

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Faculdade de Medicina  
Programa de Pós-Graduação em Psiquiatria e Ciências do Comportamento



Melissa Alves Braga de Oliveira

Impacto da exposição precoce a diferentes sistemas de iluminação e  
fotoperíodo sobre o desenvolvimento do comportamento animal

Porto Alegre  
2018

Melissa Alves Braga de Oliveira

Impacto da exposição precoce a diferentes sistemas de iluminação e  
fotoperíodo sobre o desenvolvimento do comportamento animal

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Psiquiatria e Ciências do Comportamento, à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Psiquiatria e Ciências do Comportamento.

Orientador: Professora Doutora Maria Paz Loayza Hidalgo

Co-orientador: Professora Doutora Maria Elisa Calcagnotto

Porto Alegre  
2018

CIP - Catalogação na Publicação

Oliveira, Melissa Alves Braga  
Impacto da Exposição Precoce a Diferentes Sistemas  
de Iluminação e Fotoperíodo sobre o Desenvolvimento do  
Comportamento Animal / Melissa Alves Braga Oliveira.  
-- 2018.  
67 f.  
Orientadora: Maria Paz Loayza Hidalgo.  
  
Coorientadora: Maria Elisa Calcagnotto.  
  
Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa  
de Pós-Graduação em Psiquiatria e Ciências do  
Comportamento, Porto Alegre, BR-RS, 2018.  
  
1. Cronobiologia. 2. Iluminação artificial. 3.  
Comportamento de atividade/repouso. 4. Ritmos  
biológicos. I. Hidalgo, Maria Paz Loayza, orient.  
II. Calcagnotto, Maria Elisa, coorient. III. Título.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Tania e Solano, e à minha irmã Maíra, pelo amor, pelos exemplos, pelo suporte, pelos esforços e investimentos na minha educação e no meu crescimento até hoje. E aos demais familiares, em especial, à vó Darcy e à vó Marieta, por todas as orações e apoio incondicionais. Amo todos vocês!

À minha orientadora Maria Paz, pela confiança em mim depositada, por despertar em mim a paixão pela pesquisa, pelo investimento no meu crescimento, por toda a disponibilidade para orientar e ensinar, e por ter me tornado uma mulher muito mais confiante e consciente das minhas capacidades.

À minha co-orientadora, Maria Elisa, pelo apoio, por todos os ensinamentos e por me apresentar à eletrofisiologia.

Às amigas Juliana e Carol pelo companheirismo durante todos esses anos no laboratório. Sinto-me muito sortuda de tê-las ao meu lado, desde a graduação e agora para a vida (se bem que a Ju me persegue desde o Colégio Militar...rsrs).

À Alicia, pela amizade, pela sociedade, pelos conselhos e incentivos que me deram forças para seguir firme até o final.

À Luísa, pela disposição para dar aquele help na análise estatística, para revisar com o mais alto nível de TOC as figuras do trabalho, pelas ótimas sugestões e, claro, por ser uma pessoa tão querida, de fácil convivência e de ótimas sugestões de leituras.

Aos colegas do Laboratório de Cronobiologia e Sono, pela convivência alegre, sadia e divertida de todos os dias. É sempre um prazer lotar a sala do nosso laboratório no CPC ao lado de todos vocês!

Aos profissionais da Unidade de Experimentação Animal, especialmente à Marta, Daniela, Ana, Tuane, Rosa, Sônia, Maria e Vera por todo auxílio e suporte durante a realização dos experimentos. Tive a tranquilidade de realizar o meu projeto com a certeza de que o melhor para o bem-estar dos animais estava sendo feito, e de que as condições exemplares da Unidade dão todo o respaldo para que pesquisas sejam conduzidas com qualidade técnica e compromisso ético.

À Cláudia Grabinski e Everaldo Almeida pela solicitude e disposição para resolver os imprevistos do dia-a-dia.

Aos amigos que fiz no Colégio Militar, na dança, na UFRGS e na vida, pelo apoio durante essa jornada, pelas injeções de ânimo e por me fazerem sentir especial.

Ao Programa de Pós-Graduação em Psiquiatria e Ciências do Comportamento da UFRGS e às instituições de fomento à pesquisa: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, e à empresa Luxion Iluminações pelo incentivo fundamental à pesquisa científica e por oportunizarem a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	7
ABSTRACT .....	8
LISTA DE ILUSTRAÇÕES DA REVISÃO DE LITERATURA .....	9
LISTA DE TABELAS DA REVISÃO DE LITERATURA .....	10
LISTA DE ABREVIATURAS DA REVISÃO DE LITERATURA .....	11
1. INTRODUÇÃO .....	12
2. REFERENCIAL TEÓRICO .....	12
2.1 O ser humano, suas tecnologias e a luz elétrica.....	12
2.2 Luz artificial e Poluição luminosa .....	15
2.3 Necessidade evolutiva dos ritmos e o Sistema Temporizador Circadiano .....	17
2.4 Luz: principal <i>zeitgeber</i> e modulador do ritmo de atividade/repouso .....	21
2.5 Luz artificial e repercussão na saúde .....	24
3. JUSTIFICATIVA.....	27
4. HIPÓTESE .....	28
5. OBJETIVOS.....	29
5.1 OBJETIVO GERAL .....	29
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	29
6. ARTIGO.....	30
7. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	52
8. REFERÊNCIAS DA REVISÃO DE LITERATURA .....	53
9. ANEXO I.....	57
10. ANEXO II .....	61
11. ANEXO III.....	62

## RESUMO

**Relevância:** O crescente avanço na diversidade tecnológica apresenta consequências que nem sempre constituem vantagens a nossa condição. A descoberta e as melhorias relacionadas à luz elétrica transformaram o estilo de vida humano e a disseminação global foi inevitável. As mudanças foram tão expressivas que, atualmente, estamos cercados por um ambiente de poluição luminosa generalizada. Diante das consequências do excesso de luz artificial, é necessário que busquemos outras opções para a luz elétrica disponível, pois apesar de a luz ser extremamente importante para a nossa fisiologia normal, especialmente para os ritmos biológicos, a exposição desnecessária e inadequada à luz artificial podem afetar a saúde humana de diversas formas. **Objetivos:** O objetivo deste estudo foi avaliar o impacto da exposição precoce a diferentes sistemas de iluminação e fotoperíodo no comportamento de roedores durante as fases iniciais do desenvolvimento. **Métodos:** Considerando os modelos clássicos para estudo dos ritmos com exposição a condições constantes e variações naturais e sazonais de iluminação, ratos Wistar machos foram divididos em quatro diferentes grupos. Luz constante (LL); escuro constante (DD); luz circadiana acesa durante o fotoperíodo do ciclo claro/escuro 16:8h (CL); e luz padrão acesa durante o fotoperíodo do ciclo claro/escuro 16:8h (SL). A partir do dia do desmame, dados durante atividade e repouso foram coletados continuamente. Parâmetros para avaliação do comportamento de atividade/repouso foram obtidos através de análises de séries temporais. **Resultados:** Os animais dos grupos LL e DD apresentaram padrão típico *free-running* no ritmo de atividade/repouso, reproduzindo perfeitamente achados clássicos no campo da cronobiologia. Um pico de atividade foi detectado no grupo SL logo após o início da fase clara, o que não ocorreu no grupo CL. Isto indica que a mudança gradual na temperatura de cor da iluminação utilizada foi percebida pelos animais e isso influenciou o comportamento de atividade animal. As acrofases dos animais CL ocorreram antes em comparação com as dos animais SL, indicando a habilidade de predição do início da fase de atividade (escuro) em função da variação da luz. Os animais dos grupos DD, CL e SL exibiram o espectro de poder para os harmônicos do ritmo de atividade/repouso com o primeiro harmônico, o circadiano, sendo o mais forte durante praticamente todos os dias de registro. Por outro lado, os animais do grupo LL apresentaram uma evolução do harmônico mais forte sendo o ultradiano até o ponto onde o primeiro harmônico circadiano começou a se tornar o principal, o que ocorreu na terceira semana de avaliação. **Conclusões:** Nossos resultados sugerem que a luz circadiana é uma opção em potencial para minimizar os efeitos da poluição luminosa. De acordo com a nossa hipótese, a tentativa de simular as variações naturais de luz através da alteração gradual na temperatura de cor permitiu ao organismo antecipar as variações cíclicas do ambiente. Isto foi demonstrado pelas mudanças no comportamento de atividade de roedores. Para que o sistema de iluminação aqui proposto possa se tornar padrão para utilização em biotérios e para que seja utilizado em estudos clínicos, com o intuito de minimizar os efeitos da exposição excessiva à iluminação artificial em humanos, é necessário aprofundar os conhecimentos acerca dos efeitos deste sistema sobre o metabolismo, humor e ritmos cerebrais.

## ABSTRACT

**Relevance:** The unrestrained advances in technology have consequences that not always constitute advantages to our lives. The discovery and improvement of electric light transformed the life style of humankind and its worldwide dissemination was inevitable. The changes were so impressive that today, we are surrounded by an environment of general light pollution. As we are facing global consequences of artificial light in excess, it is necessary to search for other options of available electric light. Although light is extremely important for normal physiology, especially for biological rhythms, the unnecessary and inadequate exposure to artificial light can affect human health in many ways. **Objectives:** The objective of this study was to evaluate the impact of early exposure to different lighting systems and photoperiods on behavior during the initial phases of development in rodents. **Methods:** Considering classical models to study rhythms with exposure to constant conditions and the seasonal and natural variations of lighting, male Wistar rats were divided into four different groups as follows. Constant light (LL); constant dark (DD); circadian light on during photoperiod of light / dark cycle 16: 8h (CL); and standard light on during photoperiod of light / dark cycle 16: 8h (SL). Data during activity and at rest were collected continuously from the day of weaning. Parameters for behavioral evaluation of the rest/activity rhythm during development were obtained through the time series analysis. **Results:** The animals of the LL and DD groups presented a typical free-running rest/activity rhythm, perfectly reproducing the classic findings in the chronobiology field. A peak of activity was detected in the SL group shortly after the beginning of the light phase, but not in the CL group. This indicates that the gradual change in the color temperature of the applied illumination was perceived by the animals and it influences in the animal activity behavior. The acrophases of CL animals occurred earlier when compared to SL animals, indicating the ability of the animals to predict the onset of the (dark) activity phase due to the light variation. The animals from DD, CL and SL groups presented the power spectrum for harmonics for rhythm of rest/activity with the first harmonic, the circadian, the strongest during practically all recording days. On the other hand, the animals from LL group presented an evolution of the stronger ultradian harmonics up to the point when the first circadian harmonic started to become the main one, at the third week of evaluation. **Conclusions:** Our results suggest that the circadian light is a potential option to minimize the effects of light pollution. According to our hypotheses, the attempt to simulate the natural variations of light through the gradual alterations of color temperature, allowed the organism to anticipate cyclical variations of the environment. This was demonstrated by changes in the behavior activity of rodents. For a future use of the proposed lighting system as standard in animal facilities and in clinical studies, pursuing to minimize the effects of excessive exposure to artificial lighting in humans, it is imperative to understand deeply the effects of this system on metabolism, mood behavior and on the rhythms of the brain.



## **LISTA DE ILUSTRAÇÕES DA REVISÃO DE LITERATURA**

**Figura 1.** Mapa mundial do brilho artificial do céu durante a noite.

**Figura 2.** Evolução do consumo de eletricidade no mundo.

**Figura 3.** Diagrama mostrando as principais conexões das subdivisões do NSQ.

**Figura 4.** Modelo molecular simplificado do relógio circadiano de mamíferos.

**Figura 5.** Circuitos cerebrais e da retina subjacentes aos efeitos da luz nas funções visuais não dependentes de formação de imagem.

**Figura 6.** Representação gráfica da atividade locomotora.

## **LISTA DE TABELAS DA REVISÃO DE LITERATURA**

**Tabela 1.** Os três níveis de tecnologia de Allenby e Sarewitz aplicados à luz elétrica.

**Tabela 2.** Classificação dos ritmos biológicos de acordo com suas frequências.

## LISTA DE ABREVIATURAS DA REVISÃO DE LITERATURA

AVP – Arginina vasopressina

BMAL – do inglês, *Brain and Muscle ARNT like protein*

CFCs – Clorofluorcarbonetos

CK – do inglês, *Casein kinase*

CLOCK – do inglês, *Circadian Locomotor Output Cycle Kaput*

Cry – do inglês, *Cryptochromes*

GRP – Peptídeo liberador de gastrina

ipRGCs – Células ganglionares intrinsecamente fotossensíveis da retina

NSQ – Núcleo supraquiasmático

Per – do inglês, *Period*

REV-ERB – Receptor nuclear NR1D1

ROR – do inglês, *Retinoic Acid Receptor-Related Orphan Receptor*

SAD – Transtorno afetivo sazonal

TRH – Trato retinohipotalâmico

VIP – Polipeptídeo intestinal vasoativo

## 1. INTRODUÇÃO

Ser humano, em uma era tecnológica, implica frequente adaptação às inovações que surgem a cada dia, mesmo que estas não sejam de fato necessárias ou que não possuam seus possíveis “efeitos colaterais” previstos. A descoberta da lâmpada incandescente, que ocorreu há um pouco mais de um século, revolucionou a vida do homem e de todos os outros seres vivos que coabitam a Terra (1). No entanto, não apenas vantagens podem ser destacadas a partir do advento da luz elétrica, já que o fenômeno de poluição luminosa é uma realidade (2). Em sua maioria, as luzes artificiais apresentam intensidade e frequência bem distintas da luz do Sol, o que, do ponto de vista fisiológico, é importante ser levado em consideração (3).

Toda forma de vida que se desenvolveu precisou se adaptar às variações de claro-escuro e por isso diz-se que houve uma necessidade evolutiva de ritmicidade. Em mamíferos, o sistema temporizador circadiano é responsável pela gênese e manutenção dos ritmos, tendo o núcleo supraquiasmático (NSQ) como marca-passo central capaz de sincronizar os nossos ritmos endógenos aos do meio ambiente (4). A luz é a principal pista externa capaz de encarrilhar os nossos ritmos pois, na retina, possuímos células especializadas em detectar luz, bem como suas características de espectro e intensidade e, através do trato retino hipotalâmico (TRH), essa mensagem chega ao NSQ. Com efeito, a luz é responsável por modular diversas funções no nosso organismo, dentre elas o ritmo de atividade/repouso (5).

Considerando a importância da luz para regulação dos nossos ritmos e as evidências mostrando os efeitos negativos da exposição indiscriminada à luz artificial para a saúde (6,7), se faz necessário aprofundar os conhecimentos acerca dos efeitos de diferentes sistemas de exposição à luz artificial.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 O ser humano, suas tecnologias e a luz elétrica

Desde o surgimento da espécie *Homo sapiens*, as invenções e tecnologias, ainda que primárias, tinham o simples papel de satisfazer determinada necessidade, mas sem a relação de total dependência observada nos dias atuais. Atualmente, ela não se restringe a uma satisfação pessoal por ter a tecnologia à disposição, mas uma dependência que abrange relações muito mais complexas na medida em que não é possível imaginar o ser humano, as

sociedades e a Terra sem as tecnologias existentes. Segundo Harari (8), estamos vivendo uma era em que o significado do que é ser humano incorpora o conceito de complexidade e mudanças tecnológicas. Desta forma, Braden Allenby e Daniel Sarewitz propuseram uma classificação em três níveis dos possíveis efeitos da tecnologia e suas interações (9). O primeiro nível compreende a realidade da efetividade imediata da tecnologia usada por aqueles que anseiam por alcançar algo, e.g. um avião que carrega uma pessoa de forma bastante segura de um lugar para outro. A rede de transporte aéreo, que é um sistema sócio-tecnológico complexo, muito menos previsível e mais complicado que o próprio avião, ocupa o nível dois de tecnologia. Por fim, o nível três engloba os sistemas de tecnologia que com suas interações são tidos como *transformative Earth systems*.

Diante desta classificação e do vislumbre da crescente inserção da tecnologia nas nossas vidas, pode-se perceber que a grande questão é a constante problematização das nossas condições, que culmina em uma intensa busca por novas soluções. Como se houvesse um compromisso cultural para tornar o mundo melhor, criamos imensas quantidades de tecnologias que acabam produzindo interações difíceis de prever e controlar (9). O avanço desenfreado das mais diversas tecnologias traz consigo consequências que não representam somente vantagens a nossa condição, e que podem se transformar em outros “problemas”, que vão necessitar outras “soluções”. Com o intuito de tornar os desafios relacionados às tecnologias menos imprevisíveis, é essencial que comecemos a pensar em uma rede de opções, tanto tecnológicas como sociais, que possam estar disponíveis no caso das tecnologias existentes começarem a produzir efeitos indesejados. A partir da classificação destes dois autores, podemos refletir sobre o impacto de uma das principais descobertas do homem - a luz elétrica- bem como das demais tecnologias relacionadas a ela na vida dos seres que habitam a Terra.

A **Tabela 1** esboça três níveis de tecnologia, definidos por Allenby e Sarewitz, aplicados à luz elétrica.

**Tabela 1 - Os três níveis de tecnologia de Allenby e Sarewitz aplicados à luz elétrica.**

	Metas e Efeitos	Implicações para Ação
Nível I	Iluminação de casas e vias públicas;	Poder aquisitivo tanto do Estado para instalação das redes quanto dos usuários para pagar por seus consumos;
Nível II	Possibilidade de trabalhar em ambientes até então escuros e promover melhoria na segurança pública;	Pressão econômica para o trabalho noturno e investimento do Estado em segurança pública;
Nível III	Autonomia para escolha de quando é dia e quando é noite, sem limites para quando produzir (trabalho noturno), poluição luminosa tendo impacto tanto na saúde do ser humano quanto de outros seres vivos, modificando o ecossistema;	A cultura do “tempo é dinheiro” e “o que você faz de meia-noite às 6h”, somado ao custo da energia já se encarregam de assegurar que não haja empecilhos;

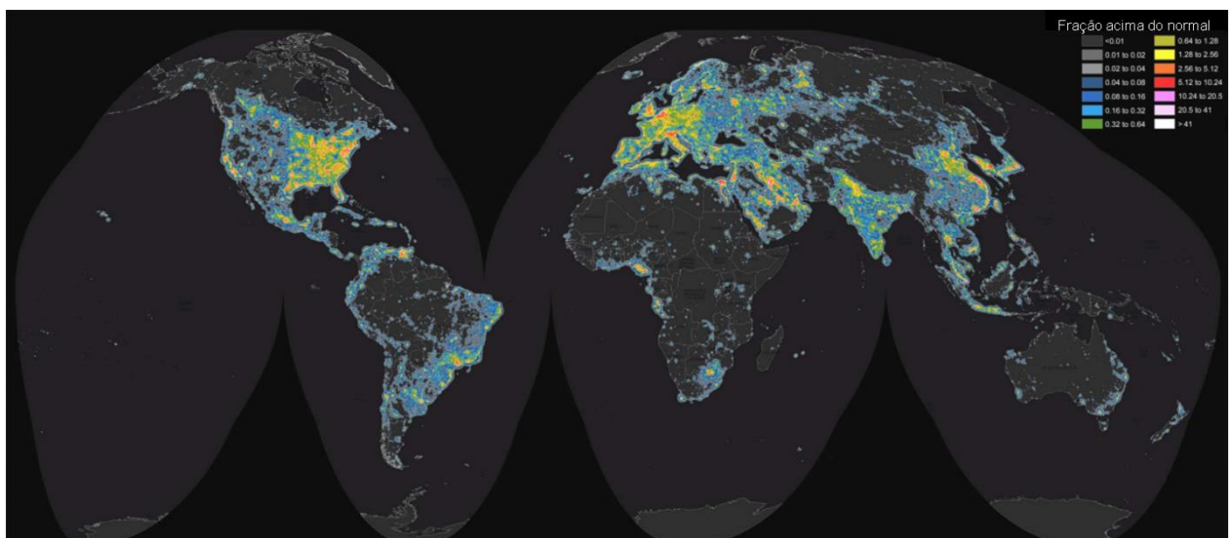
A tentativa de o homem eliminar o escuro vem desde a utilização do fogo, passando pelos lampiões abastecidos com óleo de baleia. A descoberta da luz elétrica é muito recente na história da civilização, mas já é quase impossível imaginar a vida sem ela. Historicamente, depois da recém-descoberta eletricidade, a primeira tentativa de utilizá-la para iluminação artificial foi feita por Sir Humphrey Davy em 1801 ao observar que um condutor energizado produzia incandescência. Mais tarde, Davy desenvolveu a primeira lâmpada de arco voltaico. Trinta anos depois, William Staite melhorou o design da Davy e, usando o gerador elétrico inventado por Michael Faraday, tornou a lâmpada mais eficiente e confiável. Em 1841, Frederick de Moleyns registrou a primeira patente para uma lâmpada incandescente e quatro décadas depois, Joseph Swan demonstrou a primeira lâmpada incandescente prática no UK. Embora Thomas Alva Edison não tenha inventado a lâmpada incandescente per se, era um ótimo homem de negócios e, adquirindo a patente da lâmpada incandescente, ele melhorou muito seu design, tornou-a mais eficiente, confiável e acessível e, neste mesmo ano (1879), fez sua primeira demonstração pública onde prometeu: “We will make electricity so cheap that only the rich will burn candles” (1).

Apesar do sistema de corrente contínua defendido por Edison para distribuição de eletricidade ter sido responsável por iluminar as casas nos Estados Unidos por alguns anos,

foram as descobertas de Nikola Tesla introduzindo os sistemas de geradores, transformadores, motores, fios e luzes a corrente alternada, mais flexíveis e eficientes que construíram o futuro para a distribuição de energia elétrica em larga escala que iluminaria o mundo a partir de meados de 1885 (10).

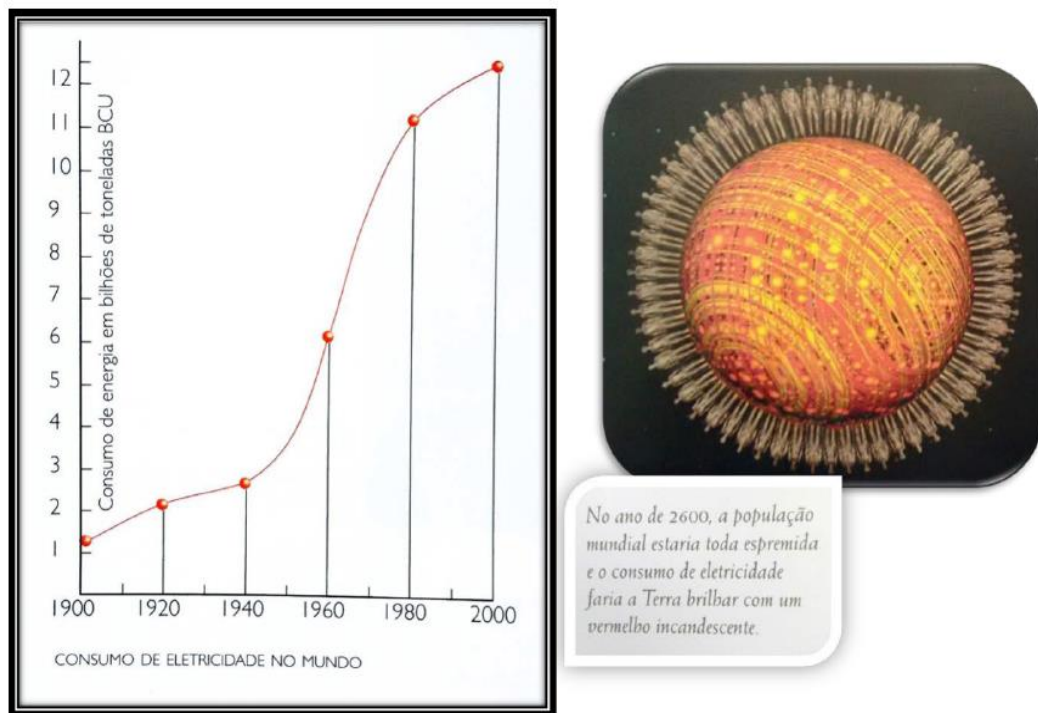
## 2.2 Luz artificial e Poluição luminosa

Com as melhorias que tornaram a luz elétrica barata e eficiente, a disseminação mundial foi inevitável e, atualmente, a realidade que nos circunda é a de poluição luminosa (2). O mais recente atlas de iluminação artificial no céu durante a noite (**Figura 1**) nos mostra que mais de 80% do mundo e mais de 99% da população dos Estados Unidos e da Europa vivem noites mais claras, ou seja, com níveis de poluição luminosa acima do normal (11). Além de as nossas noites serem iluminadas, outro problema relacionado à disponibilidade de luz artificial é o fato de spendermos grande parte dos nossos dias em ambiente fechados expostos a elas. Já é bem sabido que a intensidade da iluminação ao ar livre varia de 2000 a 100.000 lux, enquanto a iluminação geralmente utilizada em escritórios tem em torno de 500 lux (3). Além disso, a iluminação fluorescente apresenta menor quantidade de comprimento de onda curto (espectro azul) que a luz natural, justamente o componente do espectro considerado altamente relevante para que os efeitos biológicos não visuais da luz sejam alcançados (5).



**Figura 1 - Mapa mundial do brilho artificial do céu durante a noite.** O mapa mostra o brilho do céu com origem em iluminação artificial com relação ao brilho natural.

Stephen Hawking, no livro “O universo numa casca de noz” (12), faz uma prospecção sobre o tamanho do problema a ser enfrentado baseado no crescimento do uso da iluminação artificial. Estima-se que se continuarmos no mesmo ritmo de crescimento populacional e de consumo de eletricidade, no ano de 2600, a população viverá em uma enorme aglomeração; e a eletricidade, principalmente na forma de luz, deixará a Terra com um brilho quase incandescente, não sendo possível ver as divisões dos diferentes continentes do espaço (**Figura 2**).



**Figura 2. Evolução do consumo de eletricidade no mundo. Esquerda:** Consumo de energia mundial total em bilhões de toneladas de BCU (*Bituminous Coal Unit*), onde 1 tonelada ~Unidade de Carvão Betuminoso = 8,13 MW-hr. **Direita:** Ilustração da estimativa de como será a visão da Terra em 2600.

Fonte: Adaptado de “O Universo numa Casca de Noz” 2001.

Diante do problema global de excesso de luminosidade artificial, que não era previsível quando a tecnologia relacionada à luz elétrica atingiu o nível III, se faz necessário que comecemos a pensar em outras opções para a luz elétrica disponível. Isso pois, como veremos a seguir, a luz possui extrema importância para a fisiologia dos organismos que habitam a Terra, especialmente no que se refere a regulação dos ritmos biológicos.



### 2.3 Necessidade evolutiva dos ritmos e o Sistema Temporizador Circadiano

À ciência que estuda os ritmos biológicos dá-se o nome de cronobiologia. Esses ritmos são identificados na imensa maioria dos seres vivos, apresentando durações e frequências diferentes dependendo do seu papel na fisiologia de cada ser vivo (13). Primeiramente é fundamental entender como e por que esses ritmos existem e sua relação para a manutenção do equilíbrio do nosso organismo.

Os sistemas das diversas formas de vida desenvolveram mecanismos para que fosse possível identificar as variações do ambiente, ou seja, um relógio biológico, e por isso, diz-se que houve uma necessidade evolutiva de ritmicidade (14). Todas as formas de vida que se desenvolveram na Terra precisaram adaptar-se às variações do ambiente que existem em função dos movimentos de rotação e translação do nosso planeta (15). Desta forma, prever as mudanças de claro/escuro, as variações de temperatura, os períodos de grande aridez bem como de chuvas torrenciais foram de extrema importância para a sobrevivência dos seres. Dispor deste relógio biológico permite ao organismo antecipar-se a determinados acontecimentos cíclicos e, desta forma, estar preparado para explorar determinadas situações ambientais desde o primeiro momento em que se manifestarem. Assim, se o organismo funciona de forma paralela ao ambiente, ele é capaz de sincronizar processos fisiológicos e comportamentais, a fim de otimizar a homeostase energética e aumentar a sobrevivência (13).

Um dos primeiros estudos desta área de cronobiologia é datado de 1729, quando o astrônomo francês Jean Jacques d'Ortous de Mairan observou o abrir e fechar das folhas da planta *Mimosa* e publicou o primeiro experimento no qual se demonstra a existência de ritmos circadianos em plantas. Durante o dia as folhas permaneciam abertas e durante a noite se fechavam, porém quando esta foi colocada em um ambiente escuro e sem contato com as variações de luz do ambiente, a planta continuava abrindo e fechando as folhas de maneira rítmica, conforme os dias e as noites (16). Ainda não se sabia qual estrutura era responsável por regular esse comportamento, mas conforme os estudos na área da cronobiologia avançaram, uma natureza altamente conservada no que se refere ao relógio através de diversos organismos, incluindo cianobactérias, fungos, plantas, *Drosophilas* e mamíferos foi sendo descoberta (17).

Os ritmos biológicos podem ser classificados de acordo com sua frequência em três grandes grupos: ritmos circadianos, ultradianos e infradianos. O termo *circadiano* foi aplicado

pela primeira vez por Franz Halberg em 1959, e de acordo com o seu significado os ritmos circadianos têm períodos de cerca de um dia, mais precisamente entre 20 e 28 horas (4). Os ritmos cujos períodos duram menos de 20 horas são ditos ultradianos e os que duram mais de 28 horas são chamados infradianos.

Na **Tabela 2** encontramos alguns exemplos de ritmos biológicos verificados em seres humanos e suas respectivas classificações (13,18).

**Tabela 2 - Classificação dos ritmos biológicos de acordo com suas frequências.**

Ritmo	Período	Exemplos
Circadiano	<u>1 CICLO POR DIA</u> ~24h (entre 20 e 28 horas)	Temperatura corporal Níveis de cortisol Níveis de melatonina Ciclo sono-vigília
Ultradiano	<u>MAIS DE 1 CICLO POR DIA</u> Menos de 20 horas	Respiração Batimentos cardíacos Secreção LH
Infradiano	<u>MENOS DE 1 CICLO POR DIA</u> Mais de 28 horas	Ciclo menstrual

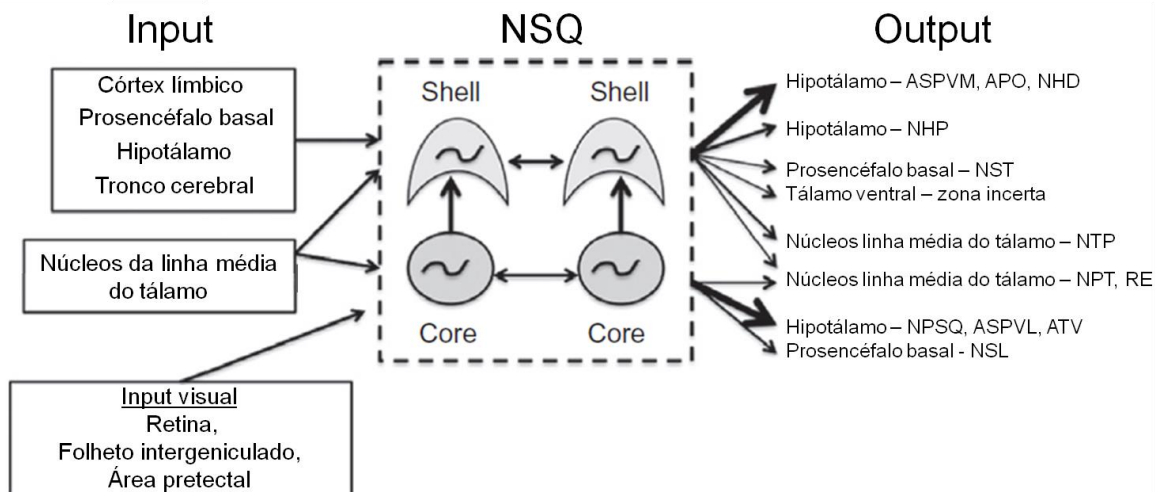
LH - Hormônio luteinizante

Considerando que os seres vivos desenvolveram ritmos para sua adaptação e sobrevivência, os estudos que se seguiram a descobertas como a de Mairan buscaram descobrir como esses ritmos eram gerados. Nesse contexto, descobriu-se que o sistema temporizador circadiano, definido como uma rede de estruturas interligadas tem como finalidade coordenar os sistemas regulatórios hipotalâmicos impondo uma organização temporal de processos fisiológicos e estados comportamentais para promover adaptação ambiental. Desta forma, o sistema consiste em *inputs* que transmitem informação ao marca-passo circadiano, o próprio marca-passo e o mecanismo que permite expressão dos outputs rítmicos (4,19).

As evidências obtidas até hoje mostram que, em mamíferos, a figura central desse sistema ou marca-passo circadiano é o NSQ localizado no hipotálamo (20). O papel dessa estrutura na gênese dos ritmos foi descoberto em 1972, simultaneamente, por dois laboratórios de pesquisa dos Estados Unidos, coordenados pelos pesquisadores Robert Y. Moore e Irving Zucker (21). Nos artigos publicados por ambos naquele ano, roedores foram

submetidos a lesões hipotalâmicas, restritas aos NSQs, e alterações em ritmos de atividade motora, de consumo de água (22) e de corticosterona (23) foram detectadas.

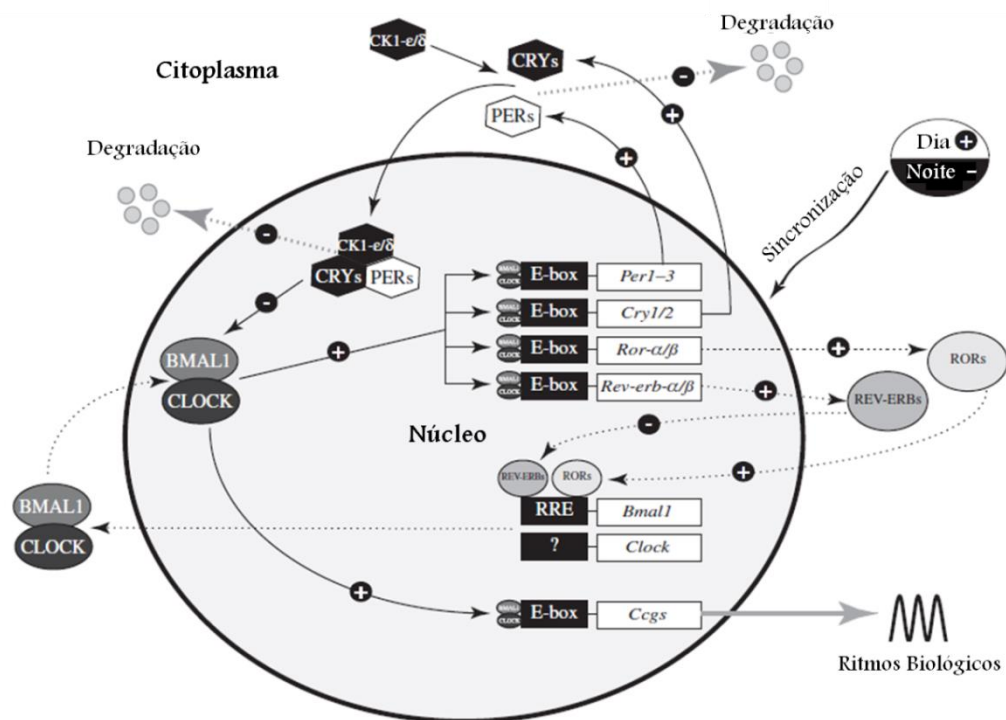
O que denominamos NSQ na verdade são dois núcleos simétricos, com formato oval, situados na parte inferior do hipotálamo, ao lado das paredes inferiores do terceiro ventrículo e dorsalmente ao quiasma óptico. A denominação que por vezes trata esses núcleos como se fossem uma única estrutura se dá em razão de estarem interconectados através de muitos circuitos locais e funcionalmente atuarem como um só. De acordo com critérios anatômicos e neuroquímicos, é possível diferenciar duas zonas dentro de cada NSQ: a subdivisão situada acima do quiasma óptico e predominantemente preenchida por neurônios imunorreativos a polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP) e peptídeo liberador de gastrina (GRP) são designados como "core" e a subdivisão que está acima dela contendo neurônios imunorreativos a arginina vasopressina (AVP) é designada como "shell". Apesar de essa divisão ser comum tanto para o NSQ de seres humanos quanto para o de roedores, nos humanos a formação é mais difusa e é proporcionalmente muito menor (4). O conjunto das vias aferentes e eferentes que compõe o sistema temporizador circadiano estão descritos na **Figura 3**.



**Figura 3. Diagrama mostrando as principais conexões das subdivisões do NSQ.** NST, núcleo da estria terminal; NHD, núcleo hipotalâmico dorsomedial; NSL, núcleo septal lateral; APO, área pré óptica; NPT, parataenial nucleus; NPSQ, núcleo perisupraquiasmático; NHP, núcleo hipotalâmico paraventricular; NTP, núcleo paraventricular do tálamo; RE, núcleo reuniens; ASPVL, área subparaventricular lateral; ASPVM, área subparaventricular medial; ATV, área tegmental ventral; ZI, zona incerta.

Fonte: Adaptado de Moore 2013.

Com o aprofundamento e avanço das pesquisas, descobriu-se que no cerne do sistema temporizador está um mecanismo molecular que marca o tempo de forma específica em diversos tecidos pelo corpo. No entanto, esses ritmos, ainda que independentes, são sincronizados pelo NSQ, como um regente que organiza os diferentes instrumentos em uma orquestra, de acordo com o input fótico que ele recebe do meio externo. Jeffrey C. Hall, Michael Rosbash e Michael W. Young foram os ganhadores do Prêmio Nobel em Fisiologia ou Medicina de 2017 justamente pelas descobertas dos mecanismos moleculares que controlam os ritmos circadianos. Com os dados obtidos por estudos genéticos tanto em moscas quanto em camundongos, hoje podemos considerar que cada célula possui seu relógio interno, e o mecanismo intracelular que permite que isso ocorra envolve a interação de circuitos de retroalimentação transcricionais positivos e negativos (19,24). A maquinaria inclui os genes do relógio (do inglês *clock genes*) *Clock*, *Bmal1*, *Per1*, *Per2*, *Cry1* e *Cry2*, que são essenciais para a geração de oscilações circadianas (**Figura 4**). A estabilidade das proteínas do relógio é regulada de forma que haja o ajuste das oscilações ao período de 24 h. Estas oscilações moleculares ocorrem tanto em neurônios do NSQ quanto de fora, e em células periféricas, sendo redefinidas por sincronizadores externos ou internos (25). Aos sincronizadores ou encarrilhadores externos, damos o nome de *zeitgebers*.



**Figura 4. Modelo molecular simplificado do relógio circadiano de mamíferos.** Alças de retroalimentação transcricionais-traducionais negativas (-) e positivas (+) marcam a ritmicidade circadiana. No núcleo do relógio (setas sólidas), os fatores de transcrição *Bmal1* e *Clock* formam um

heterodímero para regular a sua própria transcrição e de outros genes do relógio (e.g. famílias Per e Cry) através da ligação com promotores E-box. Os receptores nucleares Rev-erb- $\alpha/\beta$  e Ror- $\alpha/\beta$ , formam alças de retroalimentação auxiliares (setas tracejadas) para inibir e ativar a transcrição e tradução de Bmal1 e Clock respectivamente. Em geral, essas alças de retroalimentação positivas e negativas estão sincronizadas aos ciclos claro-escuro e estão diretamente envolvidas na regulação dos genes controlados pelo relógio molecular (Cggs) que geram uma grande variedade de ritmos biológicos circadianos. Caseína cinase 1 épsilon e delta (CK1- $\epsilon/\delta$ ) fosforila CRYs e PERs e, por fim, leva-os à degradação.

Fonte: Adaptado de Zubidat e Haim 2017.

## 2.4 Luz: principal *zeitgeber* e modulador do ritmo de atividade/repouso

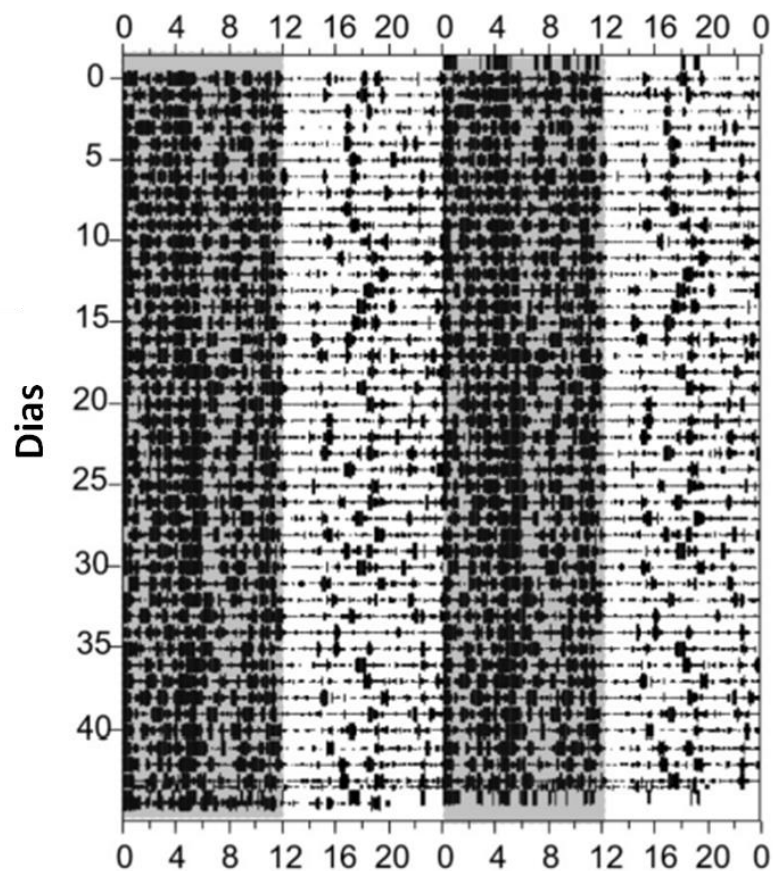
Quando um organismo está sob condições ambientais periódicas, como é o caso de qualquer organismo na natureza, ele manifesta um ritmo circadiano, tendo o mesmo período do ambiente em função do encarrilhamento produzido por este. Neste caso, o ritmo externo não gera ritmo no organismo, mas o conduz (encarrilha) (13). Os elementos externos que o organismo utiliza como referências temporais para encarrilhar os seus ritmos são conhecidos pelo termo alemão *zeitgebers* (o que doa ou marca o tempo) (26). O *zeitgeber* com melhor nível de evidência até agora é a luz, na verdade, a alternância entre claro e escuro. Em função de sua força de encarrilhamento, a alternância claro-escuro constitui um *zeitgeber* universal, tendo seu papel sido demonstrado na maioria das espécies, inclusive seres humanos (15). Para uma dica ambiental ter o poder de sincronizar ou encarrilhar ritmos biológicos é necessário existir estruturas anatômicas ou vias fisiológicas que interliguem o ambiente à célula de forma sustentada, como por exemplo as aferências do trato retinohipotalâmico (TRH) ao NSQ (4).

Ao contrário do que se possa imaginar em relação ao papel da retina, não apenas funções relacionadas à visão são desempenhadas. Além da capacidade de detectar a luz para a formação das imagens e para rastreamento de objetos através de fotorreceptores clássicos como cones e bastonetes, a retina possui células especializadas com capacidade de regular várias funções comportamentais e fisiológicas independentes da formação da imagem (5). As células ganglionares intrinsecamente fotossensíveis da retina (ipRGCs) parecem responder ao estímulo luminoso mesmo na ausência de sinalização proveniente dos fotorreceptores clássicos. No entanto, por serem células ganglionares, ou seja, responsáveis por reunir as sinalizações dos fotorreceptores da retina e convergi-las para o cérebro, as ipRGCs conseguem detectar luz de forma independente através de melanopsina e também podem mediar o input de cones e bastonetes (27). Além de apresentarem projeções para o NSQ, as ipRGCs possuem aferências em áreas responsáveis pela regulação de ritmos circadianos, sono



Dentre os comportamentos rítmicos mais estudados está o ritmo de atividade/repouso que fornece dados importantes que podem refletir o estado de saúde/doença dos seres vivos (28). A forma gráfica mais conhecida e utilizada para representar os registros de atividade/repouso coletados nos estudos é por meio de actogramas (**Figura 6**).

No caso de pesquisas experimentais com roedores, o registro pode ser feito com base na locomoção do animal (sensores na caixa moradia); no consumo de água (sensores da garrafa de água); ou em vários parâmetros por meio de telemetria (eletrodos implantados em diferentes estruturas nos animais).



**Figura 6. Representação gráfica da atividade locomotora.** Neste actograma, cada linha representa os dados de um dia plotados duas vezes (“double-plotted”) para facilitar a visualização dos ritmos de atividade/repouso. Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12:12h. Sombreado cinza representa o período com as luzes apagadas.

Adaptado de Ben-Hamo et al. 2016 (29).

Dentre os fatores descritos como responsáveis por afetar a ritmicidade circadiana de atividade locomotora e temperatura corporal, o estresse ocupa importante posição (30,31). Os estudos com roedores que empregam privação de sono, atividade física forçada, exposição à luz durante a noite ou mudanças no período de disponibilidade de comida como modelos para mimetizar trabalho de turno também identificam alterações no ritmo de atividade locomotora dos animais (32). Dentre estas estratégias, as que utilizam luz durante o período de atividade dos roedores noturnos parecem ser mais efetivas em alterar o ritmo de atividade locomotora, o que é pertinente considerando que a luz é principal zeitgeber dentre os mamíferos.

Os estudos que submetem os animais a condições constantes de iluminação foram bastante importantes para a compreensão de toda a maquinaria responsável pela geração dos ritmos biológicos. Isso ocorreu pois, além dos resultados de dosagens hormonais apresentarem valores alterados, aspectos reprodutivos e também de atividade/repouso foram diferentes dos identificados em animais em condições de claro e escuro padrão (33–35). Esse modelo de exposição a condições ambientais constantes é bastante robusto e não se restringe apenas aos estudos de mamíferos, tanto que Rosbash e Hall utilizaram escuro constante para mostrar as comunicações intercelulares essenciais para manutenção das oscilações moleculares que são a base para sustentação dos ritmos de atividade locomotora circadiana em *Drosophila* (36). Ratos expostos tanto à iluminação constantemente ligada quanto apagada, não possuem a pista externa necessária para encarrilhar seus ritmos com o do ambiente, considerando que além da ausência do zeitgeber fótico, nenhum outro é apresentado em seu lugar. Neste caso, diz-se que o animal está em condição de livre curso (do inglês “free-running”) e que, deste modo, o NSQ e seus osciladores de autossustentação são responsáveis por manter os ritmos do organismo (37). Quando a pista fótica do ambiente está presente, ou seja, quando existe a variação em períodos de claro e escuro, o actograma é muito útil para identificação de quão encarrilhado ao zeitgeber fótico está o animal.

## **2.5 Luz artificial e repercussão na saúde**

Neste ponto, podemos perceber o quanto e como a luz artificial influencia a fisiologia e o comportamento dos seres vivos. Como o uso irracional da iluminação artificial atingiu todos os níveis de tecnologia, houve uma ruptura na relação entre o nosso sistema temporizador endógeno e as variações claro/escuro do ambiente. Essa ruptura afeta a regulação dos ritmos



circadianos normais, na medida em que é o próprio ser humano, e não a luz do sol, que define quando começa e quando termina o dia. O que se percebe é uma maior exposição à iluminação artificial durante a noite e uma menor exposição à luz do sol durante o dia (7).

Como descrito anteriormente, tanto a intensidade quanto a frequência desta onda eletromagnética, que é a luz, são bastante diferentes quando provenientes de fontes artificiais comumente utilizadas ou de fonte solar. A ruptura de ritmos causada pela exposição inadequada a diferentes fontes de iluminação vem sendo associada a diversas condições patológicas. Isto acaba afetando processos biológicos importantes que estão sob controle circadiano, como ciclo sono/vigília, secreção de certos hormônios, função celular e expressão gênica (38). Dentre os efeitos negativos para a saúde, podemos citar as associações encontradas com alterações no humor, no metabolismo, no risco para desenvolver câncer e no sistema imunológico (39). Mure et al. publicaram recentemente na revista *Science* um atlas transcriptômico nos principais tecidos neurais e periféricos de primata, mostrando que mais 81% dos genes que codificam proteínas apresentam ritmo diário de expressão, e que genes ubíquos que participam em função celulares essenciais exibem expressão rítmica de maneira específica conforme o tecido (40). Esses dados nos fazem pensar que talvez muitas outras doenças, transtornos e sintomas podem ter sim, em sua fisiopatologia, disrupção circadiana relacionada, considerando a expressão genética rítmica em grande parte dos tecidos do corpo.

Um exemplo bastante difundido de como a mudança de fotoperíodo pode provocar uma disrupção e, conseqüentemente, afetar a saúde é o transtorno afetivo sazonal (SAD), cuja ocorrência se dá em função das alterações na duração do dia e da noite conforme as estações do ano. Essa relação entre o SAD e o declínio do fotoperíodo foi atribuída à prevalência conforme a latitude de ocorrência dos casos, à regularidade de sua ocorrência no outono e inverno com remissão espontânea na primavera e no verão, e à eficácia da luz como forma de tratamento (41,42). Já se demonstrou a influência de variações de fotoperíodo semelhantes às sazonais nos ritmos biológicos de roedores, onde se viu que uma melhor adaptação dos ritmos se dá com transição de um fotoperíodo mais longo (16h30min de luz e 7h30min de escuro) para um fotoperíodo mais curto (7h30min de luz e 16h30min de escuro) do que o contrário (43). Outra condição que está associada a alterações no humor é a exposição à luz durante a noite pelos trabalhadores de turno, o que os torna mais suscetíveis a episódios depressivos (39). Além disso, a ausência de janelas possibilitando o mínimo contato com a luz natural no local de trabalho demonstrou possuir associação com sintomas depressivos (6). Estudos em modelos animais mostram que a ruptura dos ritmos circadianos através da exposição indevida

à luz pode afetar o comportamento através de seu impacto na plasticidade neuronal e na neurotransmissão, acarretando prejuízos na capacidade de memorizar e aprender e em humor deprimido (44–46).

A adoção generalizada da luz elétrica pelo ser humano permitiu aos homens maior flexibilidade no controle do ambiente, tornando as sociedades mais seguras, mais ricas e mais produtivas. Infelizmente, o impacto desta tecnologia na biologia circadiana dos organismos não foi algo previsto e muito menos priorizado, e só agora os efeitos à saúde estão começando a ser estudados e as alternativas para diminuí-los discutidas.

### 3. JUSTIFICATIVA

O estudo desenvolvido e descrito nesta dissertação justifica-se com base nos seguintes pontos:

- Elucidar papel da iluminação de forma geral nos ritmos de atividade-reposo se aplicada desde o início da gestação;
- Aprofundar os conhecimentos acerca da evolução dos ritmos de atividade-reposo em animais submetidos a condições constantes de iluminação;
- Preocupação em relação à influência dos hábitos modernos de escassez de luz natural durante o dia e falta de escuro durante a noite em processos saúde-doença;
- Aprofundar os conhecimentos a respeito da iluminação LED com características especiais de temperatura de cor no comportamento de atividade dos animais, por seu potencial como tecnologia de iluminação que possa diminuir os impactos negativos da iluminação utilizada atualmente.

#### **4. HIPÓTESE**

A hipótese deste estudo é que a exposição a diferentes tipos de fotoperíodo e sistemas de iluminação desde o início da gestação é capaz de influenciar o comportamento de roedores, com seus reflexos observados no ritmo de atividade/repouso. De forma mais específica, espera-se reproduzir os resultados já descritos na literatura em relação a condições constantes de iluminação, além de diferenciar os efeitos de um sistema de iluminação que procura mimetizar as variações naturais de luz durante o dia de um sistema padrão que não apresenta essas variações.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o impacto de diferentes sistemas de iluminação e durações de fotoperíodo aplicados desde o início da gestação nos ritmos de atividade/repouso de ratos Wistar.

### 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar a evolução do ritmo de atividade/repouso entre os grupos de estudo através de actogramas;
- Identificar o período principal do ritmo de atividade/repouso de cada grupo com base no cálculo de Sokolove-Bushell;
- Comparar o ritmo de atividade/repouso entre os grupos de estudo através dos parâmetros: amplitude relativa, soma de atividade diária, *intradaily variability* (IV), *interdaily stability* (IS), média de atividade durante as cinco horas menos ativas (L5), média de atividade durante as dez horas mais ativas (M10) e acrofase;
- Comparar a força dos harmônicos que constituem o ritmo de atividade/repouso entre os grupos de estudo, bem como identificar se existe variação neste parâmetro de acordo com o tempo;

## 6. ARTIGO

### **Impact of early exposure to different lighting systems and photoperiod lengths on the development of Wistar rats' rest-activity behavior**

Melissa A. B. Oliveira<sup>1,2\*</sup>, Maria Elisa Calcagnotto<sup>3,4,5</sup>, Antoni Díez-Noguera<sup>6</sup>, Maria Paz Hidalgo<sup>1,2,7</sup>

1 Laboratório de Cronobiologia e Sono, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

2 Postgraduate Program in Psychiatry and Behavioral Sciences, Medical School, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

3 Postgraduate Program in Biological Sciences: Biochemistry, Department of Biochemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil;

4 Neurophysiology and Neurochemistry of Neuronal Excitability and Synaptic Plasticity Laboratory-NNESP Lab., Biochemistry Department, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

5 Postgraduate Program in Neuroscience, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

6 Department de Fisiologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain.

7 Department of Psychiatry and Forensic Medicine, Medical School, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

\*Corresponding Author

Melissa Alves Braga de Oliveira, Laboratório de Cronobiologia e Sono, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Ramiro Barcelos, 2350 sala 12107, 90035-903, Porto Alegre, RS, Brasil. Phone: +55 51 33596339. E-mail address: labcronoesono@hcpa.edu.br

## Abstract

Light is the primary cue capable of synchronizing our body to the environment, but after the dissemination of electricity, natural light transitions do not guide us anymore, and this does not happen without health costs. The “circadian light” emerges as a system that could diminish the undesirable effect of the artificial light through changes on color temperature to mimic daily light variations. The objective of this study was to evaluate the impact of prenatal exposure to different lighting systems, including the “circadian light”, and photoperiod lengths on the rest-activity rhythms of Wistar rats. Since the beginning of their pregnancy and throughout the experiment, male rats were exposed to four different type of light groups: constant light (LL), constant darkness (DD), circadian light 16:8h (CL) and standard light 16:8h (SL). Rest-activity data was collected continuously from postnatal day (PND) 22 to PND 49. Animals exposed to LL and DD presented a typical free-running pattern of rest-activity rhythms. A peak of activity was detected in SL group actogram after turning on the light system, which did not happen to CL group. Acrophases in CL group occurred 45 minutes earlier ( $p < 0.01$ ) than in SL group. Rats under DD, CL and SL conditions showed a typical spectrum of high power content (PC) in the first circadian harmonic during almost all days, while LL did not. Our results showed the impact of different light exposure on the evolution of rest-activity behavior of nocturnal rodents. The reactive peak of activity and the delayed acrophase in SL demonstrated that animals show a different behavior when exposed to color temperature variations. The revealed impact of circadian light on activity behavior could be the starting point for future studies designed to broaden our understanding about metabolic and other behavioral responses related to it and perhaps implement this technology to mimic natural daylight variations on experimental research.

Keywords: circadian light, biological rhythm, artificial light, LED

## Introduction

Light is the primary cue capable of synchronizing our body to the external environment (Berson et al., 2002). Most living beings have adapted their physiology and metabolism to the day and night transitions to optimize energy expenditure and protection against predators. Mammals are affected by changes in photoperiod and are capable of detecting light spectra notwithstanding it happens unconsciously. Light detection is restricted to the retina, where we have not only image-forming photoreceptors, called rods and cones, but also non-image-forming photoreceptors called ipRGCs. In contrast to rods and cones, ipRGCs are activated in response to the light presence and the circadian photoentrainment relies on its functioning (Schmidt et al., 2011). With concern to light spectrum, ipRGCs are most sensitive to wavelengths of light that are in the blue region which explains the fact that the production of melatonin is efficiently inhibited under blue light (Brainard et al., 2015; LeGates et al., 2014). Using primarily light information sent directly from the retina, the suprachiasmatic nucleus, also known as the central pacemaker, is responsible for the generation of circadian rhythms (Moore et al., 2002). In constant conditions, with the absence of light/ and dark cycle inputs, the endogenous clock becomes out of phase with the external environment. Therefore, light information is essential to biological timekeeping (Aschoff, 1979).

After the recent invention and dissemination of electricity, humans do not organize their routines based on light transitions anymore and can choose when night begins and ends depending on turning on or off the lights (Bedrosian and Nelson, 2013). Despite all benefits that electric energy has brought to humans' society, the effects of the excess of artificial light are still being studied and measured (Münch et al., 2016). Working either indoors during the day or at night shifts we are no longer exposed to natural sunlight. These factors together with the use of electronic devices during the night contribute to the light pollution phenomenon



(Chepesiuk, 2009). The absence of windows at the workspace was shown to have an association with physiological changes, sleep disorders and depressive symptoms (Harb et al., 2015). Shift work that involves circadian disruption and which is mostly characterized by exposure to light-at-night (LAN) was classified as probably carcinogenic to humans by the International Agency for Research on Cancer (Wang et al., 2011). These data reinforce not only the importance of the exposure to natural light during the day but also to the dark during the night.

Recent data with animal models have shown the impact of light on physiology, metabolism and behavior (Dauchy et al., 2016; Plano et al., 2017). It is already known that light exposure is essential for the development of the circadian system, though the role of quantity versus quality of light in this process is still not fully understood (Cambras et al., 2015). Considering that our body and physiology harmoniously adapted to the daily desired variations of light and dark, a “circadian light” was proposed by Quiles and colleagues as an artificial light system that could diminish the undesirable impact of the artificial light on health. It was shown that animals born and raised under circadian light presented a lower amount of visceral fat in comparison to animals exposed to regular light (*in press*). On the other hand, the nature and velocity of light transitions have been proved to have a strong effect on the entrainment capacity of light, affecting the range of entrainment and the degree of presence of circadian behavior on the rhythms of motor activity (Boulos et al. 2002).

Considering the function of light as an entraining agent of circadian rhythms and consequently its importance to temporal physiology organization, the aim of this study was to evaluate the impact of prenatal exposure to different types of lighting systems and photoperiod lengths on the rest-activity rhythms of Wistar rats.

## Methods

### *Study design*

After one week of mating, female Wistar rats obtained from the Animal Experimentation Unit (UEA) of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) were allocated in a photoperiod station under the same controlled temperature ( $22 \pm 2$  °C), humidity and noise exposure but at different photoperiods and light systems. The day of delivery, which occurred at about 21 days after mating, was designated postnatal day 0 (PND 0). Mothers and puppies remained at these conditions during all pregnancy until PND 21 when litters were weaned and experiments performed only on males pups (n=32). Since weaning day and throughout the experiment animals were individually housed with food and water ad libitum in transparent acrylic home-cages (Panlab Harvard Apparatus; 25 x 15 x 25cm) and remained under the same light conditions from pregnancy until the end of the study while activity/rest rhythm was being recorded continuously. All experimental procedures performed in this project were approved by the Institutional Research Ethics Committee on Animal Experimentation of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (16-0044 - CEUA/HCPA).

### *Intervention*

Since the beginning of pregnancy, animals were exposed to four different light groups:

- 1) Constant Light (LL), LED light with a constant color temperature of 4000K and giving a luminous flux (illuminance) between 200 and 450 lux at cage level, depending on its position in the photoperiod station;
- 2) Constant Darkness (DD), lights was turn off during all period of the experiment;
- 3) Circadian Light (CL), LED luminaires developed to simulate daily natural light changes giving a luminous flux illuminance between 150 and 400 lux at cage level, and
- 4) Standard Light (SL), LED light like in the LL group. CL and SL light regimens are

according to protocols already established by our research group and were maintained under an LD cycle with 16 h of light and 8 h of darkness per day (LD16:8) (Quiles et al., 2016) with light on at 5:00 pm. CL color temperature changed from 2700K to 6500K along the first 6 hours of the light phase and gradually returned to 2700K along the remaining 10 hours. Both lamps designed and provided by Luxion Iluminação™ (Caxias do Sul, Brazil) with 1500 lumens and 10W. Experimental groups and their characteristics are detailed in Figure 1.

>> Figure 1 could be placed about here <<

#### *Rhythm characterization*

Individual acrylic home cages (20 × 23 × 23 cm) were equipped with actigraphs (ADNplin, ©Antoni Díez-Noguera, Barcelona, CA, Spain), a device containing two infrared beams that detected motor activity continuously and recorded the number of movements every 10 minutes in a computer system. Rest-activity data was collected from PND 22 to PND 49 except for one animal from DD and three animals from CL group (PND 30 –PND 57; PND 32 –PND 59; PND 31 –PND 58; PND 31 –PND 58) as these animals presented missing data intervals. After visual inspection of all actograms, we decided to include these animals' data in the analysis of rhythm due to unalterable patterns according to PND.

#### *Data Analysis*

All data analysis was performed using sample size for each experimental group as indicated in Figure 1. The evaluation of rest-activity rhythm was performed using the integrated Chronobiology software El Temps (©Antoni Díez-Noguera, Barcelona, CA, Spain). In order to illustrate activity rhythms, double-plotted actograms were created using

derived series from mean values of each group. Daily total activity was used to calculate the total activity mean for the 28 consecutive days of each animal. The cosinor analysis was performed by fitting the data to a sinusoidal curve of a 24-hour rhythm, which provided the amplitude (the semi-difference between the curve extremes) and the acrophase (the measure of the time in which the highest value of a variable is more likely to be found). The Waveform analysis was used for parametric and non-parametric analysis and also to show the mean waveform, representative of the one-day pattern of activity. Waveforms of groups CL and SL were calculated at 1440 min. module while for groups LL and DD modules were equal to the periods from the respective periodograms. From this analysis it is possible to derive several rhythmic variables such as those proposed by Van Someren (Van Someren et al. 1999) as: the intradaily variability (IV), which quantifies the rhythm fragmentation; interdaily stability (IS), which quantifies the synchronization to the 24-h light–dark cycle; the L5 which is the average activity during the least active 5-h period; and the M10 which is the average activity during the most active 10-h period. Sokolove-Bushell periodograms were calculated for each animal and the analysis with the main periods was performed. Fourier analysis was applied to the 28-day data section which allowed us to compose a description of the harmonic components. It was obtained the power content (PC) for each of the 15 harmonics expressed as the percentage of variance (%Var). Individual power spectra were averaged for each group and represented by a gray scale in graphic matrixes, structured as harmonics (columns) and days (rows). Besides, the serial PC values corresponding to each harmonic were averaged for the 28-day section. Shapiro-Wilk was used to test variables for normality. Kruskal-Wallis followed by post hoc pairwise comparisons using Dunn's test were used to compare rhythmic parameters among groups. Values of  $P \leq 0.05$  were considered statistically significant. Statistical analysis and graphs were performed using SPSS for Windows (version 18; SPSS Inc., Chicago, IL) and GraphPad Prism version 6.0 for Mac (GraphPad Software, San Diego,

CA). Comparisons of acrophases between CL and SL groups were performed through Watson-Williams Test for circular data.

## Results

Rest-activity rhythms of groups are shown in Figure 2. Animals exposed to constant light and constant darkness presented a typical free-running pattern of rest-activity rhythms since these groups did not have a circadian synchronization provided by light as the other two groups. Differently from SL and CL that exhibited periods of  $1438 \pm 2$  (median  $\pm$  IQR; clearly close to 1440 minutes) and  $1440 \pm 2$  minutes respectively, LL and DD showed  $1515 \pm 23$  and  $1473 \pm 26$  minutes periods respectively. In the DD group, the circadian rhythm is present since the beginning of the record and increases gradually during the next days but in the LL group animals are arrhythmic and the rhythm develops gradually appearing around PND 35. Interestingly CL and SL actograms showed a bimodal shape where the activity behavior is closely linked to lighting regimen of 16:8h but a peak of activity is seen in SL after turning on the light system even though this light cue presupposes the beginning of the rest period. The meanwave shapes of the DD and LL groups are much more smooth, showing gradual transitions between activity and rest phases. The smoothest pattern is present in the LL group. Considering that the only difference between groups is the type of illumination during lights on and that CL did not present this isolated activity peak, this difference might rely on light particularities.

>> Figure 2 could be placed about here <<

The parameters described here, as components of the rhythmic profile were able to differentiate LL from other groups in most cases (Figure 3). Relative amplitude was higher in SL and CL groups in comparison to LL group. However, they are not significantly different from each other. This result was already expected given the subtle distinction between activity and rest periods, also evident on LL actogram. As the LL group did not present a robust pattern of activity, lower M10 and higher L5 values, the curve of activity rhythm was flattened and consequently the amplitude smaller. Also, SL and CL are both synchronized to a 24-h light–dark cycle which could explain the higher levels of IS in comparison to LL and DD groups. Groups exhibited similar IV. However, DD surprisingly presented the higher and statistically different value.

>> Figure 3 could be placed about here <

Acrophases are highly heterogeneous in LL and DD groups due to the absence of external synchronization and individual differences on the free running periods. Each day the phase of activity suffers an advance and hence acrophases are different daily, because of that these acrophases are not considered for analysis. On the other side, animals from CL and SL presented more homogeneous data (Figure 4) and the acrophases of the two groups are significantly different (CL= 12:16 am, SL= 1:02 pm;  $p < 0.01$ ). Acrophases in CL group occurred 45 minutes earlier than in SL group.

>> Figure 4 could be placed about here <<

Power content of harmonics obtained from Fourier analysis are shown according to each cycle for the 28-day period (Figure 5). Graphic matrixes from rats under DD, CL and SL conditions showed a typical spectrum with the highest PC in the first circadian harmonic during almost all days, except for SL where the fourth harmonic has greater PC during first days. The LL group showed a flattened spectrum lacking a dominant harmonic during the first two weeks. The presence of the fourth harmonic in the CL and SL groups is a consequence of the bimodal pattern in which the two bouts of activity are separated by 6 hours, which is the period of the harmonic. Differences among groups within each harmonic showed that first, third, fourth and fifth harmonics were capable of distinguishing groups (Figure 6). CL and SL groups presented similar pattern mostly with greater PC values than DD and LL groups, which indicates a sharper and more robust definition of the circadian patterns. In this sense, it is worth noticing that the highest PC on the first harmonic is reached in the SL group.

>> Figure 5 could be placed about here <<

>> Figure 6 could be placed about here <<

## **Discussion**

In this study, our main findings indicate that light color temperature might influence the behavior of activity during the transition from dark to light phase due to the absence of activity reactive peak on animals' actograms. In addition, it may affect the capability to anticipate the beginning of dark phase showed by an early activity acrophase in CL in comparison to SL group. Moreover, our methodology reveals how lighting and photoperiods, applied since early prenatal period, impact in the activity rhythm evolution. Since animals

exposed to light-dark regimens presenting four harmonics responsible for their activity pattern with the first circadian harmonic being the most powerful. On the other hand, LL animals did not become arrhythmic and the circadian harmonic turning into the strongest after two weeks from weaning; and animals under constant darkness presented the circadian harmonic with the highest PC during all recording period.

The acrophases obtained through cosinor analysis occurred earlier in CL than in SL group. This advance might have happened because animals were able to predict the arrival of the activity period due to color temperature variations of “circadian light”, but they can be also explained by an advance in the rhythm to compensate the different amount of light received at critical moments of the phase response curve (PRC). In any case, this reflects a strong entraining effect of the SL pattern. It is worth noticing that LL group presented the most discrepant values for rhythmic profile indicating that constant light is the intervention that most affects activity and rest conditions. On the other hand, the analysis of harmonics, decomposed from the rhythm by spectral or Fourier analysis, allows us to understand how the motor activity rhythmic pattern is shaped and evolves through the time. The first harmonic is the circadian harmonic and its PC indicates the circadian character of the function (Díez-Noguera, 2013).

The analysis of circadian harmonics showed that on CL and SL groups were already entrained to a circadian rhythm by the day of weaning and although they have more than one harmonic responsible for the rhythmic pattern manifested (at least 4) the first and circadian one is the strongest. These two groups were similar in all harmonic PC comparisons, as well as exhibited higher values than LL and DD. A remarkable aspect was observed in the group exposed to constant light, as on the first 15 days of activity recording there was no main harmonic appearing. However, from this period on the flattened spectrum was dissolved and a strong first harmonic appeared. Cambras and colleagues also showed a transition of an



ultradian immature animal pattern to a circadian pattern of an adult (Cambras and Díez-Noguera, 1991). Animals exposed to constant darkness similarly presented the first harmonic as the strongest, but no other ones were detected like in the light/dark cycled groups. Although DD animals were submitted to constant conditions, the transition from ultradian to circadian rhythm was not perceived and perhaps it occurred because the prenatal exposure to darkness continuously helped the maturation of their circadian system.

This study evaluated the impact of different systems of lighting and photoperiod lengths applied since gestation on the behavior of rest-activity rhythms of Wistar rats. Currently, most of the studies that use exposure to different types of lighting aim to reproduce LAN models in adult animals. Some others choose the postnatal period to apply enlightenment interventions, but in recent literature, regarding exposure to light during the prenatal period, is still lacking and we are not aware of other methodologies that have submitted animals to similar lightening protocols since early prenatal period. In spite of, available data on rest-activity rhythm is still poor, a couple of studies have helped to deepen the knowledge on prenatal light exposure effects on animals' behavior and molecular parameters (Mendez et al., 2012; Voiculescu et al., 2016). We consider this a robust study capable of reproducing some important results in the field of chronobiology with nocturnal animals (Aschoff, 1979). Our data showed that in DD and LL groups the 24h-rhythm ran free and the endogenous periods manifested were both greater than 1440. Uninterrupted exposure to light is used as a model for functional pinealectomy and rhythm suppression (Báez-Ruiz et al., 2017; Delibas et al., 2002). Even though we used prenatal exposure to light, we did not observe the abolishment of rhythmicity, which might have been due to a protective effect of constant bright light during the developmental period. This result is in accordance to Cambras (Cambras et al., 1998), who verified that rats exposed to LL during lactation did not present circadian arrhythmicity in adulthood. Under light/dark cues, CL and SL groups were

synchronized to a 24h-day and presented rhythmicity of circadian locomotor activity. We found that, at the beginning of the light period, when nocturnal animals are less active, the SL group exhibited a peak of activity, which is clear in SL mean waveform. This phenomenon was also detected in other experiments (Campuzano et al., 1999, Cambras et al. 2004) and might be explained by the abrupt irruption of light that inhibits the motor activity that reappears after a while forming the peak.. The absence of the reactive peak on CL animals gives rise to the circadian light potential to modify rest-activity behavior in a rodent. Our results suggest that SCN neurons can detect circadian light variation in color temperature, which makes animals successful on detecting the variations that try to mimic daily alterations of natural light.

In general, our results showed the impact of light regimes on the evolution of rest-activity behavior of nocturnal rodents. The light intervention applied since early prenatal period raises exciting questions about the maturing of endogenous clock. Although circadian light did not show significant differences from standard light in some variables analyzed, the reactive peak of activity and the delayed acrophase in SL proved that animals differently behave when exposed to CL. The revealed impact of circadian light on activity behavior could be the starting point for future studies designed to broaden our understanding of metabolic and other behavioral responses.

### **Acknowledgments**

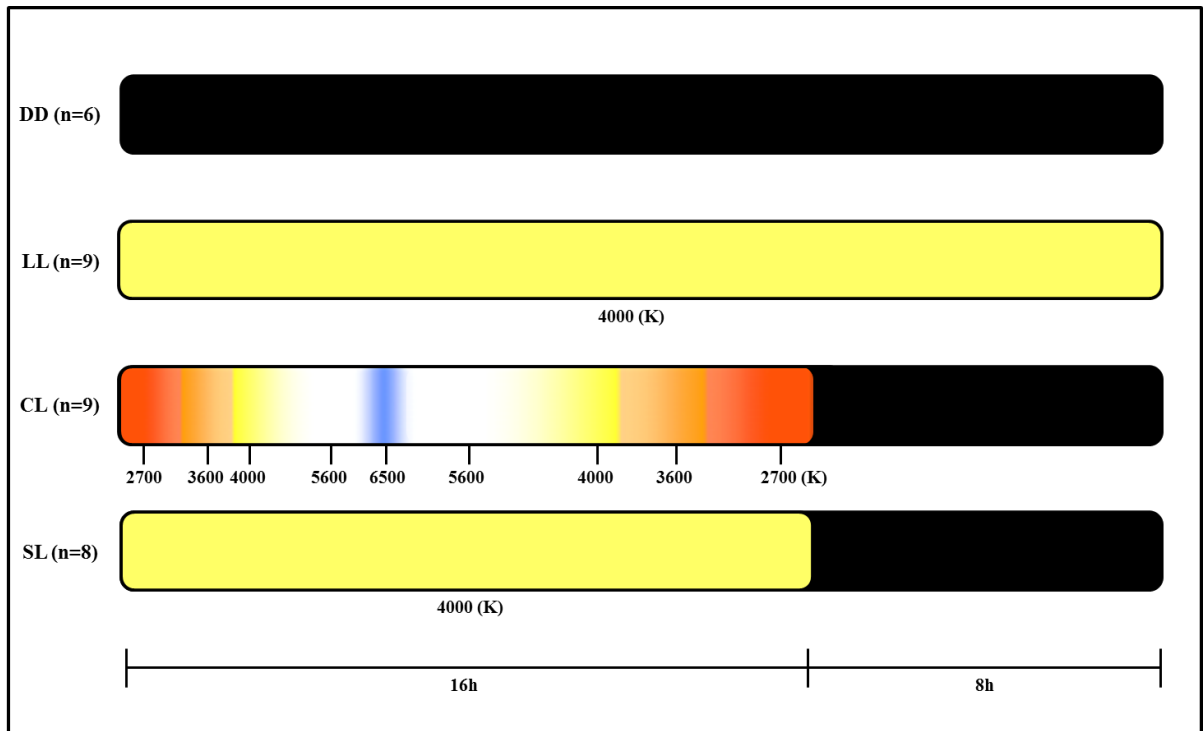
The authors are thankful to Animal Experimentation Unit team (UEA) and Biomedical Engineering Service of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) for technical and logistical support. Additional support to this study was provided by the Incentive Fund to Research and Events of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE – HCPA), Coordination

for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq – UFRGS) and Luxion Iluminação™.

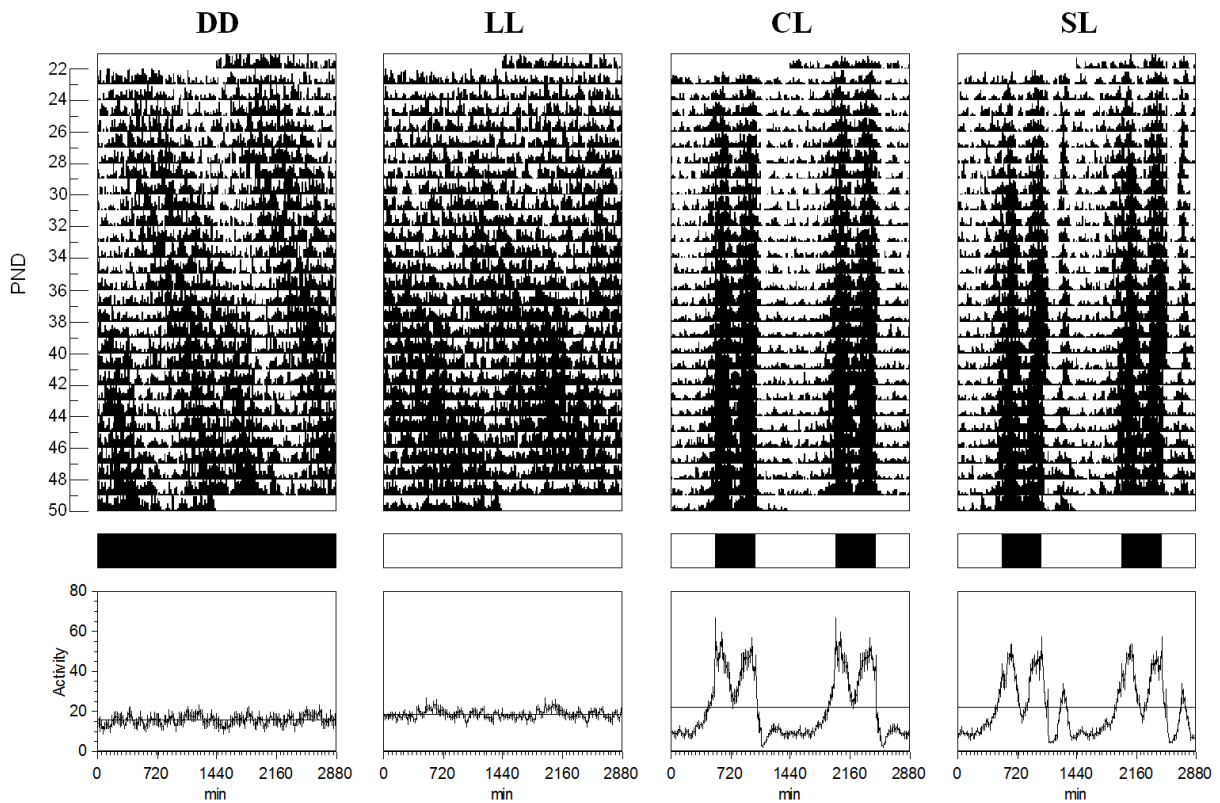
### **Conflict of Interest Statement**

Authors declare a conflict of interest due to the financial and material support provided by the circadian light manufacturer (Luxion Iluminações™).

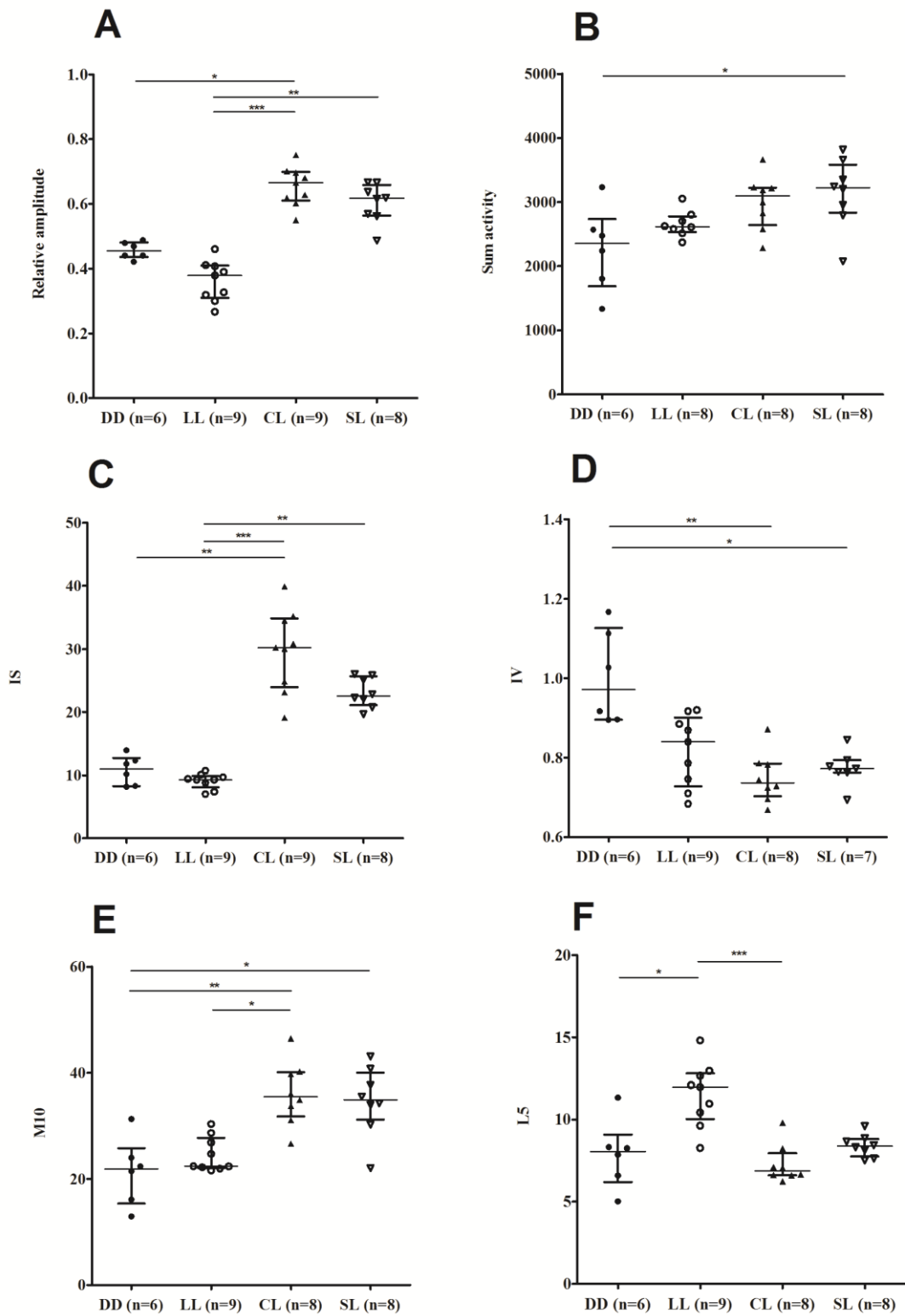
## FIGURES



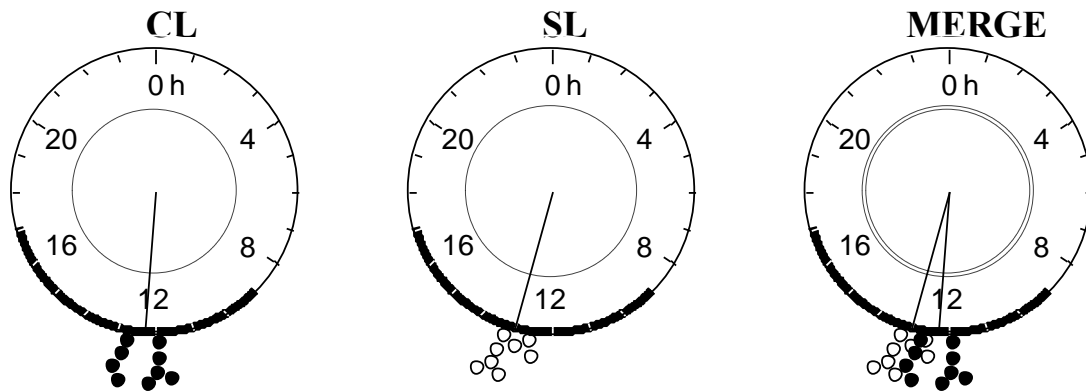
**Figure 1.** Experimental groups. Lights were on during 16h on CL and SL groups (9-17pm), which differ only with regards to the presence or absence of color spectrum transition throughout the light phase. DD: constant dark; LL: constant light; CL: circadian light; SL: standard light; K: Kelvin.



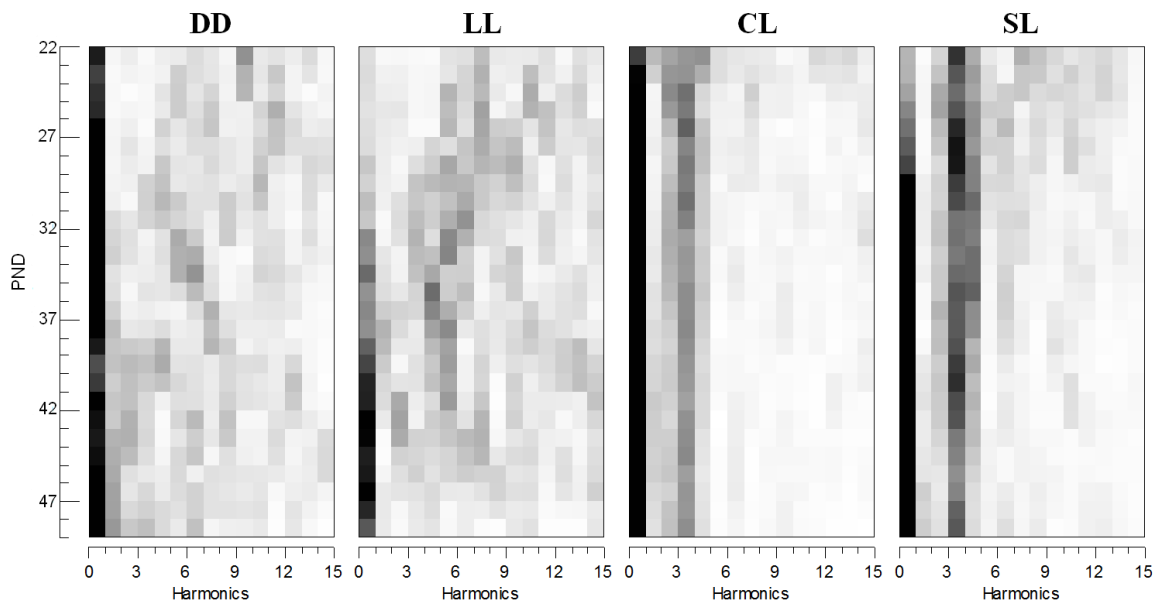
**Figure 2.** Rest-activity rhythms of experimental groups. Actograms of 24h were used to plot the means of data for each group. Bars represent photoperiod, with black part being the period when lights were off and white part when lights were on. Average mean-waveform of each group resumes the graphic pattern of each group's activity rest rhythms. The horizontal line represents the mean value of the motor activity. DD: constant dark; LL: constant light; CL: circadian light; SL: standard light.



**Figure 3.** Rhythmic profile. Values represent median  $\pm$  IQR. Kruskal-Wallis analysis followed by Dunn's post-hoc were performed. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ .

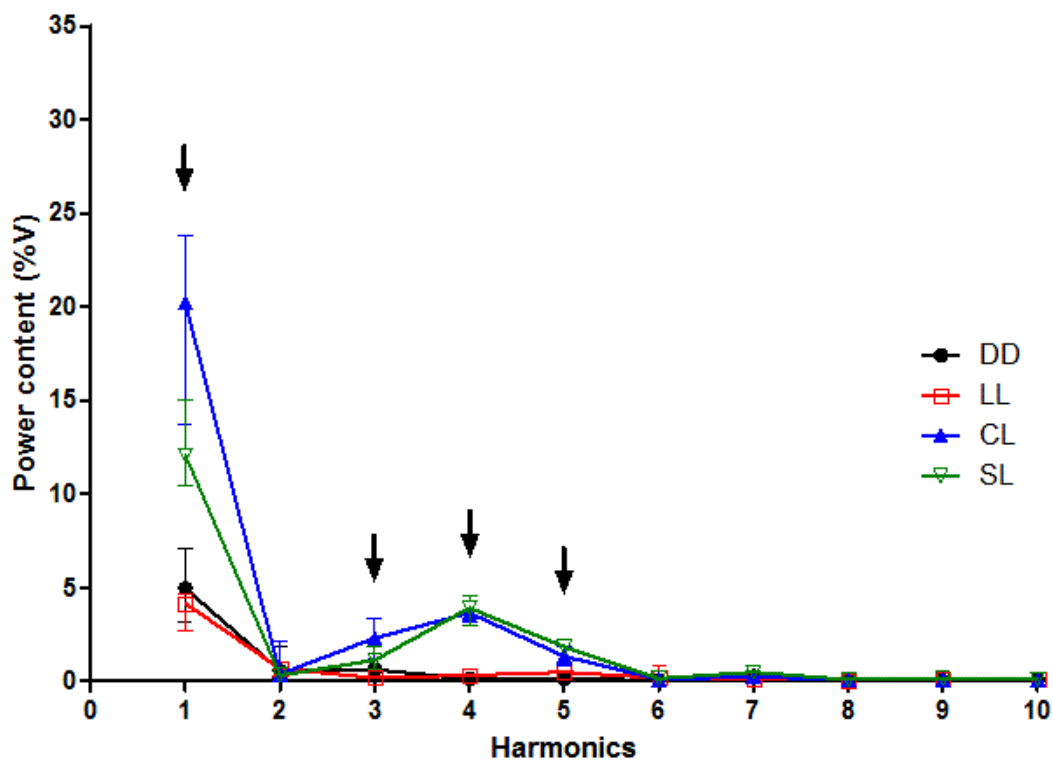


**Figure 4.** Acrophases of motor activity. Numbered circles represent the 24- hour day. Black dots represent CL acrophases and white dots represent SL acrophases. Watson-William test for circular data showed difference between acrophases  $F(1,15)= 12,06$ ;  $p(F)= 0,0029$ .



**Figure 5.** Graphic matrix of serial spectral analysis. Each graph corresponds to the mean graphic matrix of each group, obtained by averaging the serial analysis of the first 28-day stage, for each animal. Matrixes represent PC values (% Var) of the successive 15 harmonics (columns) calculated for each consecutive day (rows), i.e. each row represents the mean power spectrum of a day. Values are represented on a gray scale, with black being the highest.





**Figure 6.** Spectral decomposition obtained with the Fourier analysis in time series. PC values of the harmonics are calculated for the whole 28-day segment for each group. Data is plotted as median  $\pm$  IQR. Arrows point to existence of differences between groups. Harmonic 1 ( $p < 0.01$ , DD v CL;  $p < 0.001$ , LL v CL;  $p < 0.05$ , LL v SL); Harmonic 3 ( $p < 0.05$ , LL v CL;  $p < 0.001$ , LL v SL); Harmonic 4 ( $p < 0.05$ , LL v CL;  $p < 0.01$ , LL v SL;  $p < 0.01$ , DD v SL;  $p < 0.01$ , DD v CL); Harmonic 5 ( $p < 0.05$ , DD v CL;  $p < 0.001$ , DD v SL;  $p < 0.01$ , LL v SL).

## References

- Aschoff, J. (1979). Circadian rhythms: influences of internal and external factors on the period measured in constant conditions. *Z. Tierpsychol.* *49*, 225–249.
- Báez-Ruiz, A., Guerrero-Vargas, N.N., Cázarez-Márquez, F., Sabath, E., Basualdo, M.D.C., Salgado-Delgado, R., Escobar, C., and Buijs, R.M. (2017). Food in synchrony with melatonin and corticosterone relieves constant light disturbed metabolism. *J. Endocrinol.* *235*, 167–178.
- Bedrosian, T.A., and Nelson, R.J. (2013). Influence of the modern light environment on mood. *Mol. Psychiatry* *18*, 751–757.
- Berson, D.M., Dunn, F.A., and Takao, M. (2002). Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science* *295*, 1070–1073.
- Brainard, G.C., Hanifin, J.P., Warfield, B., Stone, M.K., James, M.E., Ayers, M., Kubey, A., Byrne, B., and Rollag, M. (2015). Short-wavelength enrichment of polychromatic light enhances human melatonin suppression potency. *J. Pineal Res.* *58*, 352–361.
- Boulos, Z., Macchi, M.M., and Terman, M. (2002). Twilights widen the range of photic entrainment in hamsters. *J. Biol. Rhythms* *17*, 353–363.
- Cambras, T., and Díez-Noguera, A. (1991). Evolution of rat motor activity circadian rhythm under three different light patterns. *Physiol. Behav.* *49*, 63–68.
- Cambras, T., Vilaplana, J., Torres, A., Canal, M.M., Casamitjana, N., Campuzano, A., and Díez-Noguera, A. (1998). Constant bright light (LL) during lactation in rats prevents arrhythmicity due to LL. *Physiol. Behav.* *63*, 875–882.
- Cambras, T., Chiesa, J., Araujo, J., and Díez-Noguera, A. (2004). Effects of photoperiod on rat motor activity rhythm at the lower limit of entrainment. *J. Biol. Rhythms* *19*, 216–225.
- Cambras, T., Canal, M.M., Cernuda-Cernuda, R., García-Fernández, J.M., and Díez-Noguera, A. (2015). Darkness during early postnatal development is required for normal circadian patterns in the adult rat. *Chronobiol. Int.* *32*, 178–186.
- Campuzano, A., Cambras, T., Vilaplana, J., Canal, M.M., Carulla, M., and Díez-Noguera, A. (1999). Period length of the light-dark cycle influences the growth rate and food intake in mice. *Physiol. Behav.* *67*, 791–797.
- Chepesiuk, R. (2009). Missing the Dark: Health Effects of Light Pollution. *Environ. Health Perspect.* *117*, A20–A27.
- Dauchy, R.T., Wren-Dail, M.A., Hoffman, A.E., Hanifin, J.P., Warfield, B., Brainard, G.C., Hill, S.M., Belancio, V.P., Dauchy, E.M., and Blask, D.E. (2016). Effects of Daytime Exposure to Light from Blue-Enriched Light-Emitting Diodes on the Nighttime Melatonin Amplitude and Circadian Regulation of Rodent Metabolism and Physiology. *Comp. Med.* *66*, 373–383.

- Delibas, N., Tuzmen, N., Yonden, Z., and Altuntas, I. (2002). Effect of functional pinealectomy on hippocampal lipid peroxidation, antioxidant enzymes and N-methyl-D-aspartate receptor subunits 2A and 2B in young and old rats. *Neuro Endocrinol. Lett.* *23*, 345–350.
- Díez-Noguera, A. (2013). Methods for serial analysis of long time series in the study of biological rhythms. *J. Circadian Rhythms* *11*, 7.
- Harb, F., Hidalgo, M.P., and Martau, B. (2015). Lack of exposure to natural light in the workspace is associated with physiological, sleep and depressive symptoms. *Chronobiol. Int.* *32*, 368–375.
- LeGates, T.A., Fernandez, D.C., and Hattar, S. (2014). Light as a central modulator of circadian rhythms, sleep and affect. *Nat. Rev. Neurosci.* *15*, 443–454.
- Mendez, N., Abarzua-Catalan, L., Vilches, N., Galdames, H.A., Spichiger, C., Richter, H.G., Valenzuela, G.J., Seron-Ferre, M., and Torres-Farfan, C. (2012). Timed maternal melatonin treatment reverses circadian disruption of the fetal adrenal clock imposed by exposure to constant light. *PloS One* *7*, e42713.
- Moore, R.Y., Speh, J.C., and Leak, R.K. (2002). Suprachiasmatic nucleus organization. *Cell Tissue Res.* *309*, 89–98.
- Münch, M., Nowozin, C., Regente, J., Bes, F., De Zeeuw, J., Hädel, S., Wahnschaffe, A., and Kunz, D. (2016). Blue-Enriched Morning Light as a Countermeasure to Light at the Wrong Time: Effects on Cognition, Sleepiness, Sleep, and Circadian Phase. *Neuropsychobiology* *74*, 207–218.
- Plano, S.A., Casiraghi, L.P., García Moro, P., Paladino, N., Golombek, D.A., and Chiesa, J.J. (2017). Circadian and Metabolic Effects of Light: Implications in Weight Homeostasis and Health. *Front. Neurol.* *8*, 558.
- Quiles, C.L., de Oliveira, M.A.B., Tonon, A.C., and Hidalgo, M.P.L. (2016). Biological adaptability under seasonal variation of light/dark cycles. *Chronobiol. Int.* *33*, 964–971.
- Schmidt, T.M., Chen, S.-K., and Hattar, S. (2011). Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells: many subtypes, diverse functions. *Trends Neurosci.* *34*, 572–580.
- Van Someren, E.J., Swaab, D.F., Colenda, C.C., Cohen, W., McCall, W.V., Rosenquist, P.B. (1999). Bright light therapy: improved sensitivity to its effects on rest-activity rhythms in Alzheimer patients by application of nonparametric methods. *Chronobiol Int.* *v16* 505–518.
- Voiculescu, S.E., Le Duc, D., Roşca, A.E., Zeca, V., Chiţimuş, D.M., Arsene, A.L., Drăgoi, C.M., Nicolae, A.C., Zăgrean, L., Schöneberg, T., et al. (2016). Behavioral and molecular effects of prenatal continuous light exposure in the adult rat. *Brain Res.* *1650*, 51–59.
- Wang, X.-S., Armstrong, M.E.G., Cairns, B.J., Key, T.J., and Travis, R.C. (2011). Shift work and chronic disease: the epidemiological evidence. *Occup. Med. Oxf. Engl.* *61*, 78–89.

## 7. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

**Destacamos os seguintes achados do experimento realizados para esta dissertação:**

- A luz circadiana é capaz de alterar o comportamento de atividade de roedores através da mudança gradativa de sua temperatura de cor que tenta mimetizar as variações naturais de iluminação do ambiente;
- O pico reativo de atividade no início da fase clara e a acrofase do ritmo de atividade/reposo foram os parâmetros capazes de diferenciar os grupos CL e SL.

**Estes achados apresentam um potencial translacional, uma vez que:**

- A iluminação com espectro de cor pode ser uma alternativa para minimizar os efeitos negativos da exposição indiscriminada e em excessiva à iluminação artificial, já que mimetizando as variações naturais da luz, permitem ao organismo antecipar-se em relação às variações cíclicas do ambiente.
- As condições de iluminação padrão utilizadas nos biotérios não reproduzem as condições naturais do ambiente e poderiam ser repensadas tendo em vista a melhoria na confiabilidade dos dados produzidos.
- Tendo em vista o crescente número de evidências mostrando o impacto da luz artificial tanto na saúde do ser humano quanto no equilíbrio do meio ambiente, políticas públicas que deem atenção à questão da iluminação artificial em ambientes de trabalho, hospitais e escolas, bem como ao fenômeno de poluição luminosa nas cidades são fundamentais.

**Portanto, as nossas perspectivas são:**

- Realizar estudos em seres humanos que avaliem o efeito da iluminação artificial em desfechos como ganho de peso (neonatos em UTIs pediátricas) e sintomas psiquiátricos (internação psiquiátrica hospitalar).
- Aprofundar os conhecimentos a cerca da luz circadiana em desfechos eletrofisiológicos, metabólicos e comportamentais.
- Testar a utilização da iluminação circadiana, como uma ferramenta que possibilite a minimização dos efeitos da exposição excessiva à iluminação artificial (como pacientes internados, neonatos em processo de ganho de peso e trabalhadores de conglomerados urbanos sem acesso à iluminação natural).

## 8. REFERÊNCIAS DA REVISÃO DE LITERATURA

1. Haim A, Portnov, Boris A. Light Pollution as a New Risk Factor for Human Breast and Prostate Cancers. 2013;168.
2. Chepesiuk R. Missing the Dark: Health Effects of Light Pollution. *Environ Health Perspect*. 2009 Jan;117(1):A20–7.
3. Mills P, Tomkins SC, Schlangen LJ. The effect of high correlated colour temperature office lighting on employee wellbeing and work performance. *J Circadian Rhythms* [Internet]. 2007 Jan 11 [cited 2018 Feb 19];5(0). Available from: <http://www.jcircadianrhythms.com/articles/10.1186/1740-3391-5-2/>
4. Moore RY. The suprachiasmatic nucleus and the circadian timing system. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2013;119:1–28.
5. LeGates TA, Fernandez DC, Hattar S. Light as a central modulator of circadian rhythms, sleep and affect. *Nat Rev Neurosci*. 2014 Jul;15(7):443–54.
6. Harb F, Hidalgo MP, Martau B. Lack of exposure to natural light in the workspace is associated with physiological, sleep and depressive symptoms. *Chronobiol Int*. 2015 Apr;32(3):368–75.
7. Smolensky MH, Sackett-Lundeen LL, Portaluppi F. Nocturnal light pollution and underexposure to daytime sunlight: Complementary mechanisms of circadian disruption and related diseases. *Chronobiol Int*. 2015;32(8):1029–48.
8. Yuval Noah Harari. *HOMO DEUS - Uma breve história do amanhã*. Companhia das Letras; 2016. 448 p.
9. Braden R. Allenby, Daniel Sarewitz. *The Techno-Human Condition*. The MIT Press; 2011. 240 p.
10. John Jacob O'Neill. *Prodigal Genius - The Life of Nikola Tesla*. Brotherhood of Life Inc; 1994.
11. Falchi F, Cinzano P, Duriscoe D, Kyba CCM, Elvidge CD, Baugh K, et al. The new world atlas of artificial night sky brightness. *Sci Adv*. 2016;2(6):e1600377.
12. Hawking S. *O universo numa casca de noz*. Editora Intrínseca; 2016. 287 p.
13. Antoni Díez-Noguera, Trinitat Cambras Riu, JV Hortensi, NC Cucurela. *Cronobiologia*. Livre Editora; 2007. 160 p.
14. Vaze KM, Sharma VK. On the adaptive significance of circadian clocks for their owners. *Chronobiol Int*. 2013 May;30(4):413–33.
15. Roenneberg T, Merrow M. The Circadian Clock and Human Health. *Curr Biol*. 2016 May 23;26(10):R432–43.
16. Silver R, Rainbow M. The Suprachiasmatic Nucleus and the Circadian Timekeeping System of the Body. In: *Neuroscience in the 21st Century* [Internet]. Springer, New

- York, NY; 2013 [cited 2018 Feb 20]. p. 1847–88. Available from: [https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-1-4614-1997-6\\_66](https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-1-4614-1997-6_66)
17. Bell-Pedersen D, Cassone VM, Earnest DJ, Golden SS, Hardin PE, Thomas TL, et al. Circadian Rhythms from Multiple Oscillators: Lessons from Diverse Organisms. *Nat Rev Genet.* 2005 Jul;6(7):544–56.
  18. Van Dongen HPA, Kerkhof GA, Dinges DF. Human Circadian Rhythms. In: Ph.D AS, editor. *Molecular Biology of Circadian Rhythms* [Internet]. John Wiley & Sons, Inc.; 2004 [cited 2018 Feb 20]. p. 255–69. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471459186.ch11/summary>
  19. Reppert SM, Weaver DR. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature.* 2002 Aug 29;418(6901):935–41.
  20. Duffy JF, Czeisler CA. Effect of Light on Human Circadian Physiology. *Sleep Med Clin.* 2009 Jun;4(2):165–77.
  21. Weaver DR. The suprachiasmatic nucleus: a 25-year retrospective. *J Biol Rhythms.* 1998 Apr;13(2):100–12.
  22. Stephan FK, Zucker I. Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1972 Jun;69(6):1583–6.
  23. Moore RY, Eichler VB. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res.* 1972 Jul 13;42(1):201–6.
  24. Zubidat AE, Haim A. Artificial light-at-night - a novel lifestyle risk factor for metabolic disorder and cancer morbidity. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 2017 Jul 26;28(4):295–313.
  25. Teboul M, Gréchez-Cassiau A, Guillaumond F, Delaunay F. How nuclear receptors tell time. *J Appl Physiol Bethesda Md 1985.* 2009 Dec;107(6):1965–71.
  26. Lall GS, Atkinson LA, Corlett SA, Broadbridge PJ, Bonsall DR. Circadian entrainment and its role in depression: a mechanistic review. *J Neural Transm Vienna Austria 1996.* 2012 Oct;119(10):1085–96.
  27. Schmidt TM, Chen S-K, Hattar S. Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells: many subtypes, diverse functions. *Trends Neurosci.* 2011 Nov;34(11):572–80.
  28. Ávila Moraes C, Cambras T, Diez-Noguera A, Schimitt R, Dantas G, Levandovski R, et al. A new chronobiological approach to discriminate between acute and chronic depression using peripheral temperature, rest-activity, and light exposure parameters. *BMC Psychiatry.* 2013 Mar 9;13:77.
  29. Ben-Hamo M, Larson TA, Duge LS, Sikkema C, Wilkinson CW, Iglesia HO de la, et al. Circadian Forced Desynchrony of the Master Clock Leads to Phenotypic Manifestation of Depression in Rats. *eNeuro.* 2016 Nov 1;3(6):ENEURO.0237-16.2016.

30. Wells AM, Ridener E, Bourbonais CA, Kim W, Pantazopoulos H, Carroll FI, et al. Effects of Chronic Social Defeat Stress on Sleep and Circadian Rhythms Are Mitigated by Kappa-Opioid Receptor Antagonism. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2017 Aug 9;37(32):7656–68.
31. Pilz LK, Trojan Y, Quiles CL, Benvenuti R, Melo G, Levandovski R, et al. Effects of N-acetylcysteine and imipramine in a model of acute rhythm disruption in BALB/c mice. *Chronobiol Int*. 2015 Mar;32(2):248–54.
32. Guerrero-Vargas NN, Espitia-Bautista E, Buijs RM, Escobar C. Shift-work: is time of eating determining metabolic health? Evidence from animal models. *Proc Nutr Soc*. 2018 Jan 8;1–17.
33. Wideman CH, Murphy HM. Constant light induces alterations in melatonin levels, food intake, feed efficiency, visceral adiposity, and circadian rhythms in rats. *Nutr Neurosci*. 2009 Oct;12(5):233–40.
34. Aschoff J. Circadian rhythms: influences of internal and external factors on the period measured in constant conditions. *Z Tierpsychol*. 1979 Mar;49(3):225–49.
35. Khizhkin EA, Ilukha VA, Vinogradova IA, Uzenbaeva LB, Ilyina TN, Yunash VD, et al. Physiological and Biochemical Mechanisms of Lifespan Regulation in Rats Kept Under Various Light Conditions. *Curr Aging Sci*. 2017;10(1):49–55.
36. Peng Y, Stoleru D, Levine JD, Hall JC, Rosbash M. *Drosophila* free-running rhythms require intercellular communication. *PLoS Biol*. 2003 Oct;1(1):E13.
37. Pittendrigh CS, Daan S. A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. *J Comp Physiol*. 1976 Oct 1;106(3):333–55.
38. Cho Y, Ryu S-H, Lee BR, Kim KH, Lee E, Choi J. Effects of artificial light at night on human health: A literature review of observational and experimental studies applied to exposure assessment. *Chronobiol Int*. 2015;32(9):1294–310.
39. Bedrosian TA, Nelson RJ. Timing of light exposure affects mood and brain circuits. *Transl Psychiatry*. 2017 Jan;7(1):e1017.
40. Mure LS, Le HD, Benegiamo G, Chang MW, Rios L, Jillani N, et al. Diurnal transcriptome atlas of a primate across major neural and peripheral tissues. *Science*. 2018 Feb 8;
41. Rosenthal NE, Sack DA, Gillin JC, Lewy AJ, Goodwin FK, Davenport Y, et al. Seasonal affective disorder. A description of the syndrome and preliminary findings with light therapy. *Arch Gen Psychiatry*. 1984 Jan;41(1):72–80.
42. Wirz-Justice A, Kräuchi K, Graw P. An underlying circannual rhythm in seasonal affective disorder? *Chronobiol Int*. 2001 Mar;18(2):309–13.
43. Quiles CL, de Oliveira MAB, Tonon AC, Hidalgo MPL. Biological adaptability under seasonal variation of light/dark cycles. *Chronobiol Int*. 2016;33(8):964–71.

44. Weiner N, Clement HW, Gemsa D, Wesemann W. Circadian and seasonal rhythms of 5-HT receptor subtypes, membrane anisotropy and 5-HT release in hippocampus and cortex of the rat. *Neurochem Int.* 1992 Jul;21(1):7–14.
45. Karatsoreos IN, Bhagat S, Bloss EB, Morrison JH, McEwen BS. Disruption of circadian clocks has ramifications for metabolism, brain, and behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Jan 25;108(4):1657–62.
46. Fujioka A, Fujioka T, Tsuruta R, Izumi T, Kasaoka S, Maekawa T. Effects of a constant light environment on hippocampal neurogenesis and memory in mice. *Neurosci Lett.* 2011 Jan 13;488(1):41–4.



## 9. METODOLOGIA (ANEXO I)

### **Delineamento**

Ratos da linhagem Wistar fêmeas obtidas da Unidade de Experimentação Animal (UEA) localizada no Hospital de Clínicas de Porto Alegre foram agrupadas aos pares e colocadas em caixas com um macho durante uma semana para o acasalamento. Após este período, foram alocadas na estante de fotoperíodo da unidade sob as mesmas condições controladas de temperatura ( $22 \pm 2$  °C), umidade e ruído, mas expostas a diferentes fotoperíodos e sistemas de iluminação. O dia do nascimento, que ocorreu por volta de 21 dias após o acasalamento, foi designado dia pós-natal 0 (PND 0). Os filhotes machos foram priorizados para a padronização das ninhadas em 8 filhotes. As ratas genitoras e seus filhotes permaneceram nestas condições até o PND 21, quando as ninhadas foram desmamadas, os filhotes fêmeas destinados a outro estudo do grupo de pesquisa e os experimentos deste estudo realizados com os filhotes machos (n=32). A partir do dia do desmame e durante todo o experimento, os animais estiveram alocados individualmente em caixas moradia de acrílico transparente (Panlab Harvard Apparatus; 25 x 15 x 25cm) com água e comida ad libitum, e permaneceram nestas mesmas condições de iluminação, que tiveram início na gestação, até o final do estudo, enquanto os ritmos de atividade/repouso eram registrados continuamente. Todos os experimentos realizados neste estudo foram aprovados pelo Comissão de Ética no Uso de Animais do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (número de aprovação 160044 – CEUA/HCPA). A carta de aprovação do projeto está disponível no ANEXO II.

## **Intervenção**

Desde o início da gestação, os animais foram expostos a quatro diferentes grupos de iluminação. O número amostral de cada grupo, bem como as características da luz utilizada estão descritos abaixo:

- Luz constante (LL): os animais (n=6) foram expostos à iluminação LED com temperatura de cor de 4000K acesa constantemente;
- Escuro constante (DD): os animais (n=9) ficaram expostos ao escuro constantemente;
- Luz circadiana (CL): os animais (n=9) foram expostos à iluminação LED com regime claro/escuro de 16:8h, desenvolvida para simular as variações naturais de luz. Esse sistema de iluminação apresenta variações na temperatura de cor que vão de 2700K à 6500K ao longo das primeiras 6 horas da fase clara, e gradualmente, retornam à temperatura de 2700K ao longo das 10 horas restantes;
- Luz padrão (SL): os animais (n=8) foram expostos à iluminação LED com temperatura de cor que permaneceu constante em 4000K durante o período em que ficava acesa no regime claro/escuro de 16:8h;

Os regimes de iluminação dos grupos CL e SL foram reproduzidos de acordo com os protocolos já estabelecidos pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Cronobiologia e Sono. Ambas lâmpadas com padrão 16:8h foram fornecidas pela empresa Luxion Iluminação™ (Caxias do Sul, Brazil), tendo como características a emissão de 1500 lúmens e potência de 10W.

### **Caracterização do ritmo de atividade/repouso**


As caixas moradias onde os animais permaneceram isolados a partir do desmame eram equipadas com actígrafos (ADNplin, ©Antoni Díez-Noguera, Barcelona, CA, Spain), aparatos que contêm feixes de luz infravermelha, que contabilizam uma unidade de atividade locomotora cada vez que são interrompidos. O intervalo de coleta de dados utilizado foi de 10 minutos. Os dados de atividade/repouso foram coletados do PND 22 ao PND 49, com excessão de um animal do grupo DD e três do grupo CL (DD: PND 30 - PND 57; CL: PND 32 - PND 59; PND 31 - PND 58; PND 31 - PND 58) que apresentaram períodos sem coleta de dados em função de mau funcionamento do equipamento. Após inspeção visual dos actogramas de todos os animais do estudo, constatando que o padrão de atividade não variou em função do PND durante os dias de ausência de dados, decidiu-se por incluir os animais com os dados iniciais incompletos nas análises deste estudo.

### **Análise dos dados**

A avaliação do ritmo de atividade/repouso foi conduzida com software integrado de cronobiologia El Temps (©Antoni Díez-Noguera, Barcelona, CA, Spain). Com a finalidade de ilustrar os ritmos de atividade/repouso, actogramas “double-plot” foram gerados utilizando as séries derivadas de cada grupo experimental, ou seja, séries com os valores médios para cada grupo. O valor total de atividade foi calculado para cada dia e depois utilizado para o cálculo do valor total médio de atividade para os 28 dias consecutivos de cada animal. Com a análise de cosinor, que ajusta os dados a uma curva sinusoidal de 24 horas, foi possível obter os dados de amplitude (diferença entre os pontos extremos da oscilação da curva sinusoidal) e acrofase (medida do momento/tempo em que o valor máximo é mais provável de ser encontrado na curva sinusoidal) de atividade. A análise de forma de onda (do ingles,

*waveform analysis*) foi utilizada para o cálculo de variáveis não-paramétricas, ou seja, que não estão associadas a parâmetros de uma função conhecida (e.g. sinusoidal), e para gerar a onda representativa de um dia do ritmo de atividade de cada grupo. A análise de forma de onda forneceu alguns parâmetros rítmicos como “intradaily variability” (IV), que quantifica a fragmentação do ritmo (e.g. períodos de repouso durante a fase ativa e vice-versa); “interdaily stability” (IS), que quantifica a sincronização ao ciclo claro-escuro de 24h; a média de atividade durante o período das 5h menos ativas ou atividade noturna (L5); e a média de atividade durante o período das 10h mais ativas ou atividade diurna (M10). Periodogramas de Sokolove-Bushell foram calculados para cada animal e os períodos principais obtidos foram analisados. A análise de Fourier foi aplicada aos dados de 28 dias de registro, permitindo a descrição dos harmônicos que compõem o ritmo de atividade/repouso. Com esta análise, obteve-se o poder (PC) para cada um dos 15 harmônicos principais expressos como porcentagem da variância (%Var). PC dos harmônicos de cada animal foram usados para cálculo da média por grupo e representados por escala de cinza em gráficos de matriz (um harmônico por coluna). Além disso, a análise seriada dos valores de PC de cada harmônico foi calculado para a média de todos os 28 dias de acordo com cada grupo. Shapiro-Wilk foi usado para verificar a normalidade dos dados. Teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn foram realizados para comparar os parâmetros rítmicos entre os grupos. Os valores de  $P \leq 0.05$  foram considerados estatisticamente significativos. A análise estatística e os gráficos foram feitos utilizando SPSS para Windows (version 18; SPSS Inc., Chicago, IL) e GraphPad Prism versão 6.0 para Mac (GraphPad Software, San Diego, CA). As comparações entre as acrofases dos grupos CL e SL foram realizadas através do teste de Watson-Williams para dados circulares.

## 10. CARTA DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELA CEUA/HCPA (ANEXO II)



**HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE**  
**GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/HCPA) analisou o projeto.

**Projeto:** 160044  
**Data da Versão do Projeto:** 17/05/2016

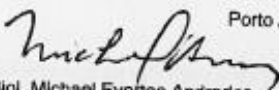
**Pesquisadores:**  
MARIA PAZ LOAYZA HIDALGO  
JULIANA CASTILHOS BEAUVALET  
MAYARA VENDRAMIN PASQUETTI  
MARIA ELISA CALCAGNOTTO  
MELISSA ALVES BRAGA DE OLIVEIRA

**Título:** ANÁLISE ELETROFISIOLÓGICA DOS EFEITOS DA ILUMINAÇÃO CIRCADIANA

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08/10/2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais.

- Os membros da CEUA/HCPA não participaram do processo de avaliação de projetos onde constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEUA/HCPA.

Porto Alegre, 27 de maio de 2016.



Biol. Michael Everton Andrades  
Coordenador CEUA/HCPA

## 11. PRODUÇÃO CIENTÍFICA (ANEXO III)

Abaixo, estão listados os resumos publicados em anais de eventos, apresentações orais, palestras, premiações, divulgações em ciência e artigos científicos que foram produzidos com a participação da aluna como integrante do Laboratório de Cronobiologia e Sono do HCPA desde 2012, destacando a produção durante seu período de formação enquanto aluna de mestrado (março/2016 à março/2018) no PPG Psiquiatria e Ciências do Comportamento.

### *Pôster:*

- Oliveira MAB, Moraes CA, Levandovski RM, de Souza CM, Hidalgo MP. The Role of Activity for Rhythms Disruption in Night Shift Workers. 32ª Semana Científica do HCPA, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, 2012.
- Oliveira MAB, Levandovski RM, Achutti LE, Ferreira KR, Goldim JR, Hidalgo MP. A utilização do método genealógico como forma de caracterizar o isolamento cultural e social em comunidades quilombolas. 32ª Semana Científica do HCPA, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, 2012.
- Oliveira MAB, Sasso EM, Uchoa DM, Hidalgo MP. Effects of Melatonin and Exposure to Different Light/dark Cycles in na Animal Modelo of Mammary Carcinogenesis. 33ª Semana Científica do HCPA, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, 2013.
- Sasso EM, Oliveira MAB, Hidalgo MP. Effects of Melatonin and Exposure to Different Light/dark Cycles in na Animal Modelo of Mammary Carcinogenesis. XXVIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, Centro de Convenções do Hotel Gloria em Caxambu – Minas Gerais, 2013.
- Oliveira MAB, Sasso EM, Hidalgo MP. Effects of Melatonin and Exposure to Different Light/dark Cycles in na Animal Modelo of Mammary Carcinogenesis. XXV Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2013.
- Oliveira MAB, Harb F, Hidalgo MP, Martau B. Cronodisrupção está associada à falta de exposição à iluminação natural no ambiente de trabalho. XXVI Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2014.
- Oliveira MAB, Harb F, Hidalgo MP, Martau B. Cronodisrupção está associada à falta de exposição à iluminação natural no ambiente de trabalho. 34ª Semana Científica do HCPA, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, 2014.

- De Souza CM, Carissimi A, Costa D, Francisco AP, Medeiros MS, Ilgenfritz CAV, Oliveira MAB, Frey BN, Adan A, Hidalgo MP. Development of a Mood Rhythm Instrument. 35ª Semana Científica do HCPA, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, 2015.
- Quiles CL, de Oliveira MAB, Tonon AC, Pilz LK, Hidalgo MP. Mudança de Fotoperíodo: Proposta de Modelo Experimental. 35ª Semana Científica do HCPA, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, 2015.
- Quiles CL, Tonon AC, de Oliveira MAB, Beauvalet JC, Hidalgo MPL. Avaliação do Efeito da Iluminação Artificial nos Ritmos Biológicos e Metabolismo. Reunião Regional da SBPC em Palhoça, Universidade do Sul de Santa Catarina - UNISUL, Palhoça, SC, 2016.
- Tonon AC, Quiles CL, de Oliveira MAB, Beauvalet JC, Hidalgo MPL. Avaliação do Efeito da Iluminação nos Ritmos Biológicos de Ratos Wistar. 36ª Semana Científica do HCPA, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, 2016.
- Tonon AC, Quiles CL, de Oliveira MAB, Beauvalet JC, Hidalgo MP. Biological Adaptability Under Seasonal Variation of Light/Dark Cycles. XXXI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, Centro de Convenções e Eventos do Bourbon Cataratas, Foz do Iguaçu, PR, 2016.
- Fabris RC, De Souza CM, Ilgenfritz CAV, Carissimi A, Oliveira MAB, Francisco AP, Medeiros MS, Costa D, Frey BN, Adan A, Hidalgo MP. Tradução para Espanhol e Validação do Instrumento de Ritmo de Humor. 36ª Semana Científica do HCPA, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, 2016.
- Machado V, Pilz LK, Oliveira MAB, Levandovski R, Roenneberg T, Hidalgo MP. Estudo da associação entre exposição à luz, sono e depressão em comunidade quilombolas. XXVIII Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2016.
- Pilz LK, Oliveira MAB, Machado V, Levandovski R, Roenneberg T, Hidalgo MP. Estudo da associação entre exposição à luz, sono e depressão em comunidade quilombolas. I Simpósio Internacional de Saúde da População Negra, Porto Alegre – RS, 2016.
- Pilz LK, Oliveira MAB, Machado V, Levandovski R, Roenneberg T, Hidalgo MP. What we learned from Quilombolas about light, sleep and depression. 23rd Congresso of the European Sleep Research Society, Bologna, 2016.

- Quiles CL, de Oliveira MAB, Beauvalet JC, Tonon AC, Hidalgo MP. Efeitos da Iluminação Artificial nos Ritmos Biológicos e Metabolismo em Ratos Wistar. 69ª Reunião Anual da SBPC, Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Belo Horizonte/MG, 2017.
- Sasso EM, Uchoa DM, de Oliveira MAB, Quiles CL, Boni VHF, Hidalgo MP. Efeitos da Melatonina e Exposição a Diferentes Ciclos de Claro/Escuro em Modelo Animal de Carcinogênese Mamária. 69ª Reunião Anual da SBPC, Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Belo Horizonte/MG, 2017.
- Oliveira MAB, Carissimi A, De Souza CM, Ilgenfritz CAV, Francisco AP, Medeiros MS, Fabris RC, Frey BN, Adan A, Hidalgo MP. Validação do Instrumento de Ritmo de Humor com Avaliação de Parâmetros Cronobiológicos. 69ª Reunião Anual da SBPC, Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Belo Horizonte/MG, 2017.
- Pilz LK, Oliveira MAB, Machado V, Levandovski R, Roenneberg T, Hidalgo MP. Estudo da Associação entre exposição à luz, sono e depressão em comunidades quilombolas. 69ª Reunião Anual da SBPC, Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Belo Horizonte/MG, 2017.
- Tonon AC, Quiles CL, de Oliveira MAB, Beauvalet JC, Hidalgo MP. A Luz Artificial Modifica Os Ritmos Biológicos e o Metabolismo de Ratos Wistar. 37ª Semana Científica do HCPA, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, 2017.
- Rosa GS, Andrades GS, Pilz LK, Oliveira MAB, Hidalgo MP. Impacto da Série "13 Reasons Why" da Saúde Mental de Adolescentes. 37ª Semana Científica do HCPA, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, 2017.
- Abreu AOV, Oliveira MAB, Hidalgo MP. Influência de Diferentes Tipos de Iluminação dos Ritmos de Atividade/Repouso de Ratos Wistar. 37ª Semana Científica do HCPA, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, 2017.
- Abreu AOV, Oliveira MAB, Hidalgo MP. Influência de Diferentes Tipos de Iluminação dos Ritmos de Atividade/Repouso de Ratos Wistar. XXIX Salão de Iniciação Científica da UFRGS, RS, 2017.
- Oliveira MAB, Pilz LK, Kieling C, Salum GA, Passos IC, Borda Telles LE, Rohde LA, Hauck S, Hidalgo MP. Contextualização do Saber: Desenvolvimento de Estudos sobre o Ciclo Vital Humano na Disciplina de Psicologia Médica I. XIII Salão de Ensino da UFRGS, RS, 2017.



- Santos DP, Beauvalet JC, Oliveira MAB, Amorim FA, Freitas JJ, Hidalgo MP. Avaliação do Efeito da Iluminação com Ritmicidade Circadiana no Desenvolvimento Puberal de Ratas Wistar. XXIX Salão de Iniciação Científica da UFRGS, RS, 2017.
- Tonon AC, Quiles CL, Oliveira MAB, Beauvalet JC, Hidalgo MP. Artificial Light Modifies Biological Rhythms and Metabolism of Wistar Rats. XXXII Reunião Anual da FeSBE, Campos do Jordão Convention Center em Campos do Jordão – SP, 2017.
- Tonon AC, Quiles CL, Oliveira MAB, Beauvalet JC, Hidalgo MP. Artificial Light Modifies Biological Rhythms and Metabolism of Wistar Rats. World Congress on Brain, Behavior and Emotion, Centro de Eventos FIERGS em Porto Alegre/RS, 2017.
- Carissimi AC, Pilz LK, Oliveira MAB, Santos DP, Amorim FA, Beauvalet JC, Tonon AC, Ilgenfritz CAV, Hidalgo MP. Seu Corpo, Seu Tempo: Uma Experiência e Difusão e Ensino na Internet. XIII Salão de Ensino da UFRGS, 2017.

**Apresentação Oral:** Oliveira MAB, Carissimi A, Achutti LE, Ferreira KR, Goldim JR, Levandovski RM, Hidalgo MP. A utilização do método genealógico como forma de caracterizar o isolamento cultural e social em comunidades quilombolas. II Jornada Científica do Grupo Hospitalar Conceição (GHC), Porto Alegre – RS, 2013.

**Palestras:**

- Palestrante no Minicurso “Fatores Associados à Restrição de Sono: O que fazer?”, realizada na XXIII Semana Acadêmica de Medicina da UFRGS em 2017.
- Palestra “Sono e ritmos biológicos na saúde da mãe e do bebê” durante o I Simpósio de Saúde Materno Infantil, Caxias do Sul – RS, 2017.

**Vídeo:** Tonon AC, Quiles CL, Oliveira MAB, Beauvalet JC, Hidalgo MPL. Resgatando o Escuro: a Luz ao Encontro da Fisiologia. VI Feira de Inovação Tecnológica da UFRGS – FINOVA em 2016.

**Premiações:**

- Destaque na área Ciências da Saúde e Ciências Biológicas da VI Feira de Inovação Tecnológica da UFRGS, 2016.

- Menção Honrosa na XXXI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, Centro de Convenções e Eventos do Bourbon Cataratas, Foz do Iguaçu, PR, 2016.
- Menção Honrosa para o trabalho “Efeitos da Iluminação Artificial nos Ritmos Biológicos e Metabolismo em Ratos Wistar” na 69ª Reunião Anual da SBPC, Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Belo Horizonte/MG, 2017.
- Menção Honrosa para o trabalho “Efeitos da Melatonina e Exposição a Diferentes Ciclos de Claro/Escuro em Modelo Animal de Carcinogênese Mamária” na 69ª Reunião Anual da SBPC, Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Belo Horizonte/MG, 2017.
- Pôster Destaque de dia na 32ª Semana Científica do HCPA, Hospital de Clínicas de Porto Alegre – RS. The Role of Activity for Rhythms Disruption in Night Shift Workers. 2012.
- Destaque na sessão Bioética, Ensino Médico e Epidemiologia no XXIV Salão de Iniciação Científica da UFRGS (Apresentação: Melissa Alves Braga de Oliveira. The Role of Activity for Rhythms Disruption in Night Shift Workers), 2012.
- Jovem Pesquisador SIC XXVIII (Apresentação: Valdomiro Machado. Estudo da associação entre exposição à luz, sono e depressão em comunidades quilombolas), UFRGS, 2016.

### ***Artigos publicados***

Quiles, CL ; Oliveira, MAB ; Piazza, FV ; Pilz, LK; Hidalgo, MP. Mudança de fotoperíodo: proposta de modelo experimental. CLINICAL & BIOMEDICAL RESEARCH, v. 34, p. 307-312, 2014.

Quiles CL, de Oliveira MA, Tonon AC, Hidalgo MP. Biological adaptability under seasonal variation of light/dark cycles. Chronobiol Int. 2016;33(8):964-71. doi: 10.1080/07420528.2016.1182175. Epub 2016 May 24. PubMed PMID: 27222076.

de Souza, Camila M., Carissimi, Alicia, Costa, Daniele, Francisco, Ana Paula, Medeiros, Madeleine S., Ilgenfritz, Carlos A., de Oliveira, Melissa A., Frey, Benicio N., & Hidalgo, Maria Paz. (2016). The Mood Rhythm Instrument: development and preliminary report. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 38(2), 148-153. <https://dx.doi.org/10.1590/1516-4446-2015-1763>

Francisco, AP ; **Oliveira, MAB** ; Carissimi, A ; Fabris, R. ; Ilgenfritz, CA ; Souza, CM; Medeiros, MS; Adan, A. ; Hidalgo, MP. Spanish translation of the mood rhythm instrument: a novel approach to mood evaluation. *Clinical and Biomedical Research*, v. 37, p. 41-47, 2017.

Castilhos Beauvalet, Juliana; Luísa Quiles, Caroline ; **Alves Braga De Oliveira, Melissa** ; Vieira Ilgenfritz, Carlos Augusto ; Hidalgo, Maria Paz ; Comiran Tonon, André . Social Jetlag In Health And Behavioral Research: A Systematic Review. *Chronophysiology And Therapy*, V. Volume 7, P. 19-31, 2017.

### ***Artigos submetidos***

Luísa K. Pilz , Rosa Levandovski ,Melissa A. B. Oliveira , Maria Paz Hidalgo, Till Roenneberg. Sleep and light exposure across different levels of urbanisation in Brazilian communities. **Status:** Submetido à revista *Scientific Reports* (Qualis Capes - Medicina II – A1) em Jan/2018 em processo de revisão pelos autores após peer-review.

Alicia Carissimi, Melissa Alves Braga de Oliveira, Benicio N. Frey, Ana Paula Francisco, Madeleine Scop Medeiros, Raul Costa Fabris, Carlos Augusto Vieira Ilgenfritz, Camila Morelato De Souza, Ana Adan, Maria Paz Hidalgo. Spanish validation of the Mood Rhythm Instrument and its relationship with chronotype and social jetlag, **Status:** Submetido à revista *Plos One* (Qualis Capes - Medicina II – A2) em Out/2017 aguardando decisão editor.

Alicia Carissimi, Luísa K. Pilz, Melissa A. B. Oliveira, Ana Paula Francisco, Raul Fabris, Madeleine Medeiros, Marina Scop, Benicio Frey, Ana Adan, Maria Paz Hidalgo. Rhythmicity of Mood Symptoms in Individuals at Risk for Psychiatric Disorders. **Status:** Submetido à revista *Scientific Reports* (Qualis Capes - Medicina II – A1) em Fev/2018 aguardando decisão editor.

Caroline Luísa Quiles, Melissa Alves Braga de Oliveira, Julian Castilhos Beauvalet, André Comiran Tonon, Maria Paz Hidalgo. The influence of distinct light color temperature on metabolism and biological rhythms of Wistar rats. **Status:** Submetido à revista *Environmental Pollution* (Qualis Capes - Medicina II – A1) em Fev/2018 aguardando decisão editor.