21:3). Os pontos cinzas representam cada medida individual.

Ao comparar os horários de início da atividade entre os dois grupos utilizando o teste de Wilcoxon (teste não paramétrico) é possível afirmar que as médias entre os dois grupos (rc e c) não diferem significativamente. Mesmo sem diferenças significativas, é possível visualizar uma tendência geral dos animais cativos (em branco) iniciarem a atividade mais tarde do que os animais recém capturados (em preto), essa tendência não é verificada apenas no fotoperíodo CE 9:15, grupo que conta com um dos menores *n* amostrais do subgrupo, o que dificulta ainda mais esse tipo de comparação.



Figura S22. Boxplot da duração da atividade em roda de animais recém-capturados (preto) e animais cativos (branco) com teste de Wilcoxon aplicado a cada par em cada um dos fotoperíodos experimentais, todos com o mesmo período de 24h (CE 3:21, 6:18, 9:15, 15:9, 18:6 e 21:3). Os pontos cinzas representam cada medida individual.

Na comparação entre recém capturados e cativos no que diz respeito a duração da atividade (figura S22) observamos diferença significante entre os dois grupos nos fotoperíodos CE 6:18 e 18:6, assim como uma tendência geral de animais já cativos (em branco) terem um α menor em comparação com os animais recém capturados, excetuando-se apenas, novamente, o grupo sujeito ao fotoperíodo CE 9:15.

Análises mais aprofundadas foram realizadas para subgrupos dentro dos fotoperíodos CE 6:18 e 18:6 (os dois grupos com resultados significantes) de animais previamente expostos a fotoperíodos com a mesma tendência do fotoperíodo experimental (grupo "afim") e para animais expostos a fotoperíodos experimentais de tendência oposta ao fotoperíodo originário, mas essas análises ficaram muito subjetivas, uma vez que o tamanho dos subgrupos não era suficientemente grande para essas comparações. Futuramente, será realizada uma análise caso a caso acompanhando essas diferenças.

Mesmo a princípio não tendo noção da existência, direcionamento e magnitude dos possíveis erros advindos do uso de animais cativos e recém capturados, sempre procuramos manter a proporções iguais (entre machos e fêmeas, e animais recém capturados e já cativos) nos limites do que foi operacionalmente possível trabalhando-se com animais selvagens. Sendo assim, tomamos medidas para que os erros aleatórios, mesmo que expressivos, estejam minimizados com a igual distribuição destes entre os grupos.

S4. Tabelas contendo os valores do teste post-hoc de Dunn

Tabela S2. Tabela contendo a significância do p ajustado, pelo método Bonferroni, no teste de Dunn para a comparação entre o horário de início da atividade ("*onset*") e o horário de desligamento das luzes ("*L off*"). A indicação gráfica de significância segue o seguinte critério com base nos valores de p ajustado: ns (não-significante)>0,05, *<0,05, **<0.005, ***<0.0005, ****<0.0005.

psi L off x ONSET	3:21	6:18	9:15	15:9	18: 6	21:3
3:21						
6 :18	ns					
9:15	ns	ns				
15:9	*	ns	ns			
18:6	****	****	*	ns		
21:3	****	***	ns	ns	ns	

Tabela S3. Tabela contendo a significância do p ajustado, pelo método Bonferroni, no teste de Dunn para a comparação entre o horário de início da atividade ("*onset*") e o horário do acender das luzes ("*L on*"). A indicação gráfica de significância segue o seguinte critério com base nos valores de p ajustado: ns (não-significante)>0,05, *<0,05, **<0.0005, ****<0.0005, ****<0.0005.

psi L on x ONSET	3:21	6:18	9:15	15:9	18: 6	21:3
3:21						
6:18	ns					
9:15	ns	ns				
15:9	*	ns	ns			
18:6	***	*	*	ns		
21:3	****	****	***	ns	ns	