

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



Caroline Luísa Quiles

Iluminação Artificial: Efeito do Fotoperíodo e do Espectro de Cor sobre os
Ritmos Biológicos e Metabolismo

Porto Alegre

2017

Caroline Luísa Quiles

Iluminação Artificial: Efeito do Fotoperíodo e do Espectro de Cor sobre os
Ritmos Biológicos e Metabolismo

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

Porto Alegre

2017

CIP - Catalogação na Publicação

Quiles, Caroline Luísa

Iluminação Artificial: Efeito do Fotoperíodo e do Espectro de Cor sobre os Ritmos Biológicos e Metabolismo / Caroline Luísa Quiles. -- 2017.

91 f.

Orientadora: Maria Paz Loayza Hidalgo.

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, 2017.

1. Cronobiologia. 2. Iluminação. 3. Ritmos Biológicos. 4. Metabolismo. I. Hidalgo, Maria Paz Loayza, orient. II. Título.

CAROLINE LUÍSA QUILES

**ILUMINAÇÃO ARTIFICIAL: EFEITO DO FOTOPERÍODO E DO ESPECTRO DE
COR SOBRE OS RITMOS BIOLÓGICOS E METABOLISMO**

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

Porto Alegre, 15 de Maio de 2017.

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado elaborada por Caroline Luísa Quiles, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Psiquiatria e Ciências do Comportamento.

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Pedro Vieira da Silva Magalhães (UFRGS)

Prof.^aDr.^a Adriane Ribeiro Rosa (UFRGS)

Prof. Dr. AntoniDíez-Noguera (UB)

Prof.^aDr.^a Maria Paz Loayza Hidalgo - Orientadora

“Nothing in biology makes sense except in the light of evolution.”

TheodosiusDobzhansky. EvolutionaryBiologist.

Agradecimentos

À minha orientadora, Prof^ª Maria Paz Loayza Hidalgo, que agradeço não somente pelo apoio durante a execução deste trabalho, mas também por ser um exemplo de professora que se preocupa com o crescimento pleno de seus alunos. Pela sua visão e paciência em mostrar que somos capazes e merecedores, mesmo quando nós mesmos não acreditamos.

Aos queridos colegas com que tive o prazer de conviver e aprender no Laboratório de Cronobiologia e Sono do HCPA/UFRGS. Vocês fizeram os meus dias mais leves e divertidos. Foi ótimo crescer com vocês!

Em especial, às minhas amigas e amigo: Melissa, Juliana, Lully e André, que por sortetambém são meus colegas. Por estarem sempre dispostos a compartilhar de seus dons e apoio, sem dos quais este trabalho não seria uma realidade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Psiquiatria e Ciências do Comportamento, 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 empresa Luxion Iluminações, pelo incentivo fundamental à pesquisa científica e por oportunizarem a realização deste trabalho.

Àsecretária do Programa de Pós-graduação em Psiquiatria e Ciências do Comportamento, Claudia Grabinski, pela disposição incansável para resolver todos os problemas, pela receptividade e por todo carinho.

À equipe da Unidade de Experimentação Animal, em especial à enfermeira Marta Cioato, pela extrema competência na condução da unidade e constante apoio aos pesquisadores.

Ao secretário do Cento de Pesquisa Experimental, Everaldo Almeida, sempre disponível para solucionar os mais diversos problemas, sendo um exemplo de desburocratização. Além do grande carisma e respeito pelos pesquisadores.

À minha mãe, Vânia, por uma vida de dedicação e amor, compreensão e incentivo, que me tornaram uma pessoa plena. Além de me proporcionar a imensa alegria de tê-la como parceira de estudos, discussões e crescimento.

Ao meu pai, David, pelo incondicional apoio mesmo nos momentos mais diversos, sempre buscando minha realização e felicidade.

Ao meu irmão Wagner, por me lembrar de que a vida deve ser levada com mais leveza.

Ao meu amor, Marcos, pelo incentivo constante, pela confiança e cuidado. Dentre muitas dúvidas acerca do futuro, você foi e é a certeza dos meus dias.

À Dra. Rycota e toda equipe da ONG Doutorzinhos, que me ensinaram a conviver e amar meus defeitos, mas principalmente, por terem me ensinado a rir deles.

Por fim, agradeço a todos os amigos e familiares que me apoiaram e estiveram comigo, torcendo nessa jornada.

RESUMO

Objetivo: Avaliar a influencia da iluminação artificial nos ritmos biológicos e metabolismo por meio de dois experimentos em ratos Wistar. O primeiro avalia mudanças de fotoperíodo que mimetizem a sazonalidade; o segundo, a qualidade da iluminação artificial (espectro de cor) no ciclo claro/escuro (LD). **Métodos:** Experimento 1 - Três grupos de animais: Controle (CL; n=6, ciclo LD de 12/12); grupo que inicia com fotoperíodo longo (LP/SP; n=7; LD 16.5:7.5); grupo que inicia com fotoperíodo curto (SP/LP; n=7; LD 7.5:16.5). Os grupos experimentais passaram por 18 dias no fotoperíodo inicial, 17 dias de redução ou aumento gradual do fotoperíodo, 18 dias no fotoperíodo inverso ao que iniciou. Experimento 2 - 36 animais foram mantidos 108 dias em ciclo LD 16:8h, divididos em 2 grupos: *Standard Light* (SL; n=18), mantidos sob iluminação com espectro de cor padrão (LED, 4000K); e *Circadian Light* (CL; n=18) com alterações de espectro de cor ao longo do dia (LED, 2700-6500K). Em ambos os estudos, níveis de atividade e temperatura, além de melatonina e corticosterona sérica, foram mensurados. No Experimento 2, além das pesagens semanais, após eutanásia a gordura visceral foi medida. Os parâmetros circadianos foram obtidos por meio da análise de séries temporais. Na análise estatística foram usados os testes paramétricos ou não paramétricos, de acordo com a normalidade dos dados. **Resultados:** A quantidade de atividade noturna, além dos níveis de corticosterona foram menores no grupo SP/LP ($p < 0.05$). Portanto, os animais demonstraram pior adaptação dos ritmos à transição do fotoperíodo de dia curto para longo (SP/LP). A qualidade de iluminação também influenciou o comportamento animal. O grupo CL apresentou melhores parâmetros rítmicos que o grupo SL, por exemplo, menor intracyclevariability, maior amplitude e quantidade de atividade ($p < 0.05$). Apesar de o peso corporal ter sido similar, o grupo SL apresentou maior quantidade de gordura visceral ($p < 0.05$). Parâmetros rítmicos de atividade correlacionaram com a concentração de melatonina somente no grupo CL, enquanto que parâmetros rítmicos correlacionaram com a concentração de corticosterona principalmente no grupo SL. **Conclusões:** Nosso estudo reforça a relevância da iluminação como um fator importante na regulação do comportamento e metabolismo, sugerindo que o a iluminação artificial comumente utilizada, sem variação de espectro de cor, é um forte fator facilitador do processo de cronodisrupção e aumento de gordura visceral. Ainda, o sistema de iluminação utilizado frequentemente nos alojamentos experimentais podem ser subótimas para simular o ambiente natural. **Apoio:** FIPE/HCPA, CNPq, CAPES e Luxion Iluminação.

Palavras-chave: Cronobiologia. Luz artificial. Ritmos circadianos. Metabolismo.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the influence of artificial illumination on biological rhythms and metabolism by two experiments with Wistar rats. The first one evaluated changes in photoperiod that mimics seasonality; the second one, the quality of artificial light (color spectrum) on light/dark cycle (LD). **Methods:** Experiment 1 – Three animal groups: Control (CL; n=6, LD cycle 12/12); group that started with long photoperiod (LP/SP; n = 7; LD 16.5:7.5); group that started with short photoperiod (SP/LP; n=7; LD 7.5:16.5). Experimental groups passed for 18 days in a start photoperiod, 17 days of gradual increase or decrease of photoperiod, 18 days on inverse photoperiod to what start. Experiment 2 – 36 animals were kept for 108 days in a LD cycle of 16:8h, divided in 2 groups: Standard Light (SL; n=18), kept under illumination with standard color spectrum (LED, 4000K); and Circadian Light (CL; n=18) with changes of color spectrum during the day (LED, 2700-6500K). In both studies, activity and temperature levels, as well as serum melatonin and corticosterone, were measured. On Experiment 2, in addition to weekly weighing, after euthanasia the visceral fat was measured. The circadian parameters were obtained by temporal series analyses. In statistical analyses were used parametric or non-parametric tests, according the normality of data. **Results:** Amount of activity on dark, besides corticosterone levels were lower on SL/LP group ($p < 0.05$). So, animals showed low rhythms adaptation to photoperiod transitions from short to long light (SL/LP). The quality of illumination also influenced in animal behavior. The CL group presented better rhythmic parameters than SL group, for example, low intracycle variability, high amplitude and quantity of activity ($p < 0.05$). Although body weight was similar, SL group presented higher amount of visceral fat ($p < 0.05$). Rhythmic parameters of activity correlated with the melatonin concentration just in CL group, whereas rhythmic parameters correlated with corticosterone concentration principally in SL group. **Conclusions:** Our study reinforces the relevance of illumination as an important factor on metabolic and behavioral regulation, suggesting that artificial illumination commonly used, without color spectrum variation, is a strong facilitating factor on the process of chronodisruption and increase of visceral fat. Thus, the illumination system frequently used in experimental accommodation could be suboptimal for to simulate the natural environment. **Support:** FIFE/HCPA, CNPq, CAPES and Luxion Iluminação.

Key words: Chronobiology. Artificial light. Circadian rhythms. Metabolism.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES DA REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1. Comparação da intensidade e comprimento de onda do Sol, típica lâmpada fluorescente, incandescente e LED. Adaptada de Smith (2016).

Figura 2.a. Consumo de energia mundial total em bilhões de toneladas de BCU .
Figura 2.b. Ilustração da estimativa de como será a visão da Terra em 2600. Ambas as figuras foram adaptadas do livro “O Universo numa Casca de Noz”, de Stephen Hawking (2016).

Figura 3. Ritmos biológicos com frequência circadiana. Adaptada de Lucchesi (2015).

Figura 4. Interação entre o relógio celular autônomo e o metabolismo. Adaptada de Gerhart-Hines (2015).

Figura 5. Mecanismo geral de regulação da melatonina. Figura adaptada de http://avstim.com/Circadian_Rhythms.html.

Figura 6. Potenciais vias nas quais a luz pode influenciar o comportamento. Adaptada de Bedrosian (2013).

Figura 7. Uma visão geral da organização funcional do sistema circadiano em mamíferos. Adaptada de Garaulet (2010).

Figura 8. Impacto do ambiente moderno nas funções circadianas evolutivamente programadas. Adaptada de Gerhart-Hines (2015).

LISTA DE ABREVIATURAS EM PORTUGUÊS DA REVISÃO DE LITERATURA

AVP - Arginina vasopressina

ACTH - Hormônio adrenocorticotrófico

CK1 δ/ϵ - Caseína quinase 1 δ e ϵ

CRH - Hormônio liberador de corticotrofina

GCs - Glicocorticoides

HDAC3 - Histona deacetilase 3

HPA - Hipófise-pituitária-adrenal

HPC - Hipocampo

ipRGCs - Células ganglionares intrinsecamente fotossensíveis

°K - Graus Kelvin

LED - Diodo emissor de luz

nm - Nanômetros

PFC - Córtex pré-frontal

PVN - Núcleo paraventricular

SCG - Gânglio cervical superior

LISTA DE ABREVIATURAS EM INGLÊS DA REVISÃO DE LITERATURA

bHLH - Basic helix-loop-helix

BMAL1 - Brain and muscle ARNT-like 1

CLOCK - Circadian locomotor output cycles kaput

CRY1/2 - Cryptochromes 1 e 2

FBXL3 - F-box/LRR-repeat protein 3

IARC - International Agency for Research on Cancer

PER1/2/3 - Periods 1, 2 e 3

ROR α/γ - RAR-orphan receptor α and γ

SCN - Suprachiasmatic nucleus

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1. A ILUMINAÇÃO SOB A LUZ DA EVOLUÇÃO	14
2.2. A INFLUÊNCIA DA LUZ NOS RITMOS BIOLÓGICOS	16
2.3. NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO: O OSCILADOR MESTRE	18
2.4. MELATONINA, O HORMÔNIO DO ESCURO	21
CORTISOL, O HORMÔNIO DA ATIVIDADE	21
2.5. COMO O RELÓGIO MOLECULAR COORDENA O METABOLISMO	24
3. JUSTIFICATIVA	28
4. HIPÓTESE	29
5. OBJETIVOS	30
5.1 OBJETIVOS GERAIS	30
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS - EXPERIMENTO 1	30
5.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS - EXPERIMENTO 2	30
6. ARTIGO 1	31
BIOLOGICAL ADAPTABILITY UNDER SEASONAL VARIATION OF LIGHT/DARK CYCLES	31
7. ARTIGO 2	51
ARTIFICIAL LIGHT MODIFIES BIOLOGICAL RHYTHMS AND VISCERAL FAT IN WISTAR RATS	51
8. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	74

1. INTRODUÇÃO

Os seres humanos têm utilizado a luz artificial por muitos anos. A primeira evidência nasce das tentativas de controlar o fogo pelo nosso ancestral *Australopithecus* há 42 milhões de anos. Depois dele, o *Homo erectus* começou a usar o fogo em cavernas há cerca de 500 mil anos^{1,2}. Na Grécia, as lâmpadas eram confeccionadas com cerâmica ou bronze, e começaram a substituir as tochas por volta de 700 a.C. Daquele tempo até o século XIX, a ferramenta de iluminação mais comumente usada e avançada era a vela de cera². No entanto, estes métodos de iluminação produziam luzes de muito baixa intensidade e baixa temperatura de cor, com efeitos quase insignificantes sobre o organismo humano.

Com a revolução industrial, as ferramentas e a tecnologia da iluminação passaram por um processo de desenvolvimento massivo e de melhorias aceleradas após a descoberta da incandescência de um condutor energizado, por Humphrey Davy em 1801. Este processo culminou na segunda metade do século XIX, com o uso prático da lâmpada incandescente desenvolvida por Joseph Swan e Thomas Alva Edison³. Hoje em dia, o aumento da eficiência da produção de eletricidade e a redução dos custos para sua utilização contribuíram para a propagação da iluminação artificial em todo o mundo³.

Como resultado, atualmente nossas casas e locais de trabalho estão altamente iluminados e não temos mais noites de completa escuridão. Na verdade, em 2001, mais 2/3 da população da União Europeia já vivia em regiões onde as noites são mais claras do que seriam sob a luz da lua cheia⁴. Sem contar que desde a década de 1960, os fornecedores de sistemas de iluminação artificial têm tendido a usar lâmpadas de intensidade cada vez mais alta, que consistem principalmente de comprimentos de onda azuis, afetando o sistema circadiano em maior extensão do que qualquer outro^{5,6}.

Enquanto iluminação diurna ao ar livre normalmente varia de 2000 a 100.000 lux, iluminação de ambientes fechados é geralmente significativamente menor, com valores em torno de 500 lux⁷. Assim, os seres humanos alteraram o contraste do ciclo claro/escuro natural, e são crescentes as evidências de que a exposição do ser humano à luz artificial está ligada a uma variedade de efeitos no meio ambiente e na saúde humana. Deste modo, se faz necessário desenvolvimento modelos de exposição à luz artificial para avaliar seu efeito na sincronização de ritmos biológicos, metabolismo e o quanto isto interfere no processo saúde-doença.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A ILUMINAÇÃO SOB A LUZ DA EVOLUÇÃO

A luz, ou simplesmente uma onda eletromagnética cujo comprimento de onda se encontra dentro do intervalo no qual o olho humano é sensível, é um tema que tem provocado a curiosidade do ser humano ao longo da evolução⁸. Isso se dá porque, assim como todos os outros seres vivos que habitam a Terra, os seres humanos têm convivido com um instigante fenômeno cíclico: luz e escuridão. Tendo este ciclo um ritmo de cerca de 24 horas.

Assim como todas as ondas eletromagnéticas, a luz possui três grandezas físicas básicas: intensidade (que se identifica como o brilho, medida em lux), polarização e frequência, tendo esta última nosso interesse em particular⁸. A frequência indica o espectro ou temperatura de cor, que nada mais é do que a cor aparente da luz emitida. Geralmente é quantificada em graus Kelvin (°K) ou em nanômetros (nm). Quando aumentamos a temperatura de cor em °K, a cor da luz emitida passa de uma tonalidade mais quente para uma mais fria (do avermelhado para o azulado), já a relação inversa ocorre em nm, sendo as frequências mais altas as mais próximas do avermelhado e as mais baixas mais próximas do azulado. É importante lembrar que nem todas as frequências são visíveis ao olho humano, e que diferentes animais apresentam amplitudes distintas de luz visível, sendo estas moldadas de acordo com as necessidades fisiológicas de cada organismo. No nosso caso, a fonte mais familiar de luz visível é o Sol, tendo em vista que sua radiação mais intensa está na região que definimos como visível, sendo o pico em torno de 500 nm, sugerindo que nossos olhos se adaptaram ao longo da evolução justamente ao espectro do Sol⁹.

Entretanto, nosso padrão comportamental em relação à luz do Sol mudou muito desde a domesticação do fogo pelo nosso ancestral *Australopithecus*, até o desenvolvimento do diodo emissor de luz azul (LED azul) pelos cientistas Akasaki, Amano e Nakamura, ganhadores do Premio Nobel de física em 2014¹⁰. Da utilização da vela até o LED, foram menos de 300 anos para adaptação aos diferentes padrões de iluminação desenvolvidos (lâmpada incandescente, fluorescente, a gás, entre outras) que não seguem as mesmas características do Sol. E nosso organismo, que evoluiu durante milhões de anos em função um mesmo padrão de luz, já não sabe mais como reagir frente a todas essas mudanças.

Além das diferenças físicas entre a luz emitida pelo Sol e as luzes emitidas pelas fontes artificiais (**Figura 1**), a praticidade da exposição à luz artificial aumentou a duração do dia, e como bônus, não precisamos mais coordenar nossas atividades em função do ritmo

imposto pelo Sol. No entanto, o ônus intrínseco a esta mudança é de que já não somos tão sensíveis como os outros animais às alterações sazonais que a informação solar de dias mais curtos ou mais longos nos proporcionava.

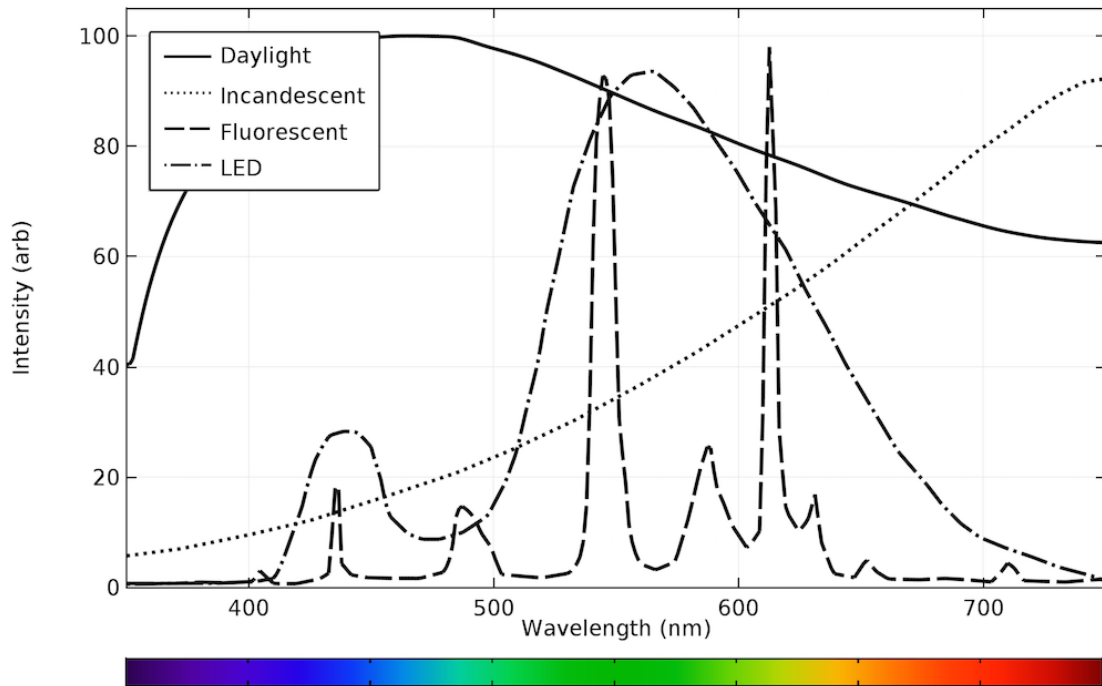
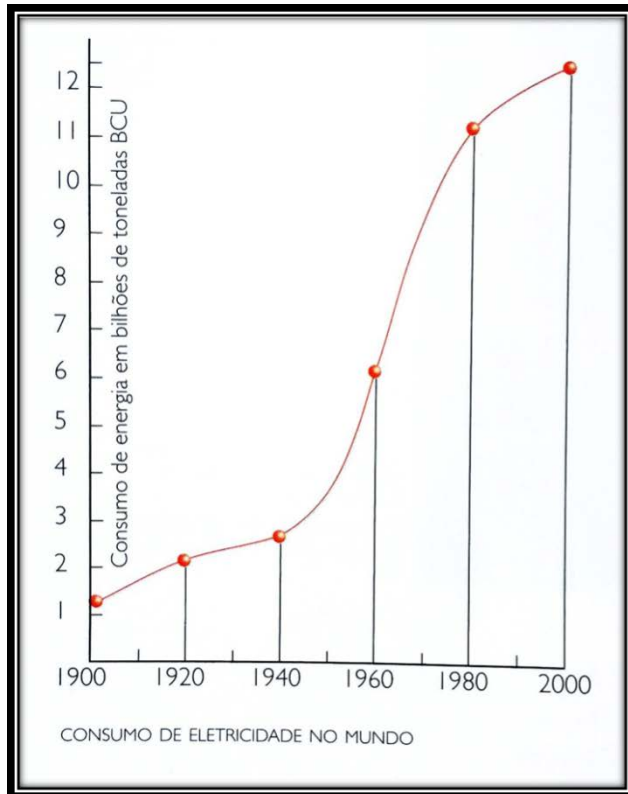


Figura 1. Comparação da intensidade e comprimento de onda do Sol, da típica lâmpada fluorescente, lâmpada incandescente e LED. Modificada de Smith (2016)⁹.

Como resultado, temos luz disponível durante as 24 horas do dia, mudamos nosso padrão de alimentação, sono, interação social e até trabalho, já que os avanços proporcionados pela eletricidade e pela luz artificial possibilitaram regimes laborais em horários alternativos, visando principalmente a otimização da produtividade e lucro. Chegamos ao ponto de que a *International Agency for Research on Cancer* (IARC) classificou o trabalho por turnos como um agente provavelmente carcinogênico (Grupo 2A) em função principalmente de sua ação na disrupção dos ritmos biológicos^{11,12}.

Todos estes dados se tornam ainda mais alarmantes quando lembramos que dos últimos duzentos anos para cá, tanto a taxa de crescimento da população mundial como de consumo de eletricidade tem crescido exponencialmente, sendo a última duplicada em um intervalo menor que 40 anos¹³ (**Figura 2.a**). 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 espaço¹³ (**Figura 2.b**). Seguindo este princípio, as alterações filogenéticas que nos proporcionaram ser a espécie dominante na Terra já não serão mais suficientes para acompanhar os avanços que nós mesmos impomos em prol do desenvolvimento.



No ano de 2600, a população mundial estaria toda espremida e o consumo de eletricidade faria a Terra brilhar com um vermelho incandescente.

Figura 2.a. (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. **Figura 2.b. (direita)** Ilustração da estimativa de como será a visão da Terra em 2600. Ambas as figuras foram modificadas do livro “O Universo numa Casca de Noz”, de Stephen Hawking¹³.

2.2. A INFLUÊNCIA DA LUZ NOS RITMOS BIOLÓGICOS

Uma variedade de processos fisiológicos e comportamentais ocorre de maneira rítmica na maioria dos seres vivos. Devido à rotação da Terra em torno de seu eixo, a vida é regida por duas condições diárias recorrentes e opostas: o dia e a noite. Pistas temporais ambientais (*zeitgebers*, do alemão *zeit* = tempo e *geber* = doador) modulam a fase e o período em que estes ritmos ocorrem, e o *zeitgeber* mais potente na modulação dos ritmos biológicos é a luz¹⁴.

Para lidar com as mudanças previsíveis do dia e da noite, a maioria das espécies desenvolveu relógios circadianos (do latim *circa* = em torno de, *dies* = dia) permitindo uma antecipação de eventos recorrentes diários¹⁵. O ritmo de atividade/repouso, por exemplo, é considerado um dos ritmos mais importantes dos seres vivos por ser um dos primeiros a se moldar às variações ambientais. Um exemplo disso são as viagens intercontinentais, em que observamos que a primeira variável a sofrer alterações para suprir as necessidades fisiológicas e energéticas do ser humano é o ritmo atividade/repouso¹⁶. Por outro lado, o ritmo de temperatura corporal é considerado um dos ritmos mais robustos do organismo, pois apresenta uma alta resistência para se moldar ao meio e indica, quando modificado, que a intervenção sofrida causou um forte impacto fisiológico no indivíduo¹⁷.

A presença de ritmos biológicos tem sido um fenômeno cotidiano que quase não havia chamado a atenção da comunidade científica, relativamente só até bem pouco tempo. O primeiro experimento conhecido envolvendo ritmos biológicos foi realizado em 1729 pelo astrônomo francês Jacques de Marini, que a partir da observação da planta *mimosa pudica*, descobriu que ela continuava a abrir e fechar sua folhagem a cada dia, mesmo na ausência de informação luminosa, neste caso, de luz solar^{18,19}. Pela primeira vez se demonstrou que os ritmos biológicos eram capazes de se manter mesmo na ausência de sinais temporais do ambiente²⁰. Com a descoberta de que a planta não é controlada apenas pelo claro e escuro, o astrônomo sugeriu a investigação em outras plantas, considerando ciclos de temperatura diária. Ainda, estendeu suas observações a pacientes humanos com problemas de sono, e após algumas décadas, seus experimentos demonstraram a natureza endógena do relógio biológico²¹.

Vendo os estes fenômenos de forma mais atenta, é possível perceber que não se trata de um fato casual, nem do seguimento ou da continuação passiva das condições ambientais externas: trata-se de uma adaptação ao ambiente, essencial para a sobrevivência das espécies. Deste modo, quase todos os seres vivos desenvolveram mecanismos para organizarem-se temporalmente¹⁵.

Diversos eventos endógenos são controlados com uma regularidade circadiana. Na **Figura 3** é possível ver alguns exemplos destes eventos rítmicos nos seres humanos. Todos esses eventos e muitos outros mais, chegando ao nível celular e molecular, dependem de um sistema de controle biológico rígido e ao mesmo tempo adaptável ao ambiente. Um sistema capaz de se sincronizar o organismo autonomamente e também ser sensível aos estímulos exógenos. Nos capítulos a seguir, nos aprofundaremos nos detalhes desse sistema e nos fatores que os influenciam.

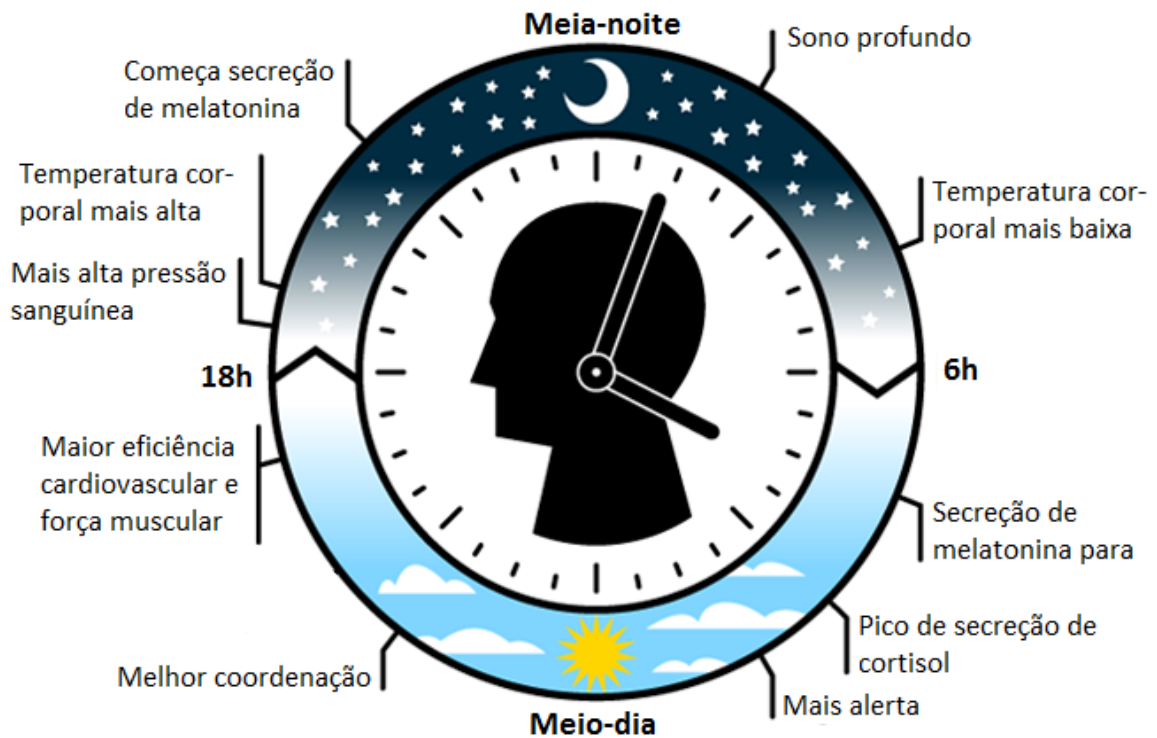


Figura 3. Ritmos biológicos com frequência circadiana. Modificada de Lucchesi 2015²².

2.3. NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO: O OSCILADOR MESTRE

O núcleo supraquiasmático do hipotálamo (do inglês *Suprachiasmatic Nucleus* - SCN), compreende o relógio circadiano mestre em mamíferos²³, o topo de uma hierarquia dos osciladores independentes autossustentáveis. O SCN está localizado no encéfalo, mais especificamente no hipotálamo anterior, diretamente acima do quiasma óptico, e é composto de aproximadamente 50.000 pequenos neurônios densamente compactados em seres humanos e 8.000 a 20.000 neurônios em roedores²⁴⁻²⁶. A composição celular do SCN é diversa e apresenta vários peptídeos e neurotransmissores diferentes²⁷. Existem várias linhas de evidências que confirmam que o SCN é o oscilador circadiano mestre em mamíferos: 1) As lesões de SCN abolem os ritmos circadianos²⁸⁻³⁰, 2) a estimulação elétrica e química do SCN induz mudanças de fase^{31,32}, 3) o transplante de SCN em um animal cujo SCN próprio foi removido restaura a atividade circadiana³³, e 4) neurônios individuais dissociados do SCN exibem oscilações autossustentáveis de longo prazo (1 mês)^{34,35}. A sincronia celular dentro do

SCN é estabelecida através de múltiplos mecanismos, tais como potenciais de ação dependentes do sódio e sinais humorais³⁶.

Enquanto um marca-passo principal localizado no SCN, quase todos os tecidos periféricos - incluindo os tecidos adiposos - e muitos núcleos cerebrais abrigam seus próprios relógios funcionais^{37,38}. O SCN orchestra esses relógios periféricos através do sistema endócrino e nervoso para induzir o comportamento rítmico e fisiológico^{39,40}. Com ele se mantém uma ordem temporal interna, que permite o bom funcionamento do corpo.

Os ritmos circadianos gerados pelo SCN também são influenciados pelo ambiente externo, usando principalmente a informação da luz enviada diretamente da retina para o relógio central. Nos mamíferos, um relógio molecular central que está presente em cada célula é constituído um *loop* de retroalimentação de transcrição-tradução autorregulatório⁴¹⁻⁴³ no SCN e produz ritmos endógenos de aproximadamente 24 horas^{44,45}. Entretanto, os componentes de genes e proteínas deste ciclo podem ser modulados pela luz para manter a sincronização com o ambiente.

Como detalhado na **Figura 4**, dois ativadores transicionais *basic helix-loop-helix* (bHLH), o *circadian locomotor output cycles kaput* (CLOCK) e o *brain and muscle ARNT-like 1* (BMAL1)⁴⁶⁻⁴⁹, heterodimerizam-se e ligam-se ao promotor de elementos *E-box* para induzir a expressão de um dos braços do relógio, que inclui *cryptochromes* 1 e 2 (CRY1/2) e *periods* 1, 2 e 3 (PER1/2/3)⁵⁰⁻⁵³ e o receptor nuclear, Rev-erba e β ⁵³⁻⁵⁵. CRY e PER formam um complexo regulatório, que inibe diretamente CLOCK-BMAL1, enquanto que Rev-erba e β reprimem a transcrição de BMAL1 através do recrutamento da histona deacetilase 3 (HDAC3)^{56,57}.

Outro conjunto de receptores nucleares *RAR-orphan receptor* α e γ (ROR α e γ) são induzidos por CLOCK-BMAL1 e funcionam como ativadores circadianos de transcrição para ativar o *feedback* positivo na expressão de BMAL1 em competição com o Rev-erba e β ⁵⁸⁻⁶⁰. Além disso, a caseína quinase 1 δ e ϵ (CK1 δ/ϵ) contribui para a função do relógio através da fosforilação e desestabilização das proteínas PER⁶¹⁻⁶³ enquanto a *F-box/LRR-repeat protein 3* (FBXL3) direciona a degradação mediada por ligase da ubiquitina E3 das proteínas CRY⁶⁴⁻⁶⁶.

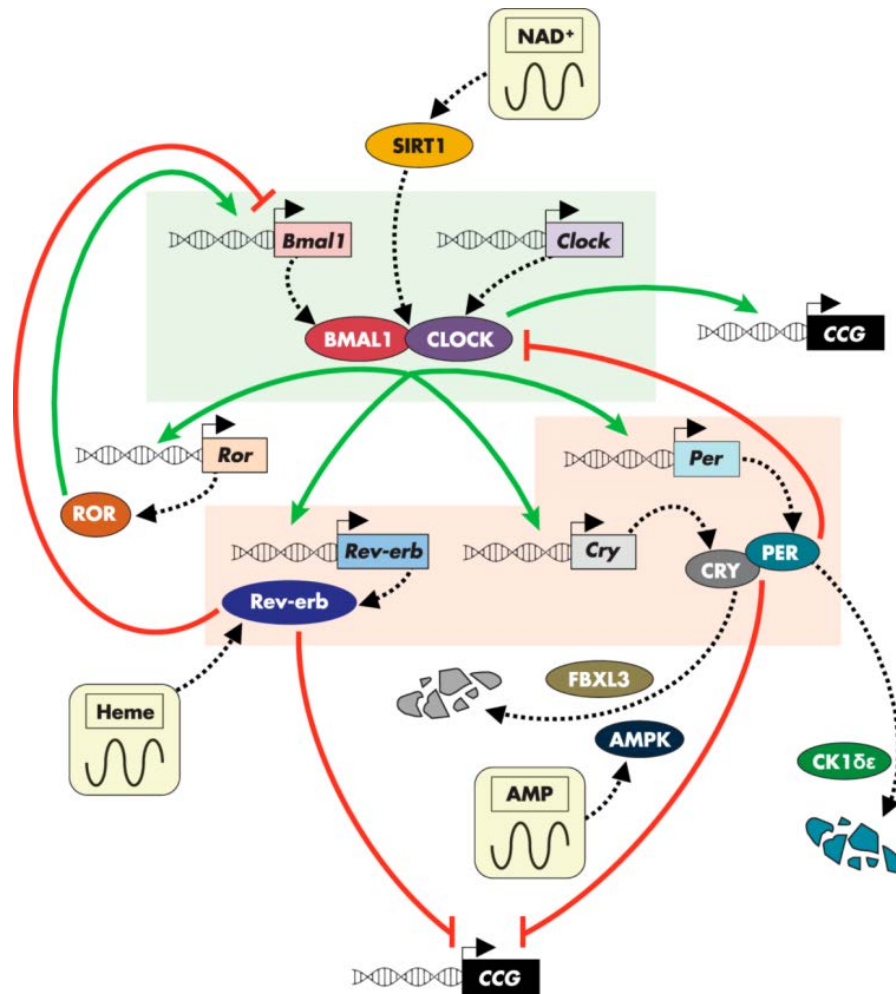


Figura 4. Interação entre o relógio celular autônomo e o metabolismo. Linhas verdes representam retroalimentação positiva e linhas vermelhas representam retroalimentação negativa. Modificada de Gerhart-Hines (2015)⁶⁷.

Na ausência de entrada luz ou escuridão, o relógio endógeno torna-se desfasado com o ambiente externo, portanto, a informação da luz corretamente cronometrada é essencial para o cronograma biológico. Em mamíferos, a retina é o único mecanismo de detecção de luz, consistindo em formação de imagem, fotorreceptores, chamados cones e bastonetes, e fotorreceptores que não formam a imagem, chamadas de células ganglionares intrinsecamente fotossensíveis (ipRGCs)⁶⁸. Em contraste com os cones e bastonetes, as ipRGCs são despolarizados em resposta à luz e são em grande parte responsáveis pela sincronização luminosa circadiana através da ativação um fotopigmento único chamado melanopsina^{68,69}.

Embora a melanopsina seja encontrada em apenas 2% das células ganglionares, seus dendritos formam uma "rede fotorreceptiva" através da retina^{70,71}. Além disso, as respostas

das células produtoras de melanopsina aumentam com a intensidade da luz com um limiar alto, e são lentas para iniciar e terminar os impulsos nervosos, qualidades que as tornam ideais para medir os níveis de luz ambiental em vez de formar imagens nítidas^{70,72,73}.

As funções que são controladas pela estimulação fótica do sistema de melanopsina incluem o reflexo de constrição pupilar, a sincronização circadiana, a regulação do sono, alguns efeitos agudos da luz sobre o desempenho cognitivo e a supressão aguda da melatonina plasmática, sendo esta última de crucial relevância para os ritmos biológicos⁶⁸.

2.4. MELATONINA, O HORMÔNIO DO ESCURO CORTISOL, O HORMÔNIO DA ATIVIDADE

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é uma molécula produzida por diversos animais e plantas^{74,75}. Quimicamente, é uma indolamina anfifílica sintetizada a partir do triptofano, que por sua característica tanto hidrofílica como lipofílica, pode atingir praticamente todos os tecidos, podendo até mesmo atravessar a barreira placentária e a barreira hematoencefálica. Como consequência, a melatonina não é armazenada, sendo imediatamente liberada dentro dos capilares sanguíneos logo após a sua formação.

A melatonina pode ser considerada a expressão química da escuridão, em função de que sua produção expressa um ritmo circadiano que é marcadamente sincronizado com o ciclo claro/escuro. O controle circadiano ocorre de tal modo que a produção de melatonina é sempre vinculada à noite, independentemente da distribuição da atividade comportamental das espécies de mamíferos caracterizados (diurnos ou noturnos)⁷⁶.

Em mamíferos, a melatonina pode ser sintetizada por diversos órgãos, incluindo a glândula pineal, a retina e o trato gastrointestinal⁷⁷⁻⁷⁹. A glândula pineal, no entanto, é a fonte principal do pico noturno de melatonina circulante, como evidenciado pela falta de níveis detectáveis no sangue após a pinealectomia. As flutuações diárias da síntese de melatonina e liberação pela glândula pineal é finamente controlada pelo marca passo central no SCN (**Figura 5**). A duração diária da melatonina noturna traduz a informação fotoperiódica em mudanças neuroendócrina que modulam a fisiologia sazonal, destacando assim o papel central da melatonina proveniente da pineal na integração das mudanças sazonais de acordo com o comprimento do dia^{77,80}.

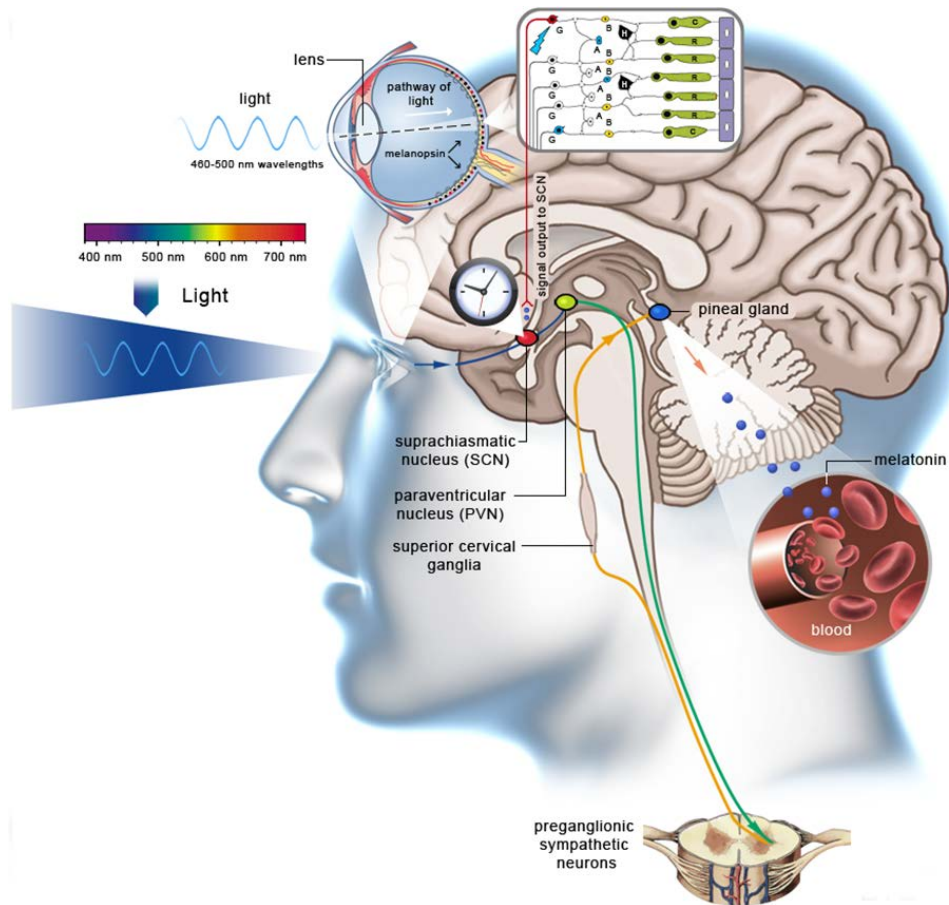


Figura 5. Mecanismo geral de regulação da melatonina. A luz (principalmente os espectros azulados, em torno de 500 nm) entra através da retina ativando as células ganglionares intrinsecamente fotossensíveis, que enviam a informação luminosa para o núcleo supraquiasmático (SCN), que por sua vez manda sinal ao núcleo paraventricular (PVN). Através de suas projeções, o PVN envia sinais para a glândula pineal, inibindo sua produção e secreção de melatonina. No caso de ausência de informação luminosa, esta via não é ativada e a produção de melatonina pela glândula pineal é ativada. Figura modificada de http://avstim.com/Circadian_Rhythms.html⁸¹.

A ritmicidade circadiana dos filhotes durante a gestação e o desmame pode ser sincronizada pela melatonina materna via placenta e leite, entre outros^{82,83}. Em adultos, a melatonina noturna pode controlar a atividade rítmica das regiões cerebrais e periféricas, incluindo striatum, parastuberalis da hipófise e baço, como demonstrado pelo desaparecimento das oscilações do gene do relógio nessas estruturas após a pinealectomia⁸⁴⁻⁸⁶. Sinais melatoninérgicos podem até mesmo retroalimentar o marca-passo mestre no SCN, onde eles afetam a expressão dos genes do relógio e a taxa de ativação deles^{32,87}.

Além da síntese e liberação de melatonina, a síntese rítmica de cortisol depende diretamente do relógio mestre, uma vez que a destruição do SCN elimina essa ritmicidade²⁸. Além disso, o cortisol segue um comportamento estritamente vinculado ao ritmo de atividade e repouso do ser vivo. Em animais diurnos, como o ser humano, o cortisol tem seu pico no início da fase clara. Por outro lado, em animais com comportamento noturno, como os roedores, o cortisol (neste caso, a corticosterona) segue um padrão de secreção semelhante ao da melatonina, tendo seu pico no início da fase escura.

O eixo hipófise-pituitária-adrenal (HPA) consiste no núcleo paraventricular (PVN), no lobo anterior da glândula pituitária e no córtex adrenal. Os neurônios do PVN sintetizam hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e arginina vasopressina (AVP), que estimula a secreção de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) da hipófise anterior e ACTH controla a liberação de glicocorticoides (GCs), como o cortisol e a corticosterona, do córtex adrenal⁸⁸. Os neurônios do PVN estão sob controle direto e indireto do SCN⁸⁹. A liberação rítmica de neurotransmissores a partir das entradas do SCN para o PVN causa oscilações circadianas na atividade do PVN e as flutuações diárias nos níveis de peptídeos do CRH⁹⁰⁻⁹². Os níveis plasmáticos de ACTH são conduzidos pela secreção de CRH, mas também permanecem sob o controle do SCN^{89,93}. Da mesma forma, a liberação de GCs é controlada pelo relógio mestre circadiano através do controle neural da liberação de CRH e ACTH e da inervação autonômica da glândula adrenal^{88,94}.

Resumidamente, o SCN projeta axônios para o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e para o tálamo (**Figura 6**). Projeções talâmicas do SCN para regiões diretamente envolvidas na regulação do humor, como o córtex pré-frontal (PFC), hipocampo (HPC) e amígdala. Projeções através do PVN para a glândula pineal regulam a secreção de melatonina, que é responsável por arrastar os relógios periféricos das células e tecidos em todo o corpo. Já as projeções através do PVN para a glândula adrenal regulam a produção de glicocorticoides. Destes exemplos, parece razoável sugerir que sinais temporariamente aberrantes no ambiente resultantes de iluminação artificial poderiam causar ritmos biológicos dessincronizados em múltiplos níveis⁹⁵.

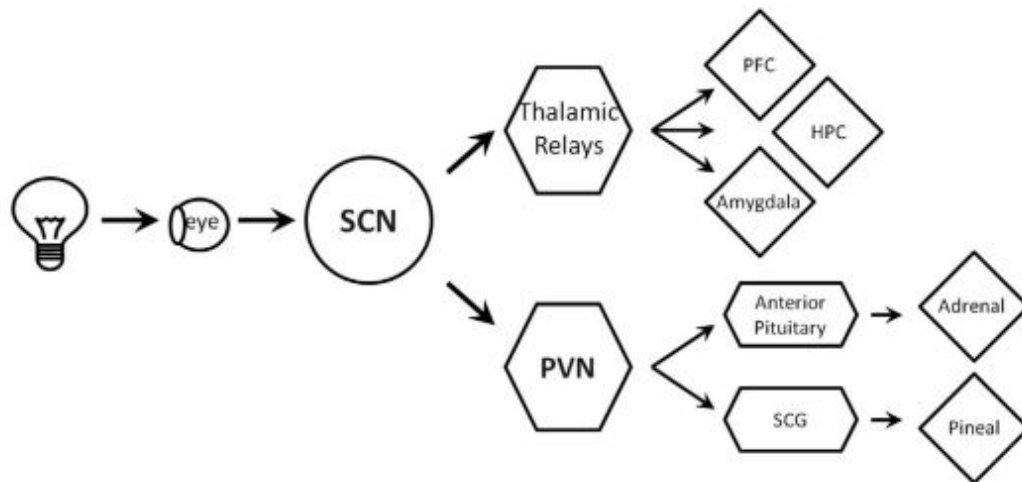


Figura 6. Potenciais vias nas quais a luz pode influenciar o comportamento. SCN, núcleo supraquiasmático; PFC, córtex pré-frontal; HPC, hipocampo; PVN, núcleo paraventricular do hipotálamo; SCG, gânglio cervical superior. Modificada de Bedrosian (2013)⁹⁵.

2.5. COMO O RELÓGIO MOLECULAR COORDENA O METABOLISMO

O sistema temporal circadiano dos mamíferos é composto por uma rede de estruturas hierarquicamente organizadas responsáveis pela geração de ritmos circadianos e sua sincronização com o ambiente. Este sistema circadiano pode ser conceituado como tendo três conjuntos de componentes: as entradas (*inputs*), os osciladores de 24h e as saídas (*outputs*) (**Figura 7**).

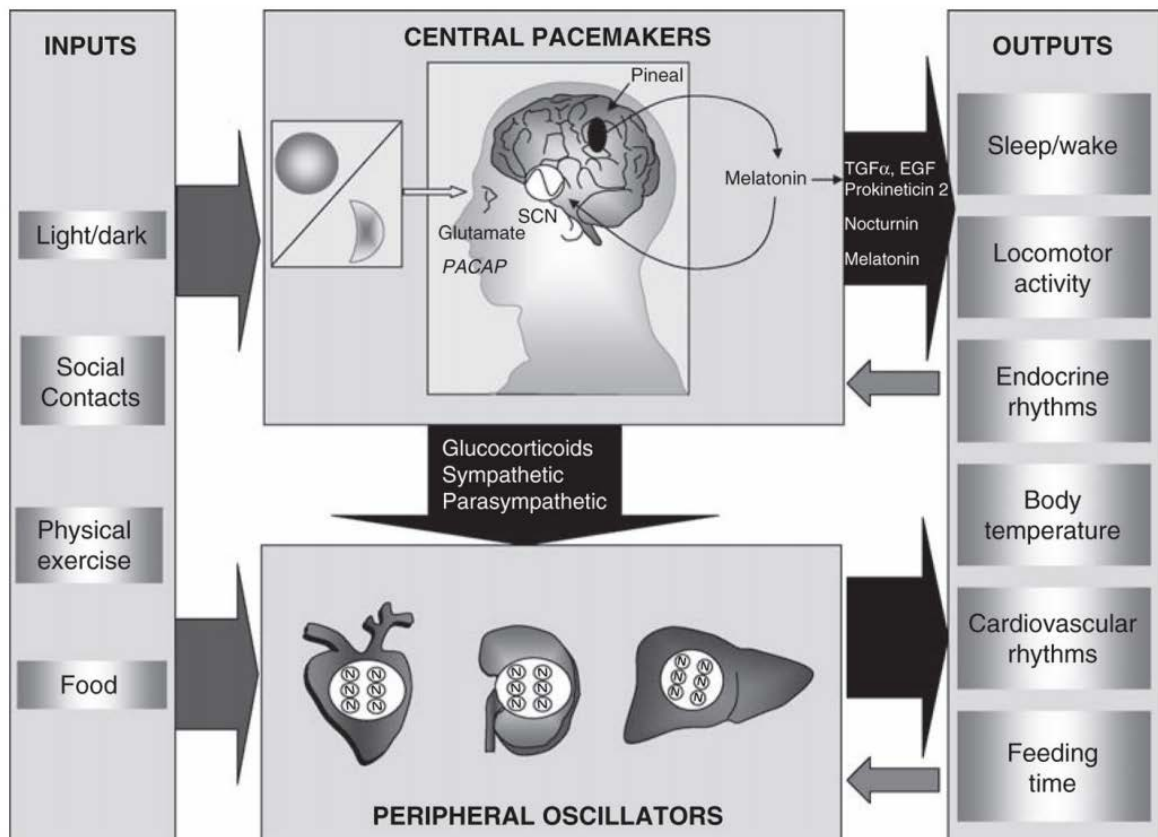


Figura 7. Uma visão geral da organização funcional do sistema circadiano em mamíferos. Modificada de Garaulet (2010)⁹⁶.

Embora a entrada fótica seja o principal sinal para sincronizar o SCN e os sincronizadores periféricos, outras pistas tais como momento de alimentação, contato social, atividade física regular, também podem sincronizar o sistema circadiano dos mamíferos. Por exemplo, quando a disponibilidade de alimentos é limitada a curtos períodos de tempo (alimentação restrita), muitos ritmos circadianos podem mudar de fase para adaptar a fisiologia do organismo ao tempo dos alimentos programados (atividade antecipatória dos alimentos). Já sob o acesso irrestrito aos alimentos, esses ritmos circadianos retornam à fase original em modelos animais, pois a luz se torna o sinal de sincronização dominante⁹⁷.

No entanto, com os avanços evolutivos conquistados pelo ser humano, como acesso abundante ao alimento e disponibilidade de alocação das atividades em diversos momentos do dia ou da noite, em função a utilização da luz artificial, a possibilidade de aumento dos distúrbios dos ritmos biológicos em função dos fatores exógenos aumentou significativamente (**Figura 8**).

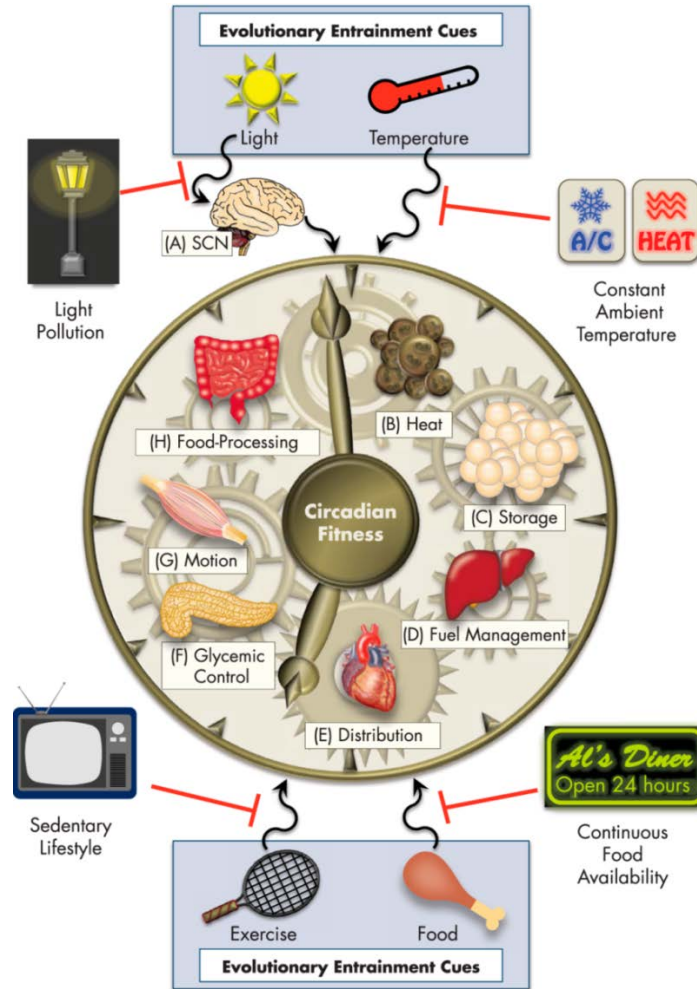


Figura 8. Impacto do ambiente moderno nas funções circadianas evolutivamente programadas. Luz do sol, a temperatura, a atividade física e a ingestão de alimentos servem como pistas básicas de arrastar, ou *zeitgebers*, que coordenam processos circadianos tecido-específicos para definir cumulativamente a fisiologia do organismo inteiro. Entre estes *zeitgebers*, a luz é a principal sinalização de sincronização e atua para redefinir o relógio mestre (A) no SCN a cada dia, que então transmite sinalização para os tecidos periféricos. Descrevem-se os processos evolutivamente circadianos específicos, incluindo (B) produção de calor pelo tecido adiposo marrom, (C) armazenamento de energia pelo tecido adiposo branco, (D) gestão de fonte de energia entre substratos de carboidrato e lipídeo no fígado (E) distribuição ou circulação de fatores sanguíneos, hormônios e metabólitos pelo coração, (F) controle dos níveis de glicose no sangue pelo pâncreas, (G) capacidade de movimento e atividade pelo músculo esquelético e (H) alimentação, processamento e extração de nutrientes pela microbiota intestinal. Uma combinação de poluição luminosa proveniente de fontes de luz artificiais, estilos de vida sedentários em grande parte sem atividade física, acesso contínuo a alimentos de alto teor calórico e condições de vida mantidas a temperatura ambiente constante contribuíram para a interrupção da aptidão circadiana. Modificada de Gerhart-Hines⁶⁷.

Diferentes aspectos do metabolismo lipídico são controlados pelo relógio circadiano, incluindo lipólise, lipogênese e termogênese. Por exemplo, as taxas de lipólise basais são elevadas durante a fase de repouso do animal⁹⁸. Isso faz sentido se considerarmos que esses processos devem ser regulados oportunamente devido às mudanças diurnas nas demandas de energia sistêmica.

Em camundongos, a lipólise é controlada por CLOCK-BMAL1 mediando a expressão da lipase de triglicerídeo de tecido adiposo e a lipase sensível a hormônio, codificando para duas enzimas limitantes da lipólise⁹⁹. Constantemente, as concentrações de triglicerídeos no plasma, ácidos graxos livres e colesterol exibem oscilações diurnas que persistem mesmo durante o jejum¹⁰⁰⁻¹⁰². Além disso, a expressão de algumas enzimas que regulam a captação e ativação de ácidos graxos mostra a oscilação circadiana no tecido adiposo com um máximo na fase inicial do período de escuro. Isto está em linha com o aumento da lipogênese durante a fase ativa⁹⁸.

Por outro lado, Rev-erb participa na regulação de diversos processos metabólicos incluindo a diferenciação dos adipócitos, a gliconeogênese, síntese de ácidos biliares e a homeostase do colesterol¹⁰³. Além disso, Rev-erb pode modular a expressão de seu próprio ligante, implicado no metabolismo celular. Foi também demonstrado que a expressão diária de Rev-erb controla a transcrição circadiana de vários genes do metabolismo lipídico recrutando o modificador da cromatina da HDAC3 no fígado. Tomados em conjunto, estes dados sugerem que Rev-erb pode ligar firmemente o sistema circadiano ao metabolismo energético numa base diária¹⁰⁴. Deste modo, podemos perceber que por diversas rotas, tanto por vias bioquímicas como genéticas, o metabolismo segue uma ritmicidade circadiana para gerenciar o controle do ganho e gasto energético.

Tendo em vista a importância da iluminação na organização temporal dos eventos fisiológicos, e as crescentes alterações nos padrões de iluminação utilizados pela sociedade moderna, nosso trabalho tem interesse de avaliar a influência de dois aspectos da iluminação artificial: o tempo de iluminação (fotoperíodo) e do espectro de cor; tanto nos ritmos de atividade e repouso, secreção de corticosterona e melatonina, além de fatores metabólicos, como ganho de peso e gordura visceral.

3. JUSTIFICATIVA

O estudo derivado desta dissertação justifica-se com base nos seguintes pontos:

- Necessidade de compreensão de como a luz artificial afeta os ritmos de atividade e repouso, bem como fatores metabólicos.
- Não se tem conhecimento suficiente acerca dos efeitos fisiológicos da iluminação à LED, que vem sendo amplamente difundida no meio urbano por seu baixo custo e alta durabilidade.
- Preocupação em relação à influência da iluminação no em processo saúde-doença, em função do aumento prevalência de distúrbios mentais e metabólicos, chegando ao ponto de estarem nos primeiros lugares entre as causas de morbidade e incapacitação^{105,106}.
- Deve-se investigar a influência da iluminação, tanto no que se refere à fotoperíodo quanto à qualidade de iluminação artificial nos modelos experimentais mais amplamente utilizados pela comunidade científica, já que este pode ser um fator confundidor de alterações fisiológicas e comportamentais que muitas vezes não é levado em consideração.
- Os moldes de organização da sociedade contemporânea (com crescente aumento de exposição à luz artificial durante o dia e cada vez menor exposição ao escuro durante a noite) deveriam ser repensados, de forma a respeitar a fisiologia.

Pelas razões apresentadas, justifica-se a realização do presente estudo com o propósito de avaliar a influência da luz artificial nos ritmos de atividade e repouso, temperatura central, secreção de melatonina e corticosterona sérica, e alterações no ganho de tecido adiposo em ratos da linhagem.

4. HIPÓTESE

O atual padrão de iluminação artificial utilizado em ambientes internos não é compatível com a necessidade fisiológica do organismo humano, que evolutivamente se adaptou a um padrão de claro/escuro em função da movimentação da Terra ao redor do Sol. Tanto o fotoperíodo quanto o espectro de cor constante podem ser fatores que contribuem para perturbações dos ritmos biológicos e do metabolismo.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVOS GERAIS

- Avaliar a influência do fotoperíodo e do espectro de cor da iluminação artificial nos ritmos biológicos e metabolismo por meio de dois experimentos em ratos Wistar.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS - EXPERIMENTO 1

- Avaliar a influência do fotoperíodo curto e longo nos seguintes parâmetros:
 - Ritmo de atividade e repouso;
 - Ritmo de temperatura central;
 - Concentração de melatonina e corticosterona sérica.

5.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS - EXPERIMENTO 2

- Avaliar a influência da iluminação artificial sem variações ao longo do dia em comparação a um regime de iluminação artificial dinâmica (com variações de espectro de cor) nos seguintes parâmetros:

- Ritmo de atividade e repouso;
- Ritmo de temperatura central;
- Concentração de melatonina e corticosterona sérica;
- Peso corporal e gordura visceral.

6. ARTIGO 1

BIOLOGICAL ADAPTABILITY UNDER SEASONAL VARIATION OF LIGHT/DARK CYCLES

Artigo publicado na revista *Chronobiology International* (fator de impacto: 3,54).

Caroline L. Quile^a, Melissa A. B. de Oliveira^a, André C. Tonon^a, Maria Paz L. Hidalgo^{a,b}

^aLaboratório de Cronobiologia e Sono, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil. ^bPostgraduate Program in Psychiatry and Behavioral Sciences, Medical School, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

Abstract

A substantial amount of experimental models designed to understand rhythms entrainment and the effects of different regimens of light exposure on health have been proposed. However, many of them do not relate to what occurs in real life. Our objective was to evaluate the influence of “seasonal-like” variation in light/dark cycles on biological rhythms. Twenty adult male Wistar rats were assigned to three groups: control (CT), kept in 12:12 light/dark (LD) cycle; long photoperiod/short photoperiod (LP/SP), kept in 16.5:7.5 LD cycle for 18 days (phase A), then 17 days of gradual reductions in light time (phase B), then 18 days of shorter exposure (7.5:16.5 LD cycle, phase C); short photoperiod/long photoperiod (SP/LP) group, with same modifications as the LP/SP group, but in reverse order, starting phase A in 7.5:16.5 LD cycle. Activity and temperature were recorded constantly, and melatonin and cortisol concentrations were measured twice. Activity and temperature acrophases of all groups changed according to light. The correlation between activity and temperature was, overall, significantly lower for SP/LP group compared with LP/SP and CT groups. Regarding melatonin concentration, LP/SP group showed significant positive correlation between phase A and C ($p = 0.018$). Animals changed temperature and activity according to photoperiod and demonstrated better adaptability in transitioning from long to short photoperiod. Since this model imitates seasonal variation in light in a species that is largely used in behavioral experiments, it reveals promising methods to improve the reliability of experimental models and of further environmental health research.

KEYWORDS: chronobiology, biological rhythms, light pollution, light, melatonin

Introduction

Before the advent of electricity, humans were guided by the natural cycles of light and darkness. Most species use day-night transitions as a cue to synchronize their rhythms and to establish their routines. However, until the last few centuries, humans became independent of this pattern (Lall et al., 2012). With the advent of electrical light, humans are now able to determine when day begins and when it ends and increase the time of exposure to artificial light (Bedrosian et al., 2013). This ability enables an increase in social activities and work time. In the urban surroundings, seasonless and timeless offices and shopping areas are being developed (Morita & Tokura, 1998). Currently, most people spend the majority of their time indoors and are barely exposed to natural light.

Indoor environments present different qualities of light compared with outside areas (Harb et al., 2015) and modern lifestyles are something new in the course of human evolution (Morita & Tokura, 1998). As this is a recent phenomenon, its effects are only starting to be noticed. Recent studies have shown that the lack of exposure to natural light may be associated with biological rhythm disruption (Harb et al., 2015). Furthermore, new approaches using artificial light are being considered to improve people's quality of life, including the use of circadian light and Light Emitting Diodes (Lowden et al., 2012).

Some experimental models of changes in photoperiod have been proposed with the objective of evaluating biological and behavioral disorders (e.g., depression-like behavior, seasonal affective disorder, bipolar disorder) that are related to seasonal changes in daylight (Becker et al., 2010; Blask et al., 2011; Otsuka et al., 2014; Workman et al., 2011). Literature shows that photoperiod changes resembling seasonality can invert melatonin phase and attenuate corticosterone levels in adolescent rats (Xu et al. 2016). However, many models use extreme photoperiod variation (e.g. cycles of 22 hours of light and 2 hours of darkness, or 5 hours of light and 19 hours of darkness) and abrupt photoperiod changes (e.g. exposure to 22 hours of light for a period and sudden change to an exposure of 5 hours of light), unlike the environmental conditions that occur throughout the year (Ashkenazy et al., 2009; Becker et al., 2010; Krivisky et al., 2012; Workman et al., 2011). Additionally, some of these protocols employ genetically modified animals or isogenic strains, hampering an external validity (Becker et al., 2010; Otsuka et al., 2014).

Our aim was to test animal biological adaptability of activity and temperature rhythms to a light/dark (LD) cycle model that resembles more closely what happens in real life in a species that is broadly used in animal experiments.

Materials and Methods

All of the procedures were conducted in accordance with institutional policies on experimental animal handling, and the project was approved by the Institutional Research Ethics Committee (project number 13-0175 - GPPG/HCPA). Experimental protocol was performed accordingly to international ethical standards (Portaluppi et al., 2010). Animals used in this study were treated humanely and with regard for the alleviation of suffering.

Animals

Twenty adult (60 days, weighing 250-300g) male Wistar rats obtained from Universidade Federal de Pelotas were acclimatized to our animal facility (Unidade de Experimentação Animal - HCPA, UEA - HCPA) for 1 week under controlled environmental conditions ($22 \pm 1^\circ\text{C}$, 12:12 LD cycle, free access to chow [Nuvilab CR1] and water). Animals were relocated to individual acrylic cages (20 x 25 x 25 cm) for actigraphy and kept under inverted 12:12 LD cycles with the lights on at 7 pm for at least 1 week before surgery (iButtons implantation), so that our team could collect samples during their daytime.

We intended to minimize the number of animals in each experiment. Sample size was predicted according to previous studies (Cambras et al., 2007). Initially, we used groups with 50% of desirable sample size. Analysis of results using this sample could indicate significant statistical differences and predict real advantages in increasing the number of animals per group. In addition, our research team made sure to deliver the least discomfort possible to the animals in all parts of the study.

Intervention

After the first adaptation period, animals were randomly assigned to one of the following groups: Control (CT, n = 6), Long Photoperiod/ Short Photoperiod (LP/SP, n = 7), and Short Photoperiod/ Long Photoperiod (SP/LP, n = 7).

LP/SP and SP/LP animals passed through variations in LD cycles that were intended to mimic seasonal annual changes in the photoperiod observed in North America and Europe based on the winter-summer transition (© Time and Date). This simulation was performed with a photoperiod station, characterized by separate independent chambers containing four digital electronic timers (model TT34, COEL). This device allows an equal temperature condition ($\sim 22^\circ\text{C}$), humidity and noise exposure, with different photoperiods programmed in the same room.

The CT group was kept in a 12:12 LD cycle throughout the experiment. Group LP/SP was exposed for 18 days to a longer photoperiod (16.5:7.5 LD, phase A) followed by 17 days of gradual reduction (30 minutes a day in the beginning of the light cycle, phase B) so that on the 17th day the cycle was completely modified to a shorter exposure time (7.5:16.5 LD cycle), which was maintained for 18 days (phase C). Simultaneously, the SP/LP group passed through phase A with a shorter exposure to light (7.5:16.5 LD cycle) and then made the transition to phase B increasing light exposure by 30 minutes a day; finally, the rats were maintained in the complete modification of the LD cycle (16.5:7.5 LD cycle) for 18 days, characterizing phase C (**Fig. 1**). Time was expressed using Zeitgeber Time (ZT), i.e. number of hours after turning lights off.

Rhythm Characterization

The rhythm characterization was performed following the protocol developed by Quiles et al. (2014).

Activity

Activity was recorded every 10 min throughout the experiment in home cages equipped with actigraphs (Actigraph, ADNplin- ©Antoni DíezNoguera, Barcelona, CA, Spain) linked to a clear acrylic box (Panlab Harvard Apparatus) measuring 25 x 15 x 25 cm. The activity box contains 2 infrared rays and 2 receptors, one on each side of the box, that transmit codified information that is read by a computer through the DAS192USB program.

Temperature

Temperature was recorded using ThermoChroniButtons (Dallas, TX) implanted into the abdominal cavity. Rats were anesthetized with isoflurane (5% induction and 2-3% maintaining). A longitudinal incision (~2 cm) in the abdomen was made along the midline, and a disinfected iButton was inserted into the abdominal cavity. Animals were kept warm until recovery from anesthesia and returned to their individual home cages. Tramadol (5 mg/kg i.p., Tramal®, Hipolabor, MG, Brazil) was administered immediately and every 12 hours for 3 days after surgery. iButtons recorded data every 45 min and were removed at the end of the experiment after euthanasia by transcardiac perfusion.

Melatonin and Corticosterone Analysis

For melatonin and corticosterone analysis, a sample of serum was collected on ZT 2 of all animals. After the last day of phase A and phase C, retro-orbital venipuncture was performed in each group in the second hour after the lights were turned off. Animals were anesthetized with isoflurane (5% for induction and 2-3% for maintenance), and Tramadol (5 mg/kg i.p) was used for analgesia, which was administered immediately and every 12 hours for one day after collection.

Serum analysis was performed using MILLIPLEX MAP Rat Stress Hormone Magnetic Bead Panel (Lot number:2393011) (Merck Millipore, Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA) following the manufacturer's instructions. The results of melatonin and corticosterone concentrations are expressed in pg/mL.

Analysis of the Chronobiological Parameters

To study the different adaptation of activity and temperature to the changes in the photoperiod, we created actograms using the derived series from each group. To calculate the rhythmic profile of the activity and temperature for the entrained rhythm (phases A and C), we used an analysis of correlation. To understand the animal adaptation to changes in photoperiod, we analyzed the intracycle variability and the interdaily stability of activity, and we made positive and negative flank analyses of activity. For activity and temperature correlation analysis, as well as activity variability parameters, we divided all three phases (A, B, and C) in subphases “a”, meaning the first 9 days, and subphases “b”, meaning the last 8 days. The last day of both subphases Ab and Cb were excluded because activity data was missing due to blood collection. All of the analyses of chronobiological parameters were performed using EL Temps software (©Antoni DíezNoguera, Barcelona, CA, Spain).

Statistical Analysis

The results are expressed by group means \pm SEM, and differences between phase A and C were calculated using Student's t-test to study the rhythm once entrained. Comparison among groups (CT, SP/LP and LP/SP) was performed by ANOVA with a Tukey post hoc test. Values of $p \leq 0.05$ were considered statistically significant. Statistical analysis was performed using SPSS for Windows (version 17; SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Results

As shown in **Fig. 2**, the activity (**Fig. 2A**) and temperature (**Fig. 2B**) rhythms maintained the same pattern throughout the study on control group, but shifted according to light modifications in groups LP/SP and SP/LP.

The activity and temperature acrophases of experimental groups (LP/SP and SP/LP) changed according to light, being pushed to the beginning of dark period when animals underwent long photoperiods. When animals passed through a short photoperiod, acrophases remained in the middle of the dark period, as control group. As expected, the control group was not different from phase A to C, which had similar acrophase at Zeitgeber Time (ZT) 6. The LP/SP group showed acrophase at ZT 3 in phase A and acrophase at ZT 8 in phase C. The opposite occurred in the SP/LP group, which showed the acrophase at ZT 8 in phase A and acrophase around ZT 3 at phase C.

Positive and negative flank analyses of activity show adaptation process throughout the study. **Figure 3** shows the average of hours among groups of the beginning of the activity period (positive flanks) and of the end of it (negative flanks) in each day. After photoperiod change (phase B), SP/LP group activity onsets (positive flanks) enter light phase day after day in an asymmetric pattern, and reach reaching stability only after day 47. LP/SP group maintain activity onsets (positive flanks) closer to the transition of light-dark phase symmetrically throughout the study.

The analysis of activity intracycle variability shows higher values for SP/LP group compared to LP/SP group at subphases Aa and Ba (Aa: $F_{(2,18)} = 6.458$; $p < 0.05$. Ba: $F_{(2,18)} = 5.203$; $p < 0.05$). At subphases Ab and Bb, the SP/LP group presented higher values compared to LP/SP and CT groups (Ab: $F_{(2,18)} = 9.534$; $p \leq 0.05$. Bb: $F_{(2,18)} = 4.913$; $p \leq 0.05$). We did not find any difference among groups at Ca and Cbsubphases(**Fig. 4A**).

In activity interdaily stability analysis, the SP/LP group showed lower values compared to LP/SP and CT groups at Aa ($F_{(2,18)} = 39.476$; $p \leq 0.05$.), Ab ($F_{(2,18)} = 21.877$; $p \leq 0.05$.), Ba ($F_{(2,18)} = 34.423$; $p \leq 0.05$.) and Bb ($F_{(2,18)} = 31.693$; $p \leq 0.05$.). At Ca subphase, all groups presented significant differences ($F_{(2,18)} = 22.698$; $p < 0.05$.) (**Fig. 4B**).

Activity and temperature correlation (**Fig. 5**) shows that SP/LP group presented significant lower values at Aa subphase compared to LP/SP group ($F_{(2,18)} = 6.969$; $p < 0.05$). At Ab subphase, LP/SP group presented higher values compared to SP/LP and CT groups ($F_{(2,18)} = 11.641$; $p < 0.05$). Finally, at Ba, Bb and Ca subphases, SP/LP group presented

lower values compared to LP/SP and CT groups (Ba: $F_{(2,18)} = 21.072$; $p < 0.05$, Bb: $F_{(2,18)} = 33.714$; $p < 0.05$, Ca: $F_{(2,18)} = 20.181$; $p < 0.05$).

The corticosterone concentration showed a significant difference between the LP/SP and SP/LP groups in phase C ($p < 0.05$; ANOVA/Tukey). Additionally, a t-test for paired samples compared phase C to phase A in the same group, and it revealed a significant decrease in the corticosterone concentration in the SP/LP group ($p < 0.05$) (**Fig. 6**). Regarding melatonin concentration, LP/SP group showed a significant positive correlation between phase A and C ($r^2 = 0.707$; $p = 0.018$), but no other significant difference was found. The values of melatonin concentrations are shown in **Table 1**.

Discussion

To understand the effects of photoperiod modifications, we evaluated the entrainment of activity and temperature rhythms on the light/dark cycles. Activity and temperature were modified according to the length of light and darkness.

Biological rhythms are under the control of a complex temporal system in which the main structure is the suprachiasmatic nucleus (SCN) of the hypothalamus (Reiter, 1991). The SCN receives light information via the retinohypothalamic tract (RHT) and synchronizes physiology to the 24-hour light/dark cycle. This temporal system adapts the body to the length-of-day and length-of-night information (Moore, 1983). The SNC also regulates the daily secretion of melatonin by the pineal gland. Through the interaction with proteasome, melatonin adjusts the SCN clock to changes in the environmental photoperiod (Nagy et al., 2015).

Exposure to darkness for a long period of time should provoke a large secretion of melatonin (Meliska et al., 2013). However, in this study, we did not find different levels of melatonin among groups. Unfortunately, we did not measure melatonin every 24 hours, so we were not able to assess its rhythmicity. Nevertheless, we observed a positive correlation of the melatonin levels between phase A and C only in the transition from LP to SP.

Therefore, we can suggest that long-to-short adjustment in photoperiod was different from the short-to-long adjustment in photoperiod, and melatonin correlated better in the former adjustment. It seems that the transition from a short photoperiod to a long photoperiod requires more time for the body to adapt. To support this conclusion, we highlight the

relevance of the results of positive and negative flank analyses of activity, intracycle variability, interdaily stability and correlation between activity and temperature.

On positive and negative flank analyses of activity, SP/LP group shows a marked asymmetric distribution pattern after photoperiod transition, reaching stability only on the second half of phase C, while LP/SP group maintain a more symmetric distribution. LP/SP group presented the highest activity and temperature correlation values throughout the study. Even though both LP/SP and SP/LP groups had a decrease in correlation in the transition period (phase B), it was more pronounced in the SP/LP group. After transition (phase C), there was an increase in correlation in SP/LP group, and a decrease in LP/SP. This suggests that in case we followed up these animals for longer, the correlations could invert.

In this study, levels of corticosterone, a hormone related to stress, were significantly lower in the short-to-long transition. Short photoperiods of both LP/SP and SP/LP groups also present an increase in values of intracycle variability, and a decrease in values of interdaily stability, and lower activity and temperature correlation. Studies have demonstrated alterations provoked by exposure to a short light-dark cycle. For example, atrophy of the pyramidal neurons in the medial prefrontal cortex (mPFC), which is associated with a reduction in cognitive flexibility and altered behavior in novel environments (Karatsoreos et al., 2011). Additionally, disruption of the circadian clock by light leads to weight gain, high levels of leptin and triglycerides and an increased of glucose ratio, suggesting a prediabetic state (Karatsoreos et al., 2011). Also, studies have demonstrated that the serotonergic responds similarly to short period exposure in diurnal (chipmunks) and nocturnal (C57BL/6J mice) animals. In both models, the serotonin levels were decreased in the short photoperiod (Goda et al., 2015).

In humans, seasonal affective disorder (SAD) is associated with a shortened photoperiod in the winter (Rosenthal et al., 1984). In terms of light, we can affirm that LP mimics the summer season and SP mimics the winter. The polar region presents challenges for all life in a photic environment based on the season. High latitudes demand human body's circadian adaptation. These processes affect mood, sleep timing, and metabolic function (melatonin, cortisol, and electrolytes) (Karatsoreos, 2014). Furthermore, there is evidence that light therapy modifies the serotonin receptor 5-HTT BPND depending on the season. Light therapy decreases 5-HTT BPND in the winter, but not in the fall. The management of photoperiods may be an important therapeutic tool, since we know that light modulates the function of core clock components, and consequently modifies the monoaminergic system (Harrison et al., 2015).

Modern lifestyles shorten the dark phase (with the use of artificial light) and the exposure to natural light, resulting in a decrease in the strength of our main *zeitgeber*. In this study, temperature and activity acrophases were different from control when animals were exposed to a longer photoperiod. These results reinforce that a lack of darkness and of sun light significantly impact the circadian system.

The model proposed in this study differs from previously used models because we observed the influence of the light/dark cycle in a model with gradual length photoperiod changes, which is similar to the cycle of temperate regions and resembles real life closely. Since Wistar rats are largely used in experimental research, our findings create an opportunity for testing hypothesis regarding the influence of natural and artificial light on animal models with better reliability.

Chronobiological parameters are indispensable when studying cognitive, behavioral or emotional functions, symptoms and disorders. In addition, Psychiatry research on biological rhythms has significantly expanded its importance in evidence-based practice in recent decades (NIH, 2015). In this perspective, our study could have future implications in clinical scenarios, as it reveals promising materials and methods to improve the reliability of experimental models and of further psychiatric research.

Acknowledgements

The authors acknowledge the Animal Experimentation Unit team (UEA) of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre - HCPA, for technical and logistical support. The study was supported by the Incentive Fund to Research and Events (FIPE – HCPA) and the National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq - UFRGS).

The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

FIGURES

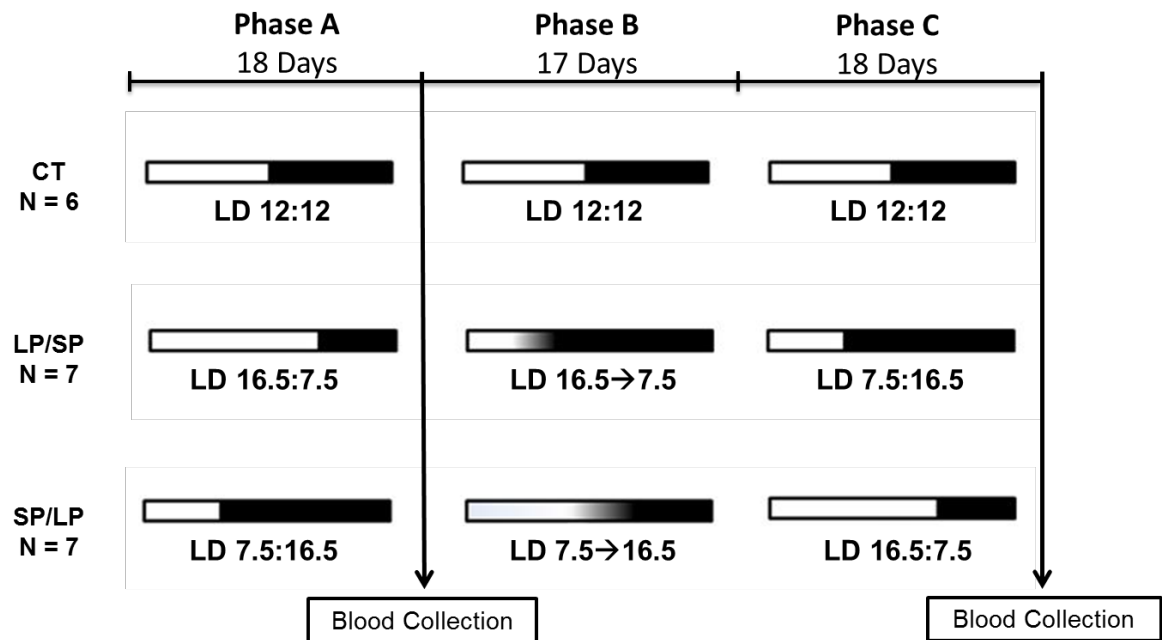
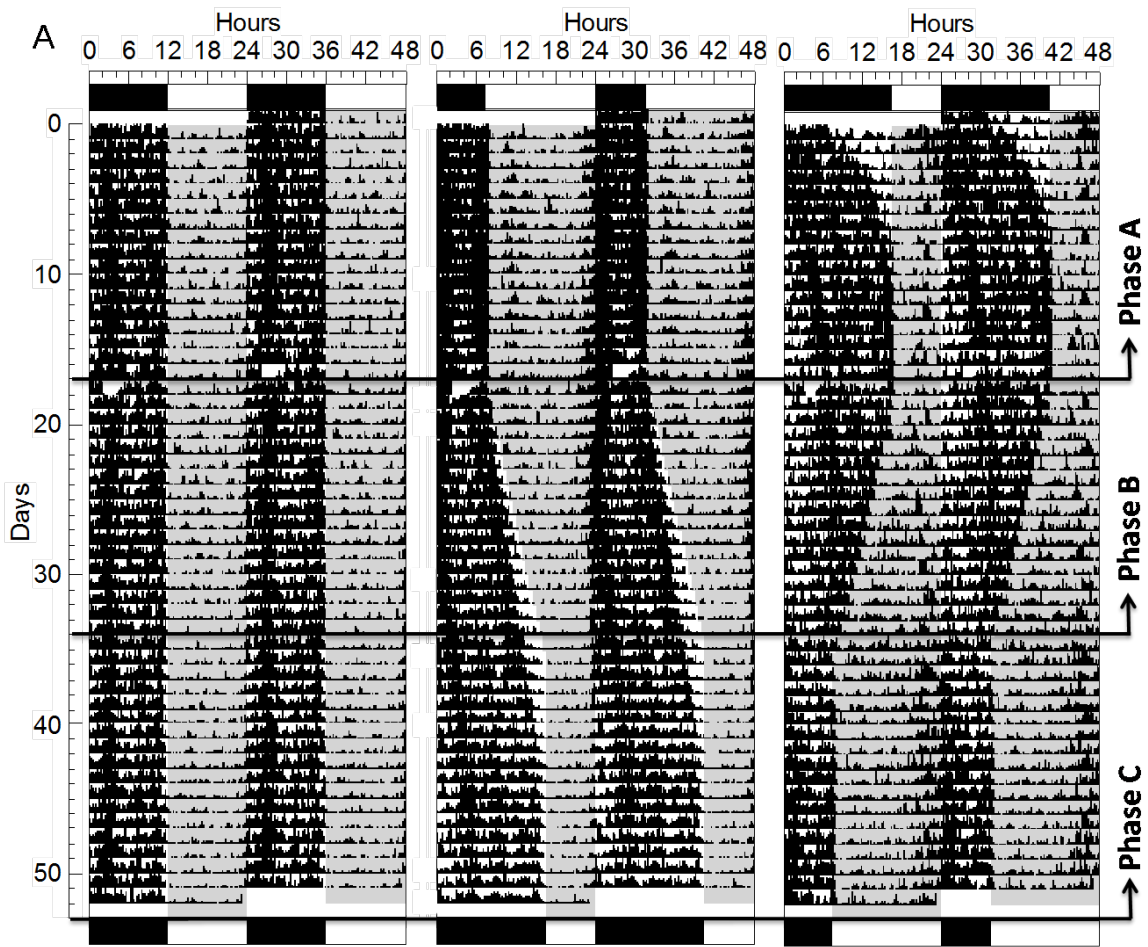


Figure 1. Flowchart of study design. CT: Control; LP/SP: Long Photoperiod/Short Photoperiod; SP/LP: Short Photoperiod/Long Photoperiod.



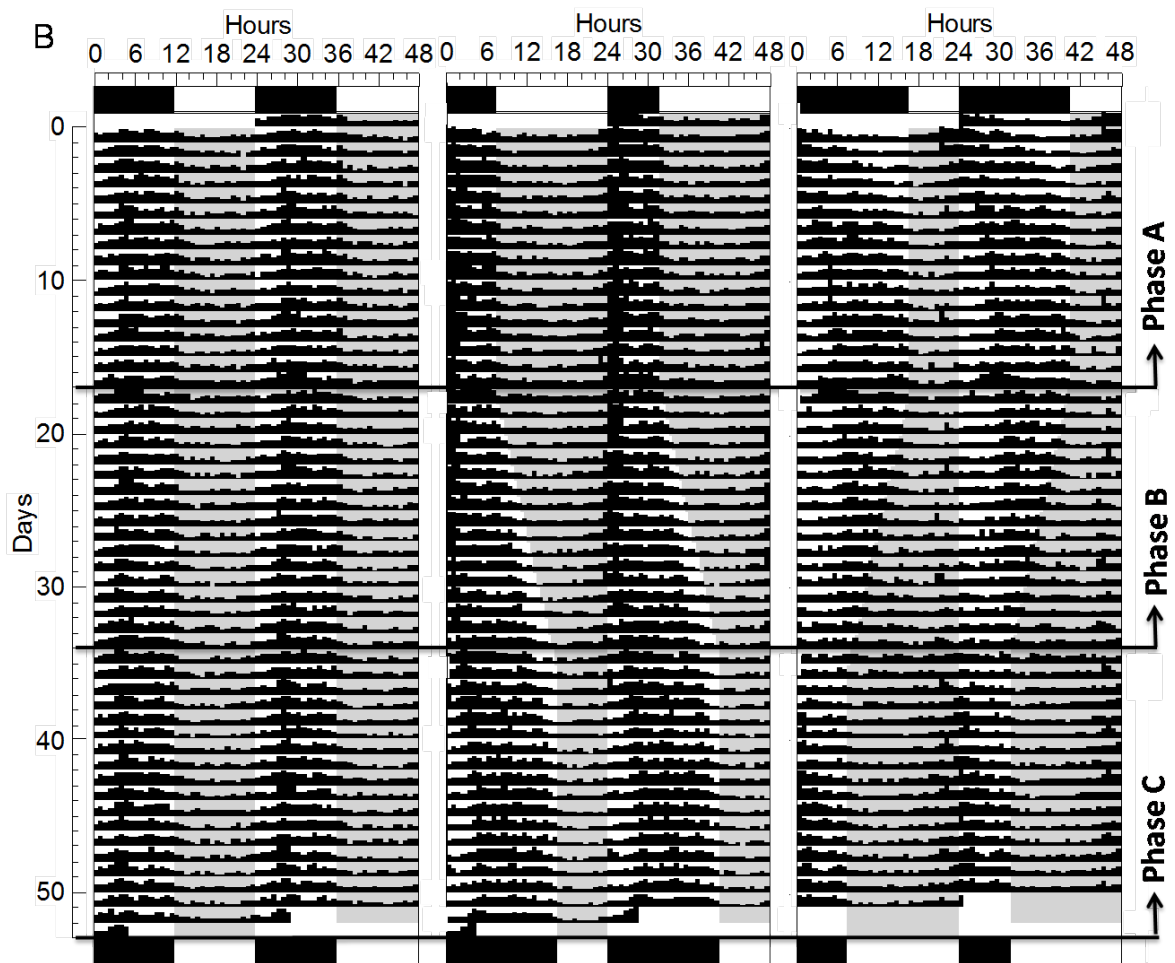


Figure 2. Changes in activity (A) and temperature (B) according to the photoperiod. Representative double-plot actograms from derived series of each group illustrating daily changes in rest/activity (A) and the core body temperature (B) during the entire experiment. Lights-on periods are presented in grey. The pattern shows the adaptation of activity and temperature rhythms to the photoperiods in all of the groups. CT: Control; LP/SP: Long Photoperiod/ Short Photoperiod; SP/LP: Short Photoperiod/ Long Photoperiod.

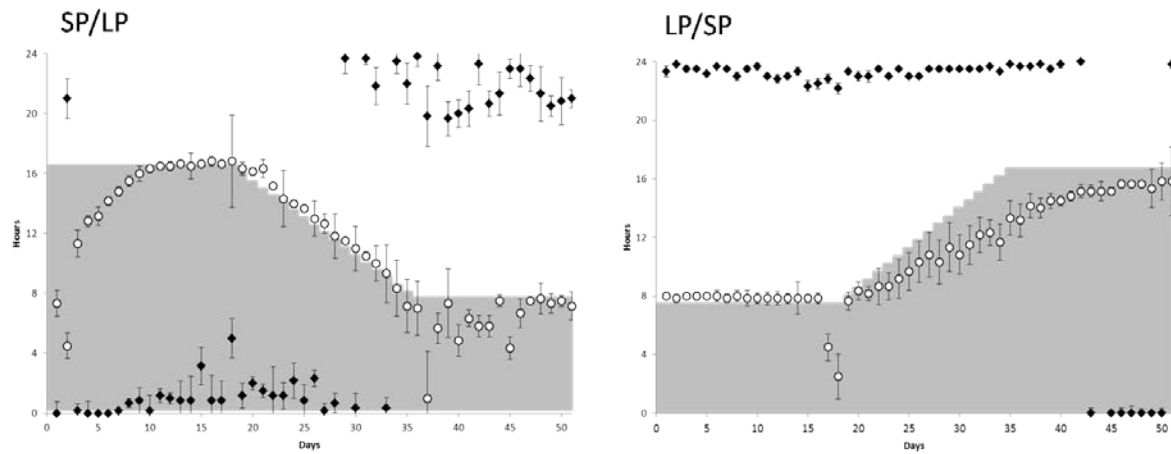


Figure 3. Daily positive and Negative Flanks of Activity throughout the study. Positive flanks are plotted in black lozenges and negative flanks are plotted in white circles. Regions with gray background represent the dark periods and white background represents the light periods. LP/SP: Long Photoperiod/ Short Photoperiod; SP/LP: Short Photoperiod/ Long Photoperiod.

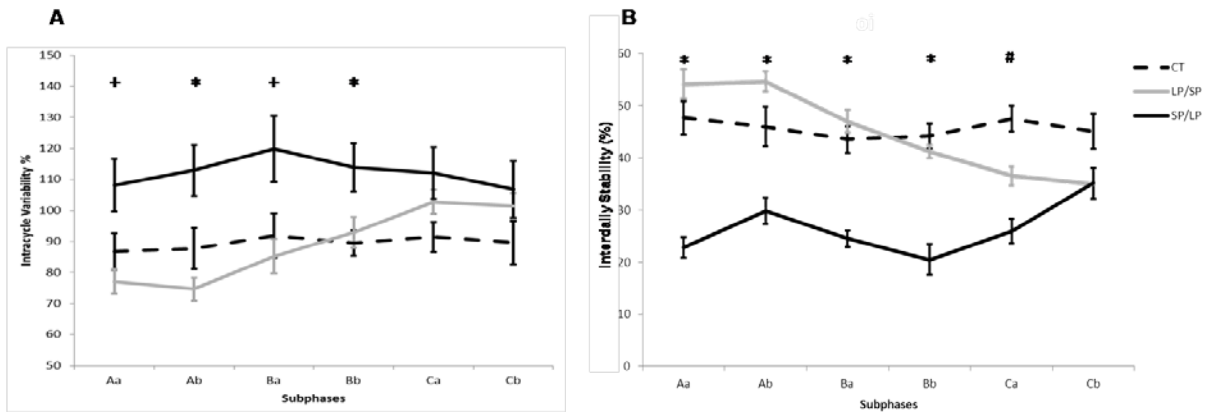


Figure 4. Intracycle variability (A) and interdaily stability (B) measurements of locomotor activity for phases A, B and C divided into subphases. Mean \pm SEM * $p \leq 0.05$, ANOVA/Tukey of SP/LP group compared to LP/SP and CT groups at same phase. # $p < 0.05$, ANOVA/Tukey of all groups compared at same phase. + $p < 0.05$, ANOVA/Tukey of SP/LP group compared to LP/SP group at same phase. CT: Control; LP/SP: Long Photoperiod/ Short Photoperiod; SP/LP: Short Photoperiod/ Long Photoperiod.

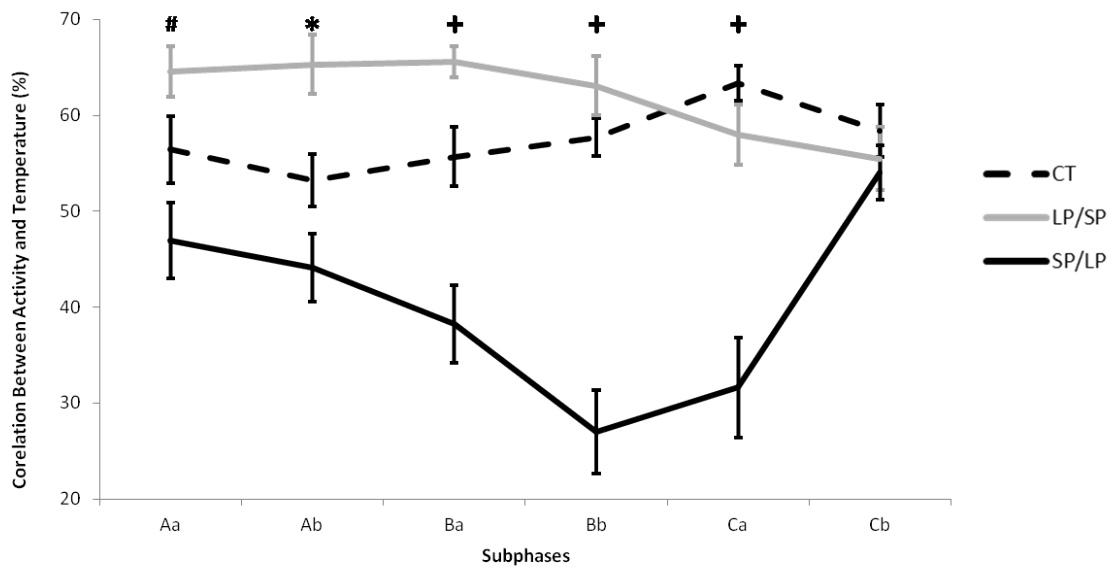


Figure 5. Correlation between activity and temperature of all groups for phases A, B and C divided into subphases. Mean \pm SEM # $p < 0.05$, ANOVA/Tukey of SP/LP group compared to LP/SP group at same phase. # $p < 0.05$, ANOVA/Tukey of LP/SP group compared to SP/LP and CT groups at same phase. + $p < 0.05$, ANOVA/Tukey of SP/LP group compared to LP/SP and CT groups at same phase. CT: Control; LP/SP: Long Photoperiod/ Short Photoperiod; SP/LP: Short Photoperiod/ Long Photoperiod.

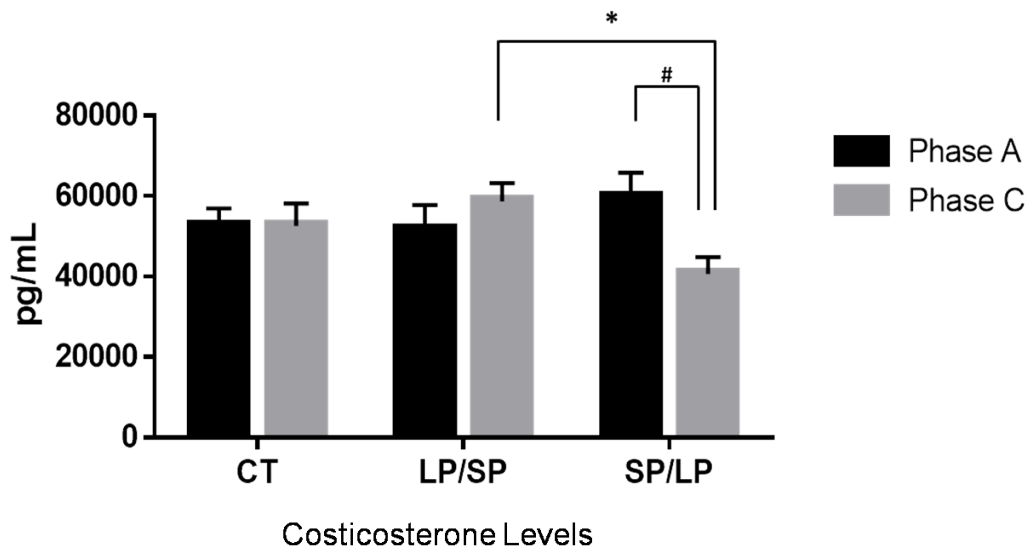


Figure 6. Mean corticosterone concentration in each group at phases A and C. * $p < 0.05$, ANOVA/Tukey compared to all other groups at the same phase. # $p < 0.05$, T-Test for Paired Samples compared to phase A in the same group. CT: Control; LP/SP: Long Photoperiod/ Short Photoperiod; SP/LP: Short Photoperiod/ Long Photoperiod.

TABLES

Table 1: Median of phase A and phase C melatonin concentration per group.

	Median Phase A (pg/ml)	IR*	Median Phase C (pg/ml)	IR*
CT	40.45	67.06	58.25	20.15
LP/SP	80.78	28.72	60.59	41.62
SP/LP	62.63	20.15	99.06	51.52

IR: Interquartile Range

References

Ashkenazy T, Einat H, Kronfeld-Schor N. (2009). We are in the dark here: induction of depression- and anxiety-like behaviours in the diurnal fat sand rat, by short daylight or melatonin injections. *Int J Neuropsychopharmacol.* 12:83-93.

Becker A, Bilkei-Gorzo A, Michel K, Zimmer A. (2010). Exposure of mice to long-light: a new animal model to study depression. *EurNeuropsychopharmacol.* 20:802-12.

Bedrosian TA, Nelson RJ. (2013). Influence of the modern light environment on mood. *Mol Psychiatry.* 18:751-7.

Blask DE, Hill SM, Dauchy RT, Xiang S, Yuan L, Duplessis T, Mao L, Dauchy E, Sauer LA. (2011). Circadian regulation of molecular, dietary, and metabolic signaling mechanisms of human breast cancer growth by the nocturnal melatonin signal and the consequences of its disruption by light at night. *J Pineal Res.* 51:259-69.

Cambras T, Weller JR, Anglès-Pujoràs M, Lee ML, Christopher A, Díez-Noguera A, Krueger JM, de laIglesia HO. (2007). Circadian desynchronization of core body temperature and sleep stages in the rat. *ProcNatlAcadSci U S A.* 104:7634-9

Goda R, Otsuka T, Iwamoto A, Kawai M, Shibata S, Furuse M, Yasuo S. (2015). Serotonin levels in the dorsal raphe nuclei of both chipmunks and mice are enhanced by long photoperiod, but brain dopamine level response to photoperiod is species-specific. *Neurosci Lett.* 593:95-100.

Harb F, Hidalgo MP, Martau B. (2015). Lack of exposure to natural light in the workspace is associated with physiological, sleep and depressive symptoms. *Chronobiol Int.* 32:368-75.

Harrison SJ, Tyrer AE, Levitan RD, Xu X, Houle S, Wilson AA, Nobrega JN, Rusjan PM, Meyer JH. (2015). Light therapy and serotonin transporter binding in the anterior cingulate and prefrontal cortex. *ActaPsychiatr Scand.* 132:379-88.

Karatsoreos IN, Bhagat S, Bloss EB, Morrison JH, McEwen BS. (2011). Disruption of circadian clocks has ramifications for metabolism, brain, and behavior. *Proc Natl AcadSci U S A*. 108:1657-62.

Karatsoreos IN. (2014). Links between Circadian Rhythms and Psychiatric Disease. *Front BehavNeurosci*. 8:162.

Krivisky K, Einat H, Kronfeld-Schor N. (2012). Effects of morning compared with evening bright light administration to ameliorate short-photoperiod induced depression- and anxiety-like behaviors in a diurnal rodent model. *J Neural Transm*. 119:1241-8.

Lall GS, Atkinson LA, Corlett SA, Broadbridge PJ, Bonsall DR. (2012). Circadian entrainment and its role in depression: a mechanistic review. *J Neural Transm*. 119:1085-96.

Lowden A, Åkerstedt T. (2012). Assessment of a new dynamic light regimen in a nuclear power control room without windows on quickly rotating shiftworkers--effects on health, wakefulness, and circadian alignment: a pilot study. *Chronobiol Int*. 29:641-9.

Meliska CJ, Martínez JF, López AM, Sorenson DL, Nowakowski S, Kripke DF, Elliott J, Parry BL. (2013). Antepartum depression severity is increased during seasonally longer nights: relationship to melatonin and cortisol timing and quantity. *Chronobiol Int*. 30:1160-73.

Moore RY. (1983). Organization and function of a central nervous system circadian oscillator: the suprachiasmatic hypothalamic nucleus. *Fed Proc*. 42(11):2783-9.

Morita T, Tokura H. (1998). The influence of different wavelengths of light on human biological rhythms. *Appl Human Sci*. 17:91-6.

Nagy AD, Iwamoto A, Kawai M, Goda R, Matsuo H, Otsuka T, Nagasawa M, Furuse M, Yasuo S. (2015). Melatonin adjusts the expression pattern of clock genes in the suprachiasmatic nucleus and induces antidepressant-like effect in a mouse model of seasonal affective disorder. *Chronobiol Int*. 32:447-57.

NIH (National Institute of Mental Health). (2015). Research Domain Criteria (RDoC) constructs. Available: http://www.nimh.nih.gov/research-priorities/rdoc/rdoc-constructs.shtml#circadian_rhythms [accessed 29 December 2015].

Otsuka T, Kawai M, Togo Y, Goda R, Kawase T, Matsuo H, Iwamoto A, Nagasawa M, Furuse M, Yasuo S. (2014). Photoperiodic responses of depression-like behavior, the brain serotonergic system, and peripheral metabolism in laboratory mice. *Psychoneuroendocrinology*. 40:37-47.

Quiles CL, Oliveira MAB, Piazza FV, Pilz LK, Hidalgo MP. (2014). Mudança de fotoperíodo: proposta de modelo experimental. *Clin Biomed Res*. 34:307-312.

Reiter RJ. (1991). Melatonin: the chemical expression of darkness. *Mol Cell Endocrinol*. 79:153-8.

Rosenthal NE, Sack DA, Gillin JC, Lewy AJ, Goodwin FK, Davenport Y, Mueller PS, Newsome DA, Wehr TA. (1984). Seasonal affective disorder. A description of the syndrome and preliminary findings with light therapy. *Arch Gen Psychiatry*. 41:72-80.

Workman JL, Manny N, Walton JC, Nelson RJ. (2011). Short day lengths alter stress and depressive-like responses, and hippocampal morphology in Siberian hamsters. *Horm Behav*. 60:520-8.

Xu LZ, Liu LJ, Yuan M, Li SX, Yue XD, Lai JL, Lu L. (2016) Short photoperiod condition increases susceptibility to stress in adolescent male rats. *Behav Brain Res*. 300:38-44.

7. ARTIGO 2

ARTIFICIAL LIGHT MODIFIES BIOLOGICAL RHYTHMS AND VISCERAL FAT IN WISTAR RATS

Artigo em processo de submissão para a revista Environmental Science & Technology
(fator de impacto: 5,39)

Artificial Light Modifies Biological Rhythms and Visceral Fat in Wistar Rats

Caroline L. Quiles^{1,2}, Melissa A. B. de Oliveira^{1,2}, Juliana C. Beauvalet^{1,2}, André C. Tonon^{1‡},
Maria Paz L. Hidalgo^{1,2,3‡}*

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

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

³Departamento de Psiquiatria e Medicina Forense, Medical School, Universidade Federal do
Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil

KEYWORDS: chronobiology; circadian rhythm; light emitting diode (LED); activity;
temperature; metabolism.

ABSTRACT

In the last century, humans spent most of their day indoors, exposed to artificial light. Low exposure to natural light during the day represents an urgent environmental health problem. We compare the influence of two artificial light regimens on metabolism and biological rhythms of Wistar rats. Animals were exposed 108 days to a 16:8h light-dark (LD) cycle and divided into two groups: standard light (SL), kept under a steady regimen of light (LED, 4000K); and circadian light (CL), kept under variations of light throughout the day (LED, 2700-6500K). Activity and temperature were measured for rhythm characterization. Body weight and visceral fat were assessed. CL presented better rhythmic parameters than SL group i.e. lower intracycle variability, higher amplitude and amount of activity. Although difference on body weight was non-significant, SL showed high visceral fat weight. Visceral fat negatively correlates with activity rhythm stability and positively correlates with the sum of activity during a rest period in SL group. Our study supports that the standard light regimen without circadian variation is a strong factor for the increase in visceral fat in adult phase. Finally, we underline the translational aspect of this study, since humans have spent increasingly more time under artificial light.

INTRODUCTION

With the advent of electricity, societies have long abandoned the organization of their routines to light-dark transitions. Humans have extended progressively the light phase during the night hours.^{1, 2} Additionally, a substantial amount of people spend most of their day indoors. These environments have low exposure to natural light and little variability of intensity and color temperature of light during the day. From an environmental health perspective, this change in the pattern of light exposure is recent in the course of human evolution, and its effects are starting to be perceived and measured.³

Biological rhythms are regulated by a circadian system that coordinates internal oscillators in different organs and that is also responsible for the adaptation of rhythms to external stimuli.⁴ In mammals, the hypothalamic suprachiasmatic nucleus (SCN) is the central neuroendocrine pacemaker.⁵ It entrains inner rhythms according to light via retinal ganglion cells that contain the photopigment melanopsin.⁶ Photic information gets to the SCN, which connects to several body structures regulating metabolism and biological rhythms, including temperature and activity.⁷ Areas that regulate sleep and food intake such as the ventrolateral preoptic nucleus and the lateral hypothalamus receive inputs from the SCN.⁸ Long term exposure to constant light has been shown to disrupt circadian rhythmic behavior,⁹ leading to obesity and type 2 diabetes in rodents.^{10,11}

The capacity that light has to entrain the biological clock depends on its wavelength, also described as color temperature. Shorter wavelengths (higher color temperatures) denote bluish-white colored lights, which are the most efficient in affecting bodily rhythms.¹² Particularly, wavelengths from 446 nm (~ 6500K) to 477 nm (~ 6075K) are the most potent input to suppress melatonin secretion.¹³ When humans are exposed to this sort of light at night, the SCN is stimulated in an unexpected manner, indirectly affecting important brain regions^{1,12,14} and metabolic pathways.¹⁵ On the other hand, exposure to lights with longer wavelengths (lower temperatures) close to bedtime depresses central nervous system activity, preparing it to the rest period.¹⁶

An emergent body of evidence links light pollution to a variety of ecological effects.¹⁷ Thus, studies point to the necessity of research on the effects of light pollution and on non-deleterious light regimens.¹⁸ Some researchers attempt to create devices for measurement of light exposure¹⁹ and evaluate light effects on sleep and behavior.²⁰ However, studies developing special lighting technologies are still lacking.

We hypothesize that a steady light that is frequently used indoors could cause disruptions in metabolic factors and biological rhythms. This work aims to compare the effects of an artificial light exposure regimen with no variations in wavelength throughout the day to a dynamic regimen (with color temperature variations) on metabolism and biological rhythms of rats.

METHODS

Study design

Pregnant female Wistar rats obtained from the Animal Experimentation Unit (UEA) of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) were kept under 12:12h light-dark cycles (LD) during all pregnancy. On postnatal day (PND) 1, cages with dam and litters were allocated in a photoperiod station under the same controlled temperature (22 ± 2 °C), humidity, and noise exposure. Experiments were performed only on male litters after weaning (n=36). Animals were submitted to a 16:8h LD cycle (lights on at 5h p.m.) since PND 1 and divided into two experimental groups, circadian light (CL; n=18) or standard light (SL; n=18). After 23 days, 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 until the end of the study.

Body weight and food consumption were recorded once a week from weaning until the end of the experiment. Temperature-recording devices (iButtons) were surgically implanted into the peritoneal cavity on PND 45. Blood collection session occurred on PND 94-97. Animals were euthanized between PND 108 and PND 110 with anesthetic overdose of isoflurane. Visceral fat was extracted and weighted.

Considering different stages of development previously established,²¹ the study was divided in four periods: phase 1 (PND 24-42), phase 2 (PND 43-56), phase 3 (PND 57-84), and phase 4 (PND 85-108).

Experimental procedures are presented in **Figure 1**. All trials were conducted in accordance to institutional policies on experimental animal handling, and the project was approved by the Institutional Research Ethics Committee (project number 15-0059 - GPPG/HCPA).

Intervention: artificial light

Animals were exposed to a long photoperiod of 16 hours of light and 8 hours of dark, according to protocols already established,^{22,23} to reproduce the modern daily light exposure of individuals on urban areas. Standard light group (SL) was exposed to a LED light with constant color temperature (4000K), while circadian light group (CL) was exposed to LED luminaires developed to simulate daily natural light changes. 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 LuxionIluminação™ (Caxias do Sul, Brazil), emitted 1500 lumens and were powered with 10W.

Rhythm characterization

Activity-rest and temperature rhythms were characterized as described.²⁴ Individual home cages were equipped with actigraphs (Actigraph, ADNplin, ©Antoni DíezNoguera, Barcelona, CA, Spain), which detected animal movement with 2 infrared rays and 2 receptors and recorded the number of locomotion units every 10 minutes. Activity-rest data were collected from PND 24 to euthanasia, comprising a total of approximately 84 days. Temperature was recorded using ThermoChroniButtons (Dallas, TX) implanted into the abdominal cavity. iButtons recorded data every 50 minutes from PND 56 to euthanasia, comprising approximately 52 days.

Melatonin and Corticosterone Analysis

On PND 94-97, blood collection session was performed by retroorbital venipuncture. Animals were anesthetized with isoflurane (Biochemico, Penedo, RJ, Brazil) (5% for induction and 2–3% for maintenance), and Tramadol (5 mg/kg i.p., Tramal®, Hipolabor, MG, Brazil) was used for analgesia, which was administered immediately and every 12 hours for 1 day after collection. All collections occurred between the second and fourth hour after the lights were turned off in a room with just indirect red light.

Melatonin and corticosterone serum concentration were determined using an ELISA method according to the manufacturer's specifications (ELISA kit, IBL international, Germany). The results of melatonin and corticosterone concentrations are expressed in pg/mL.

Analysis of chronobiological parameters

The evaluation of activity and temperature rhythms was performed using the integrated Chronobiology software El Temps (A. Díez-Noguera, Universitat de Barcelona, 1999). For determination of chronobiological parameters, Cosinor, Serial and Waveform analysis were used. Sum of activity was calculated for light and dark phases of each day, and then used to calculate the mean activity sum of each phase of study.

Cosinor analysis was performed by fitting the data to a sinusoidal curve of a 24-hour rhythm, which provided the *mesor* (average value of the fitted curve), *amplitude* (difference between the curve extremes and mesor), and *acrophase* (measure of the time in which it is more likely to be found the highest value of a variable). Serial analysis (Heaviside function) provided flanks of rhythms and sum of activity values. Flanks represent the daily onset (positive flank) and offset (negative flank) of increase in the variable analyzed. The Wave Form analysis provided the Intracycle Variability (IV) and Interdaily Stability (IS) of data, which are nonparametric serial analyses (as they are not based on a sinusoidal curve). These analyses quantify the rhythm fragmentation and the synchronization to the 24-h light–dark cycle, respectively.

Activity and temperature data were organized in paired 50-min-bins by calculating the mean of five activity recordings (10 min each) and the corresponding temperature recording (50 min each). Correlation between activity and temperature rhythms was calculated in Microsoft Office Excel 2010 to obtain the Pearson's r for each group. Correlation between activity rhythms (IS, IV, and sum of activity) and visceral fat was calculated in SPSS for Windows (version 17; SPSS Inc., Chicago, IL) to obtain the Spearman's r for each group.

Statistical Analysis

Shapiro-Wilk test was used to analyze data distribution. For all variables with parametric distribution, comparison among groups (SL and CL) was performed by Student's t test for independent samples. The results are expressed by means \pm SD (Standard Deviation) or SEM (Standard Error of the Mean). On the other hand, for all results with non-Gaussian distributions, comparisons among groups were performed by Mann-Whitney U test, and comparisons of rounds of test were performed by Wilcoxon signed-rank test. These results are expressed by median \pm IR (Interquartile Range). Values of $p \leq 0.05$ were considered statistically significant. Statistical analysis was performed using SPSS for Windows (version

17; SPSS Inc., Chicago, IL) and all graphs were done using GraphPad Prism version 6.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA).

RESULTS AND DISCUSSION

Our results demonstrate that the artificial light commonly used for indoor environments negatively impacts circadian rhythmicity and metabolism of rats compared to a circadian light, which simulates natural daylight variations of color temperature.

For rhythm characterization, **Figures 2.A** and **2.B** present positive and negative flanks analyses of activity and temperature. In both groups, the onset of activity and temperature recorded occurred in the beginning of the dark phase. The offset occurred in the beginning of the light phase. CL activity during dark period (activity phase) was greater than that of SL group in phases 3 ($U = 68.000$, $p < 0.005$) and 4 ($U = 79,000$, $p < 0.05$) (**Table 1**). During light period, no differences between groups were found in amount of activity (data not shown), suggesting that CL group displayed a rhythm more appropriate to that expected for nocturnal species.

An important characteristic of nocturnal animals is maximum amount of activity during the dark period and minimum movement during the light period, reflecting high amplitude of activity rhythm (magnitude of the variation within a cycle). CL group presented significant higher amplitude of activity than SL group in phases 3 ($t = 2.29$, $p < 0.05$) and 4 ($t = 2.18$, $p < 0.05$) (**Figure 3.B**). The higher activity amplitude was likely a result of gradual changes of light, since CL group was exposed to gradual transitions of color temperature. Blue and green wavelengths were set in the middle of the light period, whereas reddish light spectrum took place at the beginning and at the end, distinguishing the onset and the end of the light period. Sleep induction and light aversion responses in mice are differentially affected by wavelength;²⁵ green lights are associated with rapid sleep induction, whereas blue lights result in an arousal response. This phenomenon is mediated by retinal melanopsin, a photopigment that is most sensitive to blueish lights (~460 nm, or around ~6300K).²⁶ These studies demonstrate the distinct influence of different light wavelengths on sleep/wake and rest/activity rhythms. Therefore, a lighting system that transitions through a series of wavelengths during lit periods may affect these rhythms differentially at each time point.

During phases 3 and 4, SL group shows higher values of activity IV (phase 3: $t = -2.62$, $p < 0.05$; phase 4: $t = -2.42$, $p < 0.05$) (**Figure 3.C**). However, no difference in activity IS was found among groups (**Figure 3.D**). Nonetheless, an opposite pattern than that of IV can be noted. All these analyses were also performed for temperature, but no statistical

difference was found (data not shown). Correlations between activity and temperature were higher in the CL group (**Figure 3.A**). But difference was not statistically significant ($z = 1.171$, $p > 0.05$). In addition, the difference (or delta) between acrophases of activity was considerably larger in phases 2, 3 and 4 (**Figure 4**). These findings suggest a fragile synchrony between rhythms on SL group, since the relationship between rhythms of temperature and activity is fundamentally linked to the adequate synchronization between the circadian system and the environment. In humans, this relevant disruption of rhythms' synchrony is an indicator of a chronodisturbance that could lead to chronodisruption if this disturbance of circadian organization is chronic.²⁷ In turn, chronodisruption is considered a crucial factor in the etiology of mood disorders,^{28,29} several metabolic disorders and weight gain,³⁰ representing an interesting target for prevention and treatment of adverse health outcomes.

As seen in **Figure 5.A**, body weight was different on weeks 6, 8, 13, and 14. SL group presented lower body weight compared to CL group on weeks 6 ($t = 2.13$, $p < 0.05$) and 8 ($t = 3.12$, $p < 0.01$), and higher body weight on week 13 ($t = -3.17$, $p < 0.01$) and on week 14 ($t = -2.05$, $p < 0.05$). On week 6, CL group had a higher food intake ($t = 2.11$, $p < 0.05$), but on weeks 9, 12, and 13, SL group presented higher food intake (week 9: $t = -2.13$, $p < 0.05$; week 12: $t = -2.145$, $p < 0.05$; week 13: $t = -4.06$, $p < 0.001$). These results can be seen in **Figure 5.B**. Moreover, SL group showed significant higher visceral fat weight than CL group ($U = 75.000$, $p < 0.01$) (**Figure 5.C**). From our findings we hypothesize that the most probable alternative for the reduction of visceral fat in CL group would be the displacement of energy intake from visceral fat storage to expenditure in muscular tissue production in response to the increased activity in dark phase. Furthermore, a correlation between visceral fat weight and the total sum of activity during light phase (Spearman's correlation; $r = 0.556$, $p < 0.05$) occurred only in the SL group. This means that the more active animals were when they should be resting, the higher the visceral fat. Thus, our results indicate that being active at times when the body needs rest might be deleterious to health.

We also corroborate a close relationship between biological rhythms and metabolism. Activity IS was negatively correlated with visceral fat on SL group in phases 1, 3 and 4 ($p < 0.05$) (on phase 4 this correlation was strong, $r > 0.7$), and on CL group just in phase 2 ($p < 0.05$) (**Table 2**). In addition, SL group presented a significant positive correlation of activity IV and visceral fat in phases 1 and 4 ($p < 0.05$) and CL group in phases 1 and 2 ($p < 0.05$) (**Table 2**). Such results suggest that low synchronization of activity to the 24-h light-dark cycle is related to high visceral fat weight.

The concentration of melatonin and corticosterone at night also correlated with rhythmical parameters in phase 4, when blood collection occurred. CL group concentration of melatonin correlated positively with amplitude, mesor and sum of activity on dark, and presented a negative tendency of correlation with IV of activity(**Table 3**). In another hand, the corticosterone concentration of the CL group correlated positively with IV of activity(**Table 3**). Whereas SL group did not present any correlation with the melatonin concentration, corticosterone concentration of the SL group correlated positively with mesor of temperature, correlated negatively with mesor of activity and with the sum of activity at light. Also, SL group presented a negative tendency whit sum of activity on dark(**Table 3**). With these findings, we can propose that CL induces activity at night, which is positively correlated with concentration of melatonin at night, synchronizing the animal correctly to light/dark cycle. Especially when we consider that the distribution of melatonin concentration in the CL group had a pattern much closer to normal than the SL group (**Figure 6**). However, SL induces higher sum of activity at light, that is negatively correlated whit concentration of corticosterone at night and whit visceral fat, suggesting a disturbance on circadian rhythms whit light/dark cycle.

Therefore, we highlight that rhythmic analyses of activity such as IS and IV are important subjects of study in metabolism research, as they could predict levels of visceral fat, especially in adulthood (phases 3 and 4 in this study). Our study points that these rhythmic variables might also be useful to investigate the relationship between body weight and patterns of fat accumulation. Future studies should weigh animals' muscle mass, which is a potential confounding variable.

Even considering that our animals are nocturnal, our results are very relevant. They indicate that activity patterns observed in CL group could be more evident in diurnal animals, since they would be exposed to the intervention during their period of activity, therefore suffering a stronger influence of light. This reinforces the potential translational value of our research.

Our results reinforce the importance of light as an essential cue to the regulation of physiology and behavior. We expect that the light technology designed for this study could be improved in order to allow its use in hospitals and offices, where natural light is often unavailable. Recent studies call for the engagement of light industry, chronobiologists and architects, in order to optimize lighting regimes. This would not only promote health, but also assist in energy saving and improve performance in laboral and educational activities.

FIGURES

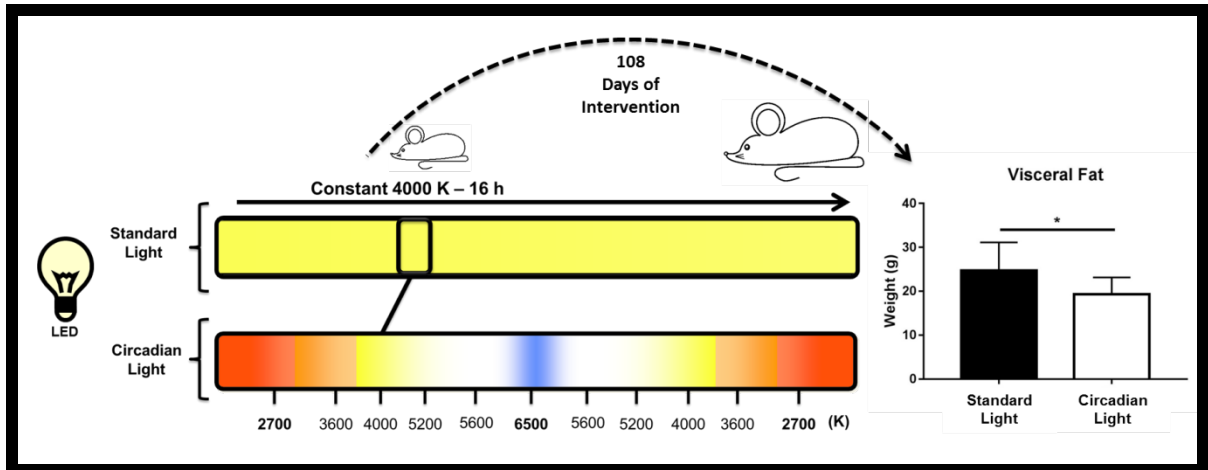


Table of Contents (TOC)

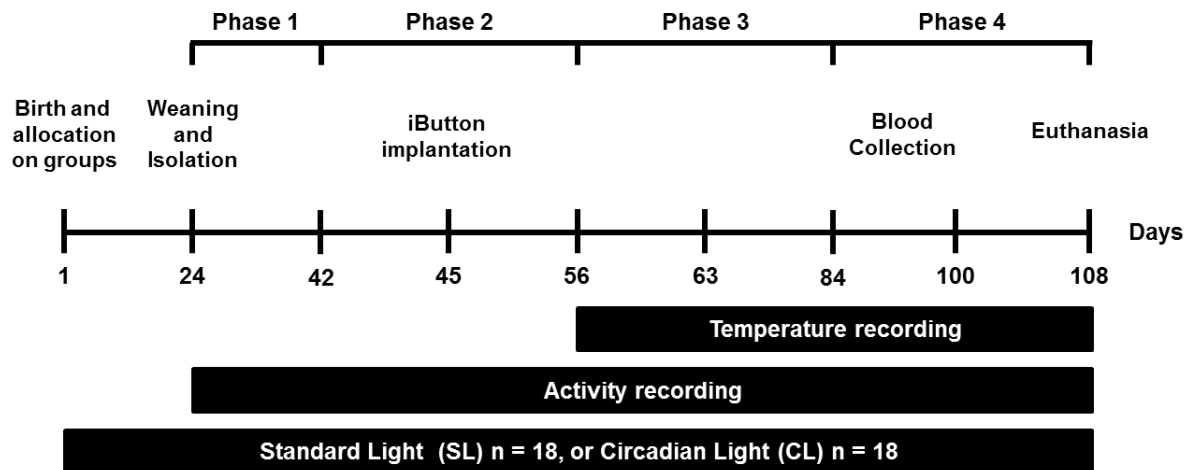


Figure 1.Flowchart of study design.

The study was divided in four periods: phase 1 (PND 24-42), phase 2 (PND 43-56), phase 3 (PND 57-84) and phase 4 (PND 85-108), according to different stages of development. From PND 1 to 23, litters were kept with their genitors and no data could be collected.

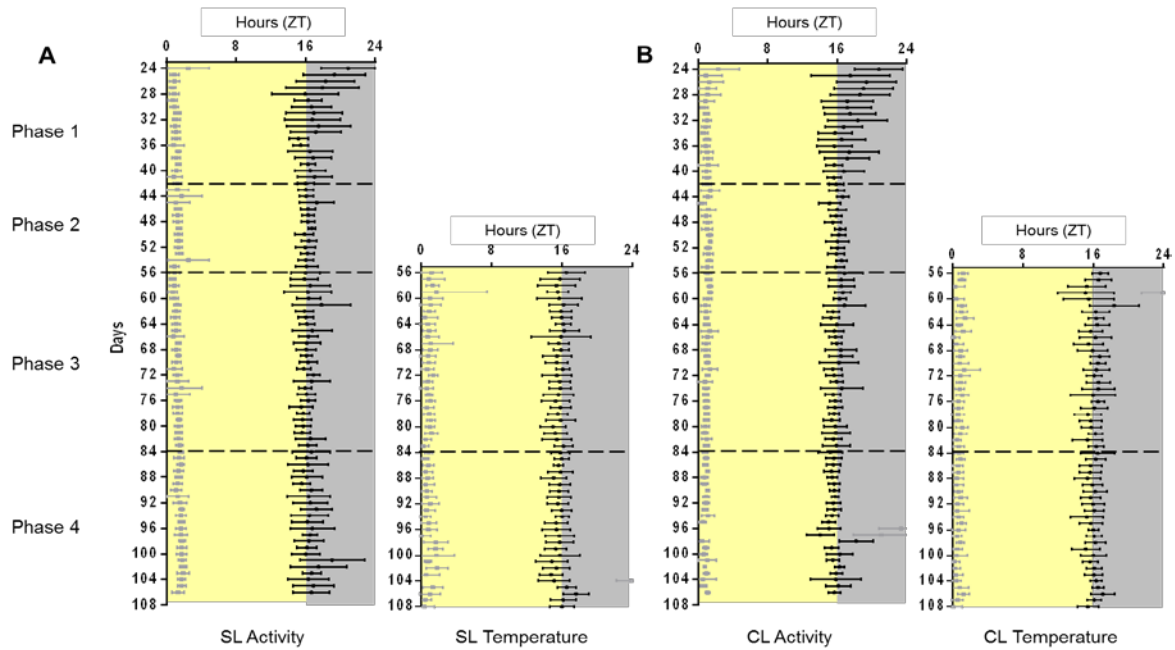


Figure 2. Positive and negative flanks of activity and temperature.

Positive and negative flanks of activity and temperature of (A) SL group and (B) CL group. Such analysis show the mean of hours on the beginning of the variable (positive flank) and the end of it (negative flank). Positive flanks (black circles) and negative flanks (grey squares). Regions with gray background represent dark periods, while yellow background represents light periods. Phase 1 to phase 4, divided by dotted lines, represent the different stages of development.

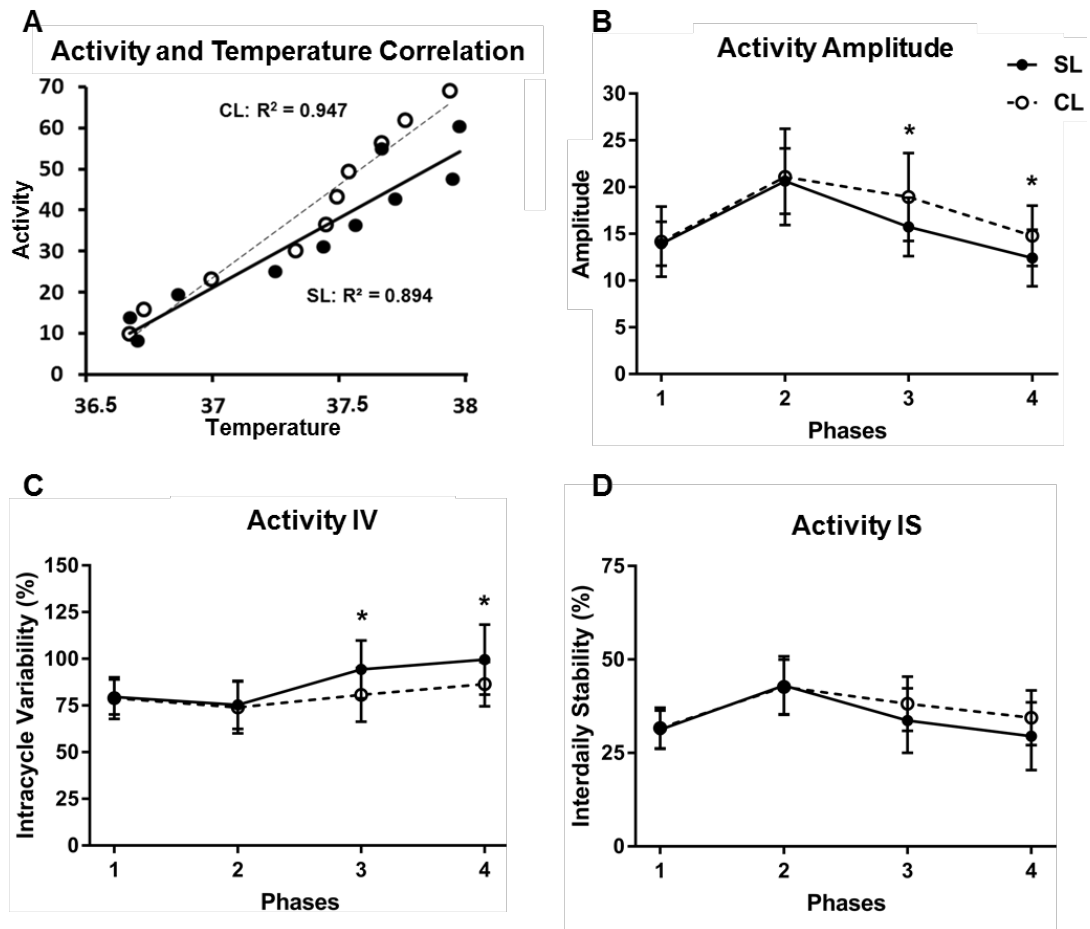


Figure 3. Variation of activity profile.

(A) Correlation between activity and temperature; (B) Activity amplitude among phases. Data are shown as mean \pm SD; (C) IV of activity among phases. Data are shown as mean (%) \pm SD; (D) IS of activity among phases. Data are shown as mean (%) \pm SD. Continuous line represents SL group and the dashed line represents the CL group; * $p < 0.05$ differences between groups in Student's t-test for independent samples.

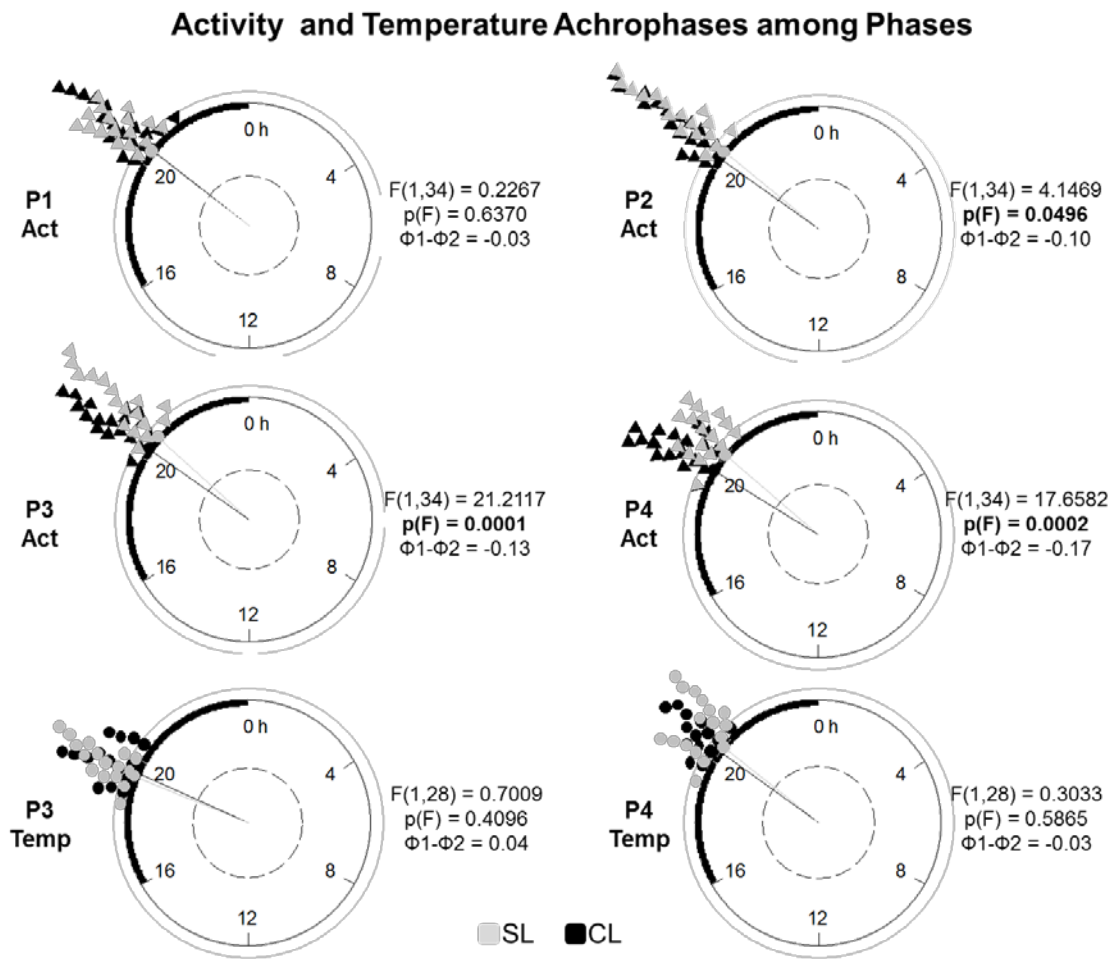


Figure 4. Activity and temperature achrophases among phases.

Watson-Williams test for homogeneity of means between samples of circular data. Each Rayleigh graph represents a clock of 24 hours; the dark bar is the representation of the period of darkness. Each triangle (activity) or circle (temperature) represents the moment of variable peak of an animal. Grey triangles or circles = SL group; Black triangles or circles = CL group.

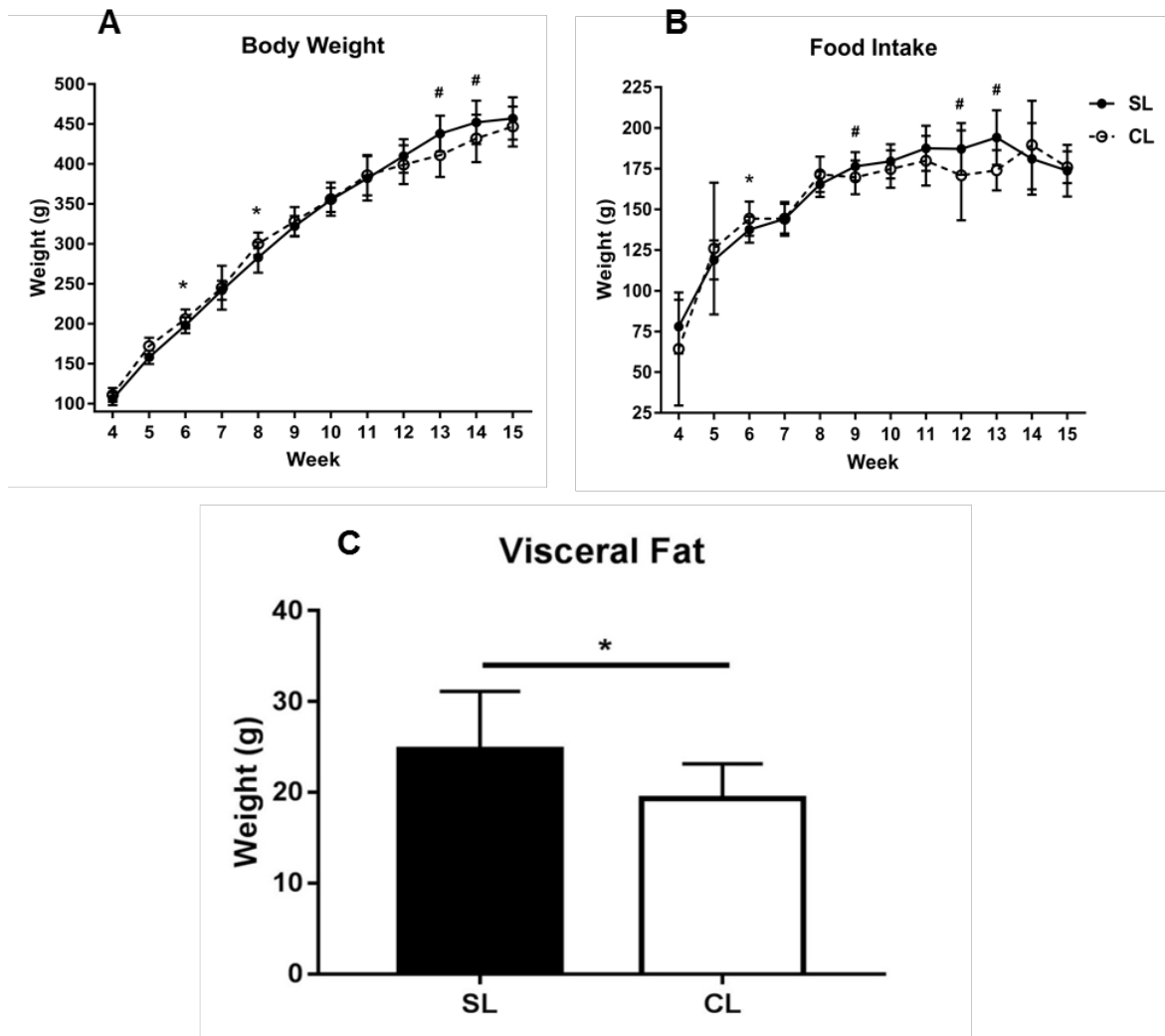
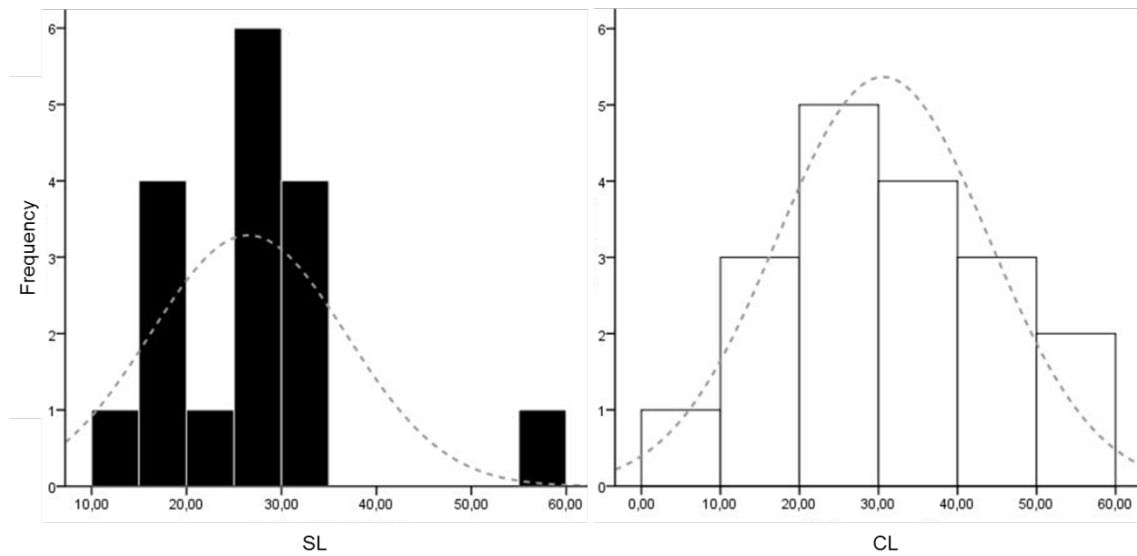


Figure 5.Metabolic Profile.

(A) Average of body weight and (B) food intake of groups at each week; Data are shown as mean \pm SD; Continuous line (SL group), dashed line (CL group); * $p < 0.05$ for increase in body weight or food intake of CL group in comparison to SL group; # $p < 0.05$ for decrease in body weight or food intake of CL group in comparison to SL group; (C) Median of Visceral Fat; Data are expressed in median \pm IR; * $p < 0.05$ for differences between groups in Mann-Whitney U test.

Distribution of melatonin concentration (pg/mL)



Distribution of corticosterone concentration (pg/mL)

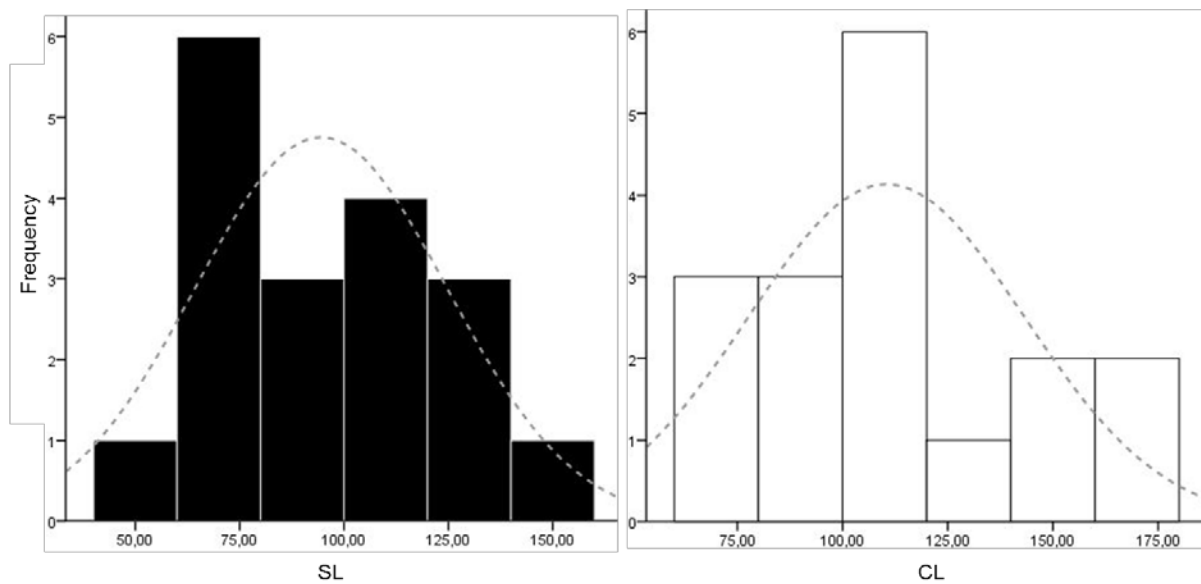


Figure 6. Frequencies distribution of melatonin and corticosterone concentration.

In melatonin concentration, SL group was considered nonparametric by shapiro-wilk test ($p < 0.05$). CL group $n = 18$, SL group $n = 17$. One in the animals of SL group was considered outlier because its concentration was more than three standard deviations of the group average. All other frequencies were considered parametric ($p > 0.05$) and any animal was removed from the analysis.

TABLES

Table 1. Sum of activity in dark period among phases

Phase	SL	CL	<i>U</i>
1	1558.52 ± 226.45	1608.16 ± 449.37	140.00
2	2101.36 ± 449.68	2007.00 ± 511.64	149.00
3	1653.64 ± 347.54	2041.95 ± 316.18	68.00
4	1404.50 ± 392.20	1593.66 ± 405.81	79.00

Data are shown as median ± IR. Dark gray background = $p < 0.05$; Light gray background = $p < 0.01$ in differences between groups in Mann-Whitney U test.

Table 2.Correlations between rhythmic parameters and visceral fat in all study phases

	Visceral Fat SL	Visceral Fat CL
Phase1 (PND 24-42)		
	r	r
Activity IV	0.565	0.595
Activity IS	-0.500	-0.365
Phase 2 (PND 43-56)		
	r	r
Activity IV	0.071	0.531
Activity IS	-0.164	-0.499
Phase 3 (PND 57-84)		
	r	r
Activity IV	0.466	0.289
Activity IS	-0.493	-0.26
Phase 4 (PND 84-108)		
	r	r
Activity IV	0.596	0.107
Activity IS	-0.706	-0.193

Spearman's correlation of activity IV (Intracycle Variability), activity IS (Interdaily Stability) and Visceral Fat in each study phase. Dark gray background = $p < 0.05$; Light gray background = $p < 0.065$ (tendency).

Table 3. Correlations between hormonal and rhythmic profile in both groups

	Melatonin		Corticosterone	
	SL	CL	SL	CL
	r	r	r	r
Amplitude of Activity	0.053	0.584	-0.354	-0.142
Mesor of Activity	0.269	0.474	-0.544	0.026
Mesor of Temperature	-0.329	0.389	0.534	-0.347
Sum of Act. on Dark	-0.168	0.515	-0.477	-0.023
Sum of Act. on Light	0.209	0.346	-0.562	0.054
Activity IV	0.053	-0.445	0.164	0.545

Correlations between corticosterone and melatonin with rhythmic variables on phase 4. Dark gray background = $p < 0.05$; Light gray background = $p < 0.065$ (tendency). All other rhythmic variables were tested, but no significant correlations were found.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

* Caroline Luísa Quiles, Laboratório de Cronobiologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Ramiro Barcelos, 2350 sala 12107, 90035-903, Porto Alegre, RS, Brasil. Phone: +55 51 33598849. E-mail address: carol.quiles22@gmail.com

Author Contributions

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript. ‡These authors contributed equally.

Funding Sources

The study was supported 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 LuxionIluminação™.

ACKNOWLEDGMENT

The authors acknowledge the Animal Experimentation Unit team (UEA), and Biomedical Engineering Service of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) for technical and logistical support.

ABBREVIATIONS

CL, circadian light; IS, interdaily stability; IR, interquartile range; IV, intracycle variability; K, Kelvin; LD, light-dark cycle; LED, light-emitting diode; PND, postnatal day; SCN, suprachiasmatic nucleus; SD, standard deviation; SEM, standard error of the mean; SL, standard light nm, nanometers.

REFERENCES

1. Bedrosian, T.A.; Vaughn, C.A.; Galan, A.; Daye, G.; Weil, Z.M.; Nelson, R.J. Nocturnal light exposure impairs affective responses in a wavelength-dependent manner. *J Neurosci.* **2013**, *7* (32), 13081–13087.
2. Stevens, R.G.; Brainard, G.C.; Blask, D.E.; Lockley, S.W.; Motta, M.E. Breast cancer and circadian disruption from electric lighting in the modern world. *CA Cancer J Clin.* **2014**, *64*(3), 207–218.
3. Lucas, R.J.; Peirson, S.N.; Berson, D.M.; Brown, T.M.; Cooper, H.M.; Czeisler, C.A.; Figueiro, M.G.; Gamlin, P.D.; Lockley, S.W.; O'Hagan, J.B.; Price, L.L.; Provencio, I.; Skene, D.J.; Brainard, G.C. Measuring and using light in the melatonin age. *Trends Neurosci.* **2014**, *37* (1), 1–9.
4. Bechtold, D.A.; Gibbs, J.E.; Loudon, A.S.. Circadian dysfunction in disease. *Trends Pharmacol Sci.* **2010**, *31*, 191-198.
5. Roenneberg, T.; Merrow, M. The Circadian Clock and Human Health. *Curr Biol.* **2016**, *23* (10), 432-443.
6. Berson, D.M.; Dunn, F.A.; Takao, M. Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science.* **2002**, *8*, 1070–1073.
7. Buijs, R.M.; van Eden, C.G.; Goncharuk, V.D.; Kalsbeek, A. The biological clock tunes the organs of the body: timing by hormones and the autonomic nervous system. *J Endocrinol.* **2003**, *177* (1), 17–26.
8. Saper, C.B.; Scammell, T.E.; Lu, J. Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms. *Nature.* **2005**, *27*(7063), 1257–1263.
9. Albers, H.E.; Gerall, A.A.; Axelson, J.F. Circadian rhythm dissociation in the rat: effects of long-term constant illumination. *Neurosci Lett.* **1981**, *7*(1), 89–94.
10. Fonken, L.K.; Nelson, R.J. The effects of light at night on circadian clocks and metabolism. *Endocr Rev.* **2014**, *35* (4), 648–670.
11. Coomans, C.P.; van den Berg, S.A.A.; Houben, T.; van Klinken, J-B.; van den Berg, R.;

- Pronk, A.C.; Havekes, L.M.; Romijn, J.A.; van Dijk, K.W.; Biermasz, N.R.; Meijer, J.H. Detrimental effects of constant light exposure and high-fat diet on circadian energy metabolism and insulin sensitivity. *FASEB J.* **2013**,*27*(4), 1721–1732.
12. Holzman, D.C. What's in a color? The unique human health effect of blue light. *Environ Health Perspect.* **2010**,*118* (1), 22-27.
 13. Brainard, G.C.; Hanifin, J.P.; Greeson, J.M.; Byrne, B.; Glickman, G.; Gerner, E.; Rollag, M.D. Action spectrum for melatonin regulation in humans: evidence for a novel circadian photoreceptor. *J Neurosci.* **2001**,*15* (16), 6405–6412.
 14. Vandewalle, G.; Maquet, P.; Dijk, D-J. Light as a modulator of cognitive brain function. *Trends CognSci (Regul Ed).* **2009**, *13*(10), 429–438.
 15. Fonken, L.K.; Workman, J.L.; Walton, J.C.; Weil, Z.M.; Morris, J.S.; Haim, A.; Nelson, R.J. Light at night increases body mass by shifting the time of food intake. *ProcNatlAcadSci USA.* **2010**, *107* (43), 18664–18669.
 16. Foster, R.G. Neurobiology: bright blue times. *Nature.* **2005**, *17*(7027), 698–699.
 17. Chepesiuk, R. Missing the dark: health effects of light pollution. *Environ Health Perspect.* **2009**,*117* (1), 20-27.
 18. Claudio, L. Switch on the night: policies for smarter lighting. *Environ Health Perspect.* **2009**, *117*(1), 28-31.
 19. Figueiro, M.; Brons, J.; Plitnick, B.; Donlan, B.; Leslie, R.; Rea, M. Measuring circadian light and its impact on adolescents. *Light Res Technol.* **2011**, *43* (2), 201–215.
 20. Harb, F.; Hidalgo, M.P.; Martau, B. Lack of exposure to natural light in the workspace is associated with physiological, sleep and depressive symptoms. *Chronobiol Int.* **2015**, *32*(3), 368–375.
 21. Sengupta, P. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *Int J Prev Med.* **2013**, *4* (6), 624–630.
 22. Otsuka, T.; Kawai, M.; Togo, Y.; Goda, R.; Kawase, T.; Matsuo, H.; Iwamoto, A.; Nagasawa, M.; Furuse, M.; Yasuo, S. Photoperiodic responses of depression-like

- behavior, the brain serotonergic system, and peripheral metabolism in laboratory mice. *Psychoneuroendocrinology*. **2014**, *40*, 37–47.
23. Workman, J.L.; Manny, N.; Walton, J.C.; Nelson, R.J. Short day lengths alter stress and depressive-like responses, and hippocampal morphology in Siberian hamsters. *HormBehav*.**2011**, *60* (5), 520–528.
 24. Quiles, C.L.; de Oliveira, M.A.B.; Tonon, A.C.; Hidalgo, M.P.L. Biological adaptability under seasonal variation of light/dark cycles. *Chronobiol Int*.**2016**, *33* (8), 964–971.
 25. Piorz, V.; Tam, S.K.E.; Hughes, S.; Pothecary, C.A.; Jagannath, A.; Hankins, M.W.; Bannerman, D.M.; Lightman, S.L.; Vyazovskiy, V.V.; Nolan, P.M.; Foster, R.G.; Peirson, S.N. Melanopsin Regulates Both Sleep-Promoting and Arousal-Promoting Responses to Light. *PLoS Biol*.**2016**, *14*(6), 1002482.
 26. Lockley, S.W.; Brainard, G.C.; Czeisler, C.A. High sensitivity of the human circadian melatonin rhythm to resetting by short wavelength light. *J ClinEndocrinolMetab*. **2003**, *88*(9), 4502–4505.
 27. Erren, T.C.; Reiter, R.J. Defining chronodisruption. *J Pineal Res*. **2009**, *46* (3), 245–247.
 28. Scott, J. Clinical parameters of circadian rhythms in affective disorders. *EurNeuropsychopharmacol*. **2011**, *21*(4), 671-675.
 29. Bechtel,W. Circadian Rhythms and Mood Disorders: Are the Phenomena and Mechanisms Causally Related? *Front Psychiatry*. **2015**, *6*,118.
 30. Turek, F.W.; Joshu, C.; Kohsaka, A.; Lin, E.; Ivanova, G.; McDearmon, E.; Laposky, A.; Losee-Olson, S.; Easton, A.; Jensen, D.R.; Eckel, R.H.; Takahashi, J.S.; Bass, J. Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. *Science*.**2005**, *13* (5724), 1043–1045.

8. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Destacamos os seguintes achados dos experimentos realizados para esta dissertação:

- A transição de um fotoperíodo curto para um fotoperíodo longo requer maior grau de capacidade adaptativa do que a transição inversa.
- A iluminação com padrão constante (Standard Light) causou alterações negativas tanto no ritmo de atividade e repouso dos animais, como aumento de gordura visceral e alterações no ritmo de corticosterona noturna, em comparação com iluminação de espectro dinâmicos (Circadian Light).

Estes achados apresentam um potencial translacional, uma vez que:

- A iluminação com espectro dinâmicos pode ser uma alternativa para minimizar os efeitos deletérios da iluminação artificial, já que suas características mais aproximadas às do Sol permitem uma antecipação e melhor organização dos eventos biológicos cíclicos.
- Variáveis rítmicas (como *IntracycleVariability* e *InterdailyStability*) também podem ser úteis para investigar a relação entre o peso corporal e os padrões de acúmulo de gordura.
- Os estudos com modelos animais precisam ser mais rigorosos e padronizados em relação ao fotoperíodo e qualidade de iluminação utilizados. Tendo em vista que podem ser potenciais confundidores por sua influência no comportamento e metabolismo.
- Políticas públicas que levem em consideração a iluminação artificial como um fator de risco devem ser discutidas e implementadas, pois cada vez mais temos evidências a influência da iluminação no processo saúde-doença.

Portanto, as nossas perspectivas são:

- Realizar estudos em seres humanos que avaliem o efeito da iluminação artificial em desfechos como sintomas psiquiátricos e alterações metabólicas.
- Testar a utilização da iluminação com espectro dinâmico, como uma possibilidade de solucionar ou minimizar os 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).

REFERÊNCIAS DA REVISÃO DE LITERATURA

1. Beaune DAS, White R. Ice Age Lamps. *Sci Am.* 1993; 266:108–13.
2. Nordhaus WD. Do Real Output and Real Wage Measures Capture Reality? The History of Lighting Suggests Not [Internet]. Cowles Foundation for Research in Economics, Yale University; 1994 [cited 2017 Apr 13]. Report No.: 1078. Available from: <https://ideas.repec.org/p/cwl/cwldpp/1078.html>
3. Haim A, Portnov, Boris A. Light Pollution as a New Risk Factor for Human Breast and Prostate Cancers. 2013;168.
4. Cinzano P, Falchi F, Elvidge C d. The first World Atlas of the artificial night sky brightness. *Mon Not R Astron Soc.* 2001 Dec 1;328(3):689–707.
5. Navara KJ, Nelson RJ. The dark side of light at night: physiological, epidemiological, and ecological consequences. *J Pineal Res.* 2007 Oct;43(3):215–24.
6. Pauley SM. Lighting for the human circadian clock: recent research indicates that lighting has become a public health issue. *Med Hypotheses.* 2004;63(4):588–96.
7. Mills PR, Tomkins SC, Schlangen LJM. The effect of high correlated colour temperature office lighting on employee wellbeing and work performance. *J Circadian Rhythms.* 2007 Jan 11;5:2.
8. NEWTON I, Assis AKT. *Óptica.* EdUSP; 2002. 300 p.
9. Daniel Smith. Calculating the Emission Spectra from Common Light Sources [Internet]. COMSOL Multiphysics©. [cited 2017 Apr 16]. Available from: <https://br.comsol.com/blogs/calculating-the-emission-spectra-from-common-light-sources/>
10. The 2014 Nobel Prize in Physics - Press Release [Internet]. [cited 2017 Apr 19]. Available from: https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/2014/press.html

11. Straif K, Baan R, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, Bouvard V, et al. Carcinogenicity of shift-work, painting, and fire-fighting. *Lancet Oncol*. 2007 Dec;8(12):1065–6.
12. Painting, Fire-Fighting and Shiftwork - WHO - OMS - [Internet]. [cited 2017 Apr 17]. Available from: <http://apps.who.int/bookorders/anglais/detart1.jsp?sesslan=1&codlan=1&codcol=72&codcch=98>
13. Hawking S. O universo numa casca de noz. Editora Intrínseca; 2016. 287 p.
14. Roenneberg T, Merrow M. The Circadian Clock and Human Health. *Curr Biol CB*. 2016 May 23;26(10):R432-443.
15. Antoni Díez-Noguera, Trinitat Cambras Riu, JV Hortensi, NC Cucurela. *Cronobiologia*. Espanha: Universidad de Barcelona; 1999.
16. Auger RR, Morgenthaler TI. Jet lag and other sleep disorders relevant to the traveler. *Travel Med Infect Dis*. 2009 Mar;7(2):60–8.
17. Scheer F a. JL, Pirovano C, Van Someren EJW, Buijs RM. Environmental light and suprachiasmatic nucleus interact in the regulation of body temperature. *Neuroscience*. 2005;132(2):465–77.
18. Cronobiología humana Diego A. Golombek 2ª Edición [Internet]. booksmedicos. 2015 [cited 2017 Apr 14]. Available from: <http://booksmedicos.me/cronobiologia-humana-ritmos-y-relojes-biologicos-en-la-salud-y-en-la-enfermedad-2a-edicion/>
19. Fondo de Cultura Económica [Internet]. 2017 [cited 2017 Apr 14]. Available from: <http://www.fce.com.ar/ar/libros/detalles.aspx?IDL=6373>
20. Dunlap JC, Loros JJ, DeCoursey PJ. *Chronobiology: Biological Timekeeping*. First edition. Sinauer Associates, Inc.; 2009. 382 p.

21. Candolle AP de. *Physiologie végétale, ou Exposition des forces et des fonctions vitales des végétaux ..* [Internet]. Paris, Béchét jeune; 1832 [cited 2017 Apr 14]. 542 p. Available from: <http://archive.org/details/physiologievgta01candgoog>
22. Lucchesi P por L. Malhar de madrugada faz mal ou emagrece mais? [Internet]. [cited 2017 Apr 19]. Available from: <http://www.lpersonal.com.br/2015/07/malhar-de-madrugada-faz-mal-ou-emagrece.html>
23. Zee PC, Attarian H, Videnovic A. Circadian rhythm abnormalities. *Contin Minneap Minn.* 2013 Feb;19(1 Sleep Disorders):132–47.
24. Van den Pol AN. The hypothalamic suprachiasmatic nucleus of rat: intrinsic anatomy. *J Comp Neurol.* 1980 Jun 15;191(4):661–702.
25. Lydic R, Albers HE, Tepper B, Moore-Ede MC. Three-dimensional structure of the mammalian suprachiasmatic nuclei: a comparative study of five species. *J Comp Neurol.* 1982 Jan 20;204(3):225–37.
26. Lydic R, Schoene WC, Czeisler CA, Moore-Ede MC. Suprachiasmatic region of the human hypothalamus: homolog to the primate circadian pacemaker? *Sleep.* 1980;2(3):355–61.
27. van den Pol AN, Tsujimoto KL. Neurotransmitters of the hypothalamic suprachiasmatic nucleus: immunocytochemical analysis of 25 neuronal antigens. *Neuroscience.* 1985 Aug;15(4):1049–86.
28. 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.
29. 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.

30. Stephan FK, Nunez AA. Elimination of circadian rhythms in drinking, activity, sleep, and temperature by isolation of the suprachiasmatic nuclei. *Behav Biol.* 1977 May;20(1):1–61.
31. Albers HE, Ferris CF, Leeman SE, Goldman BD. Avian pancreatic polypeptide phase shifts hamster circadian rhythms when microinjected into the suprachiasmatic region. *Science.* 1984 Feb 24;223(4638):833–5.
32. Rusak B, Groos G. Suprachiasmatic stimulation phase shifts rodent circadian rhythms. *Science.* 1982 Mar 12;215(4538):1407–9.
33. Silver R, LeSauter J, Tresco PA, Lehman MN. A diffusible coupling signal from the transplanted suprachiasmatic nucleus controlling circadian locomotor rhythms. *Nature.* 1996 Aug 29;382(6594):810–3.
34. Welsh DK, Logothetis DE, Meister M, Reppert SM. Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron.* 1995 Apr;14(4):697–706.
35. Yamazaki S, Numano R, Abe M, Hida A, Takahashi R, Ueda M, et al. Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science.* 2000 Apr 28;288(5466):682–5.
36. Yamaguchi S, Isejima H, Matsuo T, Okura R, Yagita K, Kobayashi M, et al. Synchronization of cellular clocks in the suprachiasmatic nucleus. *Science.* 2003 Nov 21;302(5649):1408–12.
37. Ralph MR, Foster RG, Davis FC, Menaker M. Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science.* 1990 Feb 23;247(4945):975–8.
38. Guilding C, Hughes ATL, Brown TM, Namvar S, Piggins HD. A riot of rhythms: neuronal and glial circadian oscillators in the mediobasal hypothalamus. *Mol Brain.* 2009 Aug 27;2:28.
39. Klerman EB, Rimmer DW, Dijk DJ, Kronauer RE, Rizzo JF, Czeisler CA. Nonphotic entrainment of the human circadian pacemaker. *Am J Physiol.* 1998 Apr;274(4 Pt 2):R991–996.

40. Stephan FK. The “other” circadian system: food as a Zeitgeber. *J Biol Rhythms*. 2002 Aug;17(4):284–92.
41. Bass J, Takahashi JS. Circadian integration of metabolism and energetics. *Science*. 2010 Dec 3;330(6009):1349–54.
42. Shearman LP, Sriram S, Weaver DR, Maywood ES, Chaves I, Zheng B, et al. Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science*. 2000 May 12;288(5468):1013–9.
43. Robinson I, Reddy AB. Molecular mechanisms of the circadian clockwork in mammals. *FEBS Lett*. 2014 Aug 1;588(15):2477–83.
44. Hastings MH, Reddy AB, Maywood ES. A clockwork web: circadian timing in brain and periphery, in health and disease. *Nat Rev Neurosci*. 2003 Aug;4(8):649–61.
45. Moore RY. Organization and function of a central nervous system circadian oscillator: the suprachiasmatic hypothalamic nucleus. *Fed Proc*. 1983 Aug;42(11):2783–9.
46. King DP, Zhao Y, Sangoram AM, Wilsbacher LD, Tanaka M, Antoch MP, et al. Positional cloning of the mouse circadian clock gene. *Cell*. 1997 May 16;89(4):641–53.
47. Vitaterna MH, King DP, Chang AM, Kornhauser JM, Lowrey PL, McDonald JD, et al. Mutagenesis and mapping of a mouse gene, *Clock*, essential for circadian behavior. *Science*. 1994 Apr 29;264(5159):719–25.
48. Hogenesch JB, Chan WK, Jackiw VH, Brown RC, Gu YZ, Pray-Grant M, et al. Characterization of a subset of the basic-helix-loop-helix-PAS superfamily that interacts with components of the dioxin signaling pathway. *J Biol Chem*. 1997 Mar 28;272(13):8581–93.
49. Ikeda M, Nomura M. cDNA cloning and tissue-specific expression of a novel basic helix-loop-helix/PAS protein (BMAL1) and identification of alternatively spliced variants with alternative translation initiation site usage. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997 Apr 7;233(1):258–64.

50. Todo T, Ryo H, Yamamoto K, Toh H, Inui T, Ayaki H, et al. Similarity among the *Drosophila* (6-4)photolyase, a human photolyase homolog, and the DNA photolyase-blue-light photoreceptor family. *Science*. 1996 Apr 5;272(5258):109–12.
51. Kobayashi K, Kanno S, Smit B, van der Horst GT, Takao M, Yasui A. Characterization of photolyase/blue-light receptor homologs in mouse and human cells. *Nucleic Acids Res*. 1998 Nov 15;26(22):5086–92.
52. Konopka RJ, Benzer S. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1971 Sep;68(9):2112–6.
53. Miyajima N, Horiuchi R, Shibuya Y, Fukushige S, Matsubara K, Toyoshima K, et al. Two *erbA* homologs encoding proteins with different T3 binding capacities are transcribed from opposite DNA strands of the same genetic locus. *Cell*. 1989 Apr 7;57(1):31–9.
54. Lazar MA, Hodin RA, Darling DS, Chin WW. A novel member of the thyroid/steroid hormone receptor family is encoded by the opposite strand of the rat *c-erbA* alpha transcriptional unit. *Mol Cell Biol*. 1989 Mar;9(3):1128–36.
55. Dumas B, Harding HP, Choi HS, Lehmann KA, Chung M, Lazar MA, et al. A new orphan member of the nuclear hormone receptor superfamily closely related to Rev-Erb. *Mol Endocrinol Baltim Md*. 1994 Aug;8(8):996–1005.
56. Preitner N, Damiola F, Lopez-Molina L, Zakany J, Duboule D, Albrecht U, et al. The orphan nuclear receptor REV-ERBalpha controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell*. 2002 Jul 26;110(2):251–60.
57. Feng D, Liu T, Sun Z, Bugge A, Mullican SE, Alenghat T, et al. A circadian rhythm orchestrated by histone deacetylase 3 controls hepatic lipid metabolism. *Science*. 2011 Mar 11;331(6022):1315–9.
58. Sato TK, Panda S, Miraglia LJ, Reyes TM, Rudic RD, McNamara P, et al. A functional genomics strategy reveals *Rora* as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron*. 2004 Aug 19;43(4):527–37.

59. Akashi M, Takumi T. The orphan nuclear receptor ROR α regulates circadian transcription of the mammalian core-clock *Bmal1*. *Nat Struct Mol Biol*. 2005 May;12(5):441–8.
60. Guillaumond F, Dardente H, Giguère V, Cermakian N. Differential control of *Bmal1* circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors. *J Biol Rhythms*. 2005 Oct;20(5):391–403.
61. Lee H, Chen R, Lee Y, Yoo S, Lee C. Essential roles of CKI δ and CKI ϵ in the mammalian circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Dec 15;106(50):21359–64.
62. Price JL, Blau J, Rothenfluh A, Abodeely M, Kloss B, Young MW. double-time is a novel *Drosophila* clock gene that regulates PERIOD protein accumulation. *Cell*. 1998 Jul 10;94(1):83–95.
63. Kloss B, Price JL, Saez L, Blau J, Rothenfluh A, Wesley CS, et al. The *Drosophila* clock gene double-time encodes a protein closely related to human casein kinase Iepsilon. *Cell*. 1998 Jul 10;94(1):97–107.
64. Siepka SM, Yoo S-H, Park J, Song W, Kumar V, Hu Y, et al. Circadian mutant Overtime reveals F-box protein FBXL3 regulation of cryptochrome and period gene expression. *Cell*. 2007 Jun 1;129(5):1011–23.
65. Yoo S-H, Mohawk JA, Siepka SM, Shan Y, Huh SK, Hong H-K, et al. Competing E3 ubiquitin ligases govern circadian periodicity by degradation of CRY in nucleus and cytoplasm. *Cell*. 2013 Feb 28;152(5):1091–105.
66. Gallego M, Virshup DM. Post-translational modifications regulate the ticking of the circadian clock. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Feb;8(2):139–48.
67. Gerhart-Hines Z, Lazar MA. Circadian metabolism in the light of evolution. *Endocr Rev*. 2015 Jun;36(3):289–304.
68. Schmidt TM, Chen S-K, Hattar S. Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells: many subtypes, diverse functions. *Trends Neurosci*. 2011 Nov;34(11):572–80.

69. Hattar S, Lucas RJ, Mrosovsky N, Thompson S, Douglas RH, Hankins MW, et al. Melanopsin and rod-cone photoreceptive systems account for all major accessory visual functions in mice. *Nature*. 2003 Jul 3;424(6944):76–81.
70. Berson DM, Dunn FA, Takao M. Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science*. 2002 Feb 8;295(5557):1070–3.
71. Gooley JJ, Lu J, Chou TC, Scammell TE, Saper CB. Melanopsin in cells of origin of the retinohypothalamic tract. *Nat Neurosci*. 2001 Dec;4(12):1165.
72. Dacey DM, Liao H-W, Peterson BB, Robinson FR, Smith VC, Pokorny J, et al. Melanopsin-expressing ganglion cells in primate retina signal colour and irradiance and project to the LGN. *Nature*. 2005 Feb 17;433(7027):749–54.
73. Pu M. Physiological response properties of cat retinal ganglion cells projecting to suprachiasmatic nucleus. *J Biol Rhythms*. 2000 Feb;15(1):31–6.
74. Stehle JH, Saade A, Rawashdeh O, Ackermann K, Jilg A, Sebestény T, et al. A survey of molecular details in the human pineal gland in the light of phylogeny, structure, function and chronobiological diseases. *J Pineal Res*. 2011 Aug;51(1):17–43.
75. Roopin M, Levy O. Temporal and histological evaluation of melatonin patterns in a “basal” metazoan. *J Pineal Res*. 2012 Oct;53(3):259–69.
76. Reiter RJ. Melatonin: the chemical expression of darkness. *Mol Cell Endocrinol*. 1991 Aug;79(1–3):C153-158.
77. Pévet P. Melatonin: from seasonal to circadian signal. *J Neuroendocrinol*. 2003 Apr;15(4):422–6.
78. Hardeland R, Cardinali DP, Srinivasan V, Spence DW, Brown GM, Pandi-Perumal SR. Melatonin--a pleiotropic, orchestrating regulator molecule. *Prog Neurobiol*. 2011 Mar;93(3):350–84.

79. Tosini G, Baba K, Hwang CK, Iuvone PM. Melatonin: an underappreciated player in retinal physiology and pathophysiology. *Exp Eye Res.* 2012 Oct;103:82–9.
80. Malpaux B, Migaud M, Tricoire H, Chemineau P. Biology of mammalian photoperiodism and the critical role of the pineal gland and melatonin. *J Biol Rhythms.* 2001 Aug;16(4):336–47.
81. Circadian Rhythms - How To Let Go Of Stress & Anxiety [Internet]. [cited 2017 Apr 19]. Available from: http://avstim.com/Circadian_Rhythms.html
82. Torres-Farfan C, Valenzuela FJ, Mondaca M, Valenzuela GJ, Krause B, Herrera EA, et al. Evidence of a role for melatonin in fetal sheep physiology: direct actions of melatonin on fetal cerebral artery, brown adipose tissue and adrenal gland. *J Physiol.* 2008 Aug 15;586(16):4017–27.
83. Torres-Farfan C, Mendez N, Abarzua-Catalan L, Vilches N, Valenzuela GJ, Seron-Ferre M. A circadian clock entrained by melatonin is ticking in the rat fetal adrenal. *Endocrinology.* 2011 May;152(5):1891–900.
84. Messenger S, Garabette ML, Hastings MH, Hazlerigg DG. Tissue-specific abolition of *Per1* expression in the pars tuberalis by pinealectomy in the Syrian hamster. *Neuroreport.* 2001 Mar 5;12(3):579–82.
85. Uz T, Akhisaroglu M, Ahmed R, Manev H. The pineal gland is critical for circadian *Period1* expression in the striatum and for circadian cocaine sensitization in mice. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol.* 2003 Dec;28(12):2117–23.
86. Prendergast BJ, Cable EJ, Patel PN, Pyter LM, Onishi KG, Stevenson TJ, et al. Impaired leukocyte trafficking and skin inflammatory responses in hamsters lacking a functional circadian system. *Brain Behav Immun.* 2013 Aug;32:94–104.

87. Agez L, Laurent V, Pévet P, Masson-Pévet M, Gauer F. Melatonin affects nuclear orphan receptors mRNA in the rat suprachiasmatic nuclei. *Neuroscience*. 2007 Jan 19;144(2):522–30.
88. Ulrich-Lai YM, Herman JP. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat Rev Neurosci*. 2009 Jun;10(6):397–409.
89. Kalsbeek A, van Heerikhuijze JJ, Wortel J, Buijs RM. A diurnal rhythm of stimulatory input to the hypothalamo-pituitary-adrenal system as revealed by timed intrahypothalamic administration of the vasopressin V1 antagonist. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 1996 Sep 1;16(17):5555–65.
90. Tousson E, Meissl H. Suprachiasmatic nuclei grafts restore the circadian rhythm in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2004 Mar 24;24(12):2983–8.
91. Owens MJ, Bartolome J, Schanberg SM, Nemeroff CB. Corticotropin-releasing factor concentrations exhibit an apparent diurnal rhythm in hypothalamic and extrahypothalamic brain regions: differential sensitivity to corticosterone. *Neuroendocrinology*. 1990 Dec;52(6):626–31.
92. Girotti M, Weinberg MS, Spencer RL. Diurnal expression of functional and clock-related genes throughout the rat HPA axis: system-wide shifts in response to a restricted feeding schedule. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009 Apr;296(4):E888–897.
93. Cascio CS, Shinsako J, Dallman MF. The suprachiasmatic nuclei stimulate evening ACTH secretion in the rat. *Brain Res*. 1987 Oct 13;423(1–2):173–8.
94. Buijs RM, Wortel J, Van Heerikhuijze JJ, Feenstra MG, Ter Horst GJ, Romijn HJ, et al. Anatomical and functional demonstration of a multisynaptic suprachiasmatic nucleus adrenal (cortex) pathway. *Eur J Neurosci*. 1999 May;11(5):1535–44.
95. Bedrosian TA, Nelson RJ. Influence of the modern light environment on mood. *Mol Psychiatry*. 2013 Jul;18(7):751–7.

96. Garaulet M, Ordovás JM, Madrid JA. The chronobiology, etiology and pathophysiology of obesity. *Int J Obes* 2005. 2010 Dec;34(12):1667–83.
97. Saper CB, Lu J, Chou TC, Gooley J. The hypothalamic integrator for circadian rhythms. *Trends Neurosci*. 2005 Mar;28(3):152–7.
98. Bray MS, Young ME. Circadian rhythms in the development of obesity: potential role for the circadian clock within the adipocyte. *Obes Rev Off J Int Assoc Study Obes*. 2007 Mar;8(2):169–81.
99. Shostak A, Meyer-Kovac J, Oster H. Circadian regulation of lipid mobilization in white adipose tissues. *Diabetes*. 2013 Jul;62(7):2195–203.
100. Sukumaran S, Xue B, Jusko WJ, Dubois DC, Almon RR. Circadian variations in gene expression in rat abdominal adipose tissue and relationship to physiology. *Physiol Genomics*. 2010 Oct;42A(2):141–52.
101. Dallmann R, Viola AU, Tarokh L, Cajochen C, Brown SA. The human circadian metabolome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Feb 14;109(7):2625–9.
102. Fukagawa K, Gou HM, Wolf R, Tso P. Circadian rhythm of serum and lymph apolipoprotein AIV in ad libitum-fed and fasted rats. *Am J Physiol*. 1994 Nov;267(5 Pt 2):R1385-1390.
103. Cho H, Zhao X, Hatori M, Yu RT, Barish GD, Lam MT, et al. Regulation of circadian behaviour and metabolism by REV-ERB- α and REV-ERB- β . *Nature*. 2012 Mar 29;485(7396):123–7.
104. Bugge A, Feng D, Everett LJ, Briggs ER, Mullican SE, Wang F, et al. Rev-erba and Rev-erb β coordinately protect the circadian clock and normal metabolic function. *Genes Dev*. 2012 Apr 1;26(7):657–67.
105. GBD 2015 Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of

death, 1980-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet Lond Engl*. 2016 Oct 8;388(10053):1459–544.

106. Vigo D, Thornicroft G, Atun R. Estimating the true global burden of mental illness. *Lancet Psychiatry*. 2016 Feb 1;3(2):171–8.

***Carta de aprovação do projeto pela CEUA/HCPA referente ao Experimento 1
(ANEXO I)***



**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: 130175

Data da Versão do Projeto: 29/09/2013

Pesquisadores:

MARIA PAZ LOAYZA HIDALGO

CAROLINE LUÍSA QUILES

Título: AVALIAÇÃO DO EFEITO DO FOTOPERÍODO NOS ESTADOS TIPO DEPRESSIVOS EM RATOS

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, 08 de outubro de 2013.

Dr. Alessandro Osvaldt
Coordenador CEUA/HCPA

*Carta de aprovação do projeto pela CEUA/HCPA referente ao Experimento 2
(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: 150059

Data da Versão do Projeto: 10/06/2015

Pesquisadores:

MARIA PAZ LOAYZA HIDALGO

MELISSA ALVES BRAGA DE OLIVEIRA


CAROLINE LUÍSA QUILES

Título: AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ILUMINAÇÃO COM RITMICIDADE CIRCADIANA NOS RITMOS BIOLÓGICOS EM RATOS WISTAR

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, 25 de junho de 2015.


Biol. Michael Everton Andrades
Coordenador CEUA/HCPA

Abstracts em anais de eventos, apresentações e premiações (ANEXO III)

Pôster: 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.

Pôster: 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.

Pôster: Tonon AC, Quiles CL, de Oliveira MAB, Beauvalet JC, Hidalgo MPL. 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.

Apresentação oral: Tonon AC, Quiles CL, de Oliveira MAB, Beauvalet JC, Hidalgo MPL. Avaliação do Efeito da Iluminação nos Ritmos Biológicos de Ratos Wistar. XXVIII Salão de Iniciação Científica da UFRGS, Porto Alegre, RS, 2016.

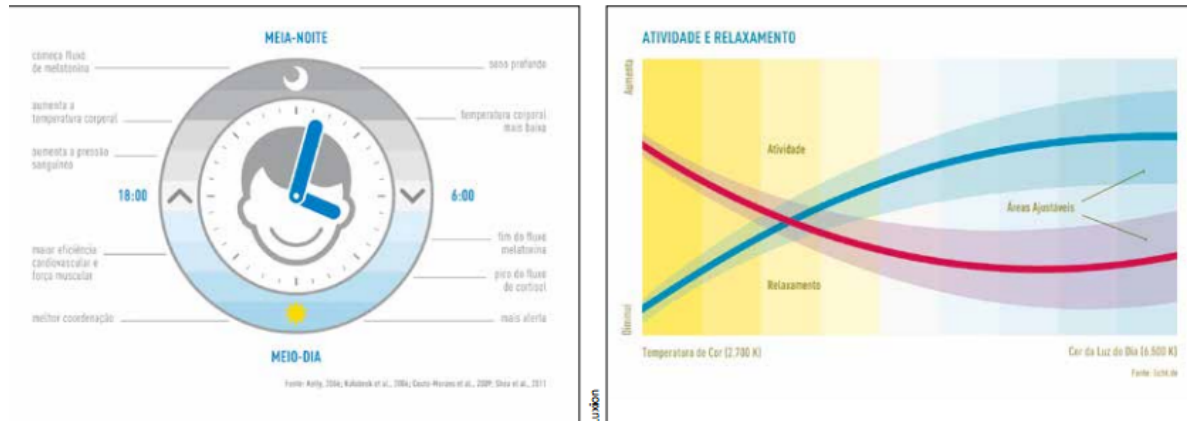
Premiação: Destaque na sessão Psiquiatria II do XXVII Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2016.

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

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

Notícia em revista (ANEXO IV)

Revista L+D. Editora Lumière. 2016



¿QUÉ PASA?

CONFORTO CIRCADIANO

Parece difícil imaginar como seria a vida humana nos dias de hoje sem a invenção da energia elétrica, que nos possibilitou aproveitar a iluminação artificial para prolongar nossas horas de produtividade, dentre muitos outros aparentes benefícios. No entanto, é igualmente importante observar e entender efeitos biológicos e fisiológicos causados por esse tipo de luz.

Pensando nos efeitos cronobiológicos que a luz tem sobre o corpo humano e inspirados em proporcionar bem-estar e qualidade de vida àqueles expostos durante longas horas à iluminação artificial todos os dias, o fabricante brasileiro Luxion acaba de lançar a linha de luminárias Cicluz, projetada e produzida pela empresa para utilizar a inteligência circadiana, ou seja, variações na temperatura de cor da luz conforme o horário, mimetizando o comportamento da iluminação natural.

Visando comprovar os benefícios de uma luz dinâmica sobre o organismo humano, a empresa foi uma das patrocinadoras de uma pesquisa desenvolvida pelo Laboratório de Cronobiologia e Sono do Hospital das Clínicas de Porto Alegre (HCPA) - ligado à Faculdade de Medicina (Famed) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) -, conduzida pela mestranda Caroline Luísa Quiles, sob orientação da professora doutora Maria Paz Hidalgo.

O experimento testou a resposta biológica de ratos de laboratório à exposição a dois tipos diferentes de luz: uma lâmpada de LED com espectro fixo, de 4.000K, e outra com espectro variável, cujas alterações na temperatura de cor foram programadas em um ciclo que leva seis horas para ir dos 2.700K aos 6.500K e mais dez horas para a troca gradual de 6.500K a 2.700K novamente. Ambos os grupos ficaram

expostos, por 108 dias consecutivos, desde o nascimento, a dezesseis horas de luz e a oito horas de escuridão.

Dados preliminares já obtidos surpreenderam as pesquisadoras, que não esperavam tantas alterações fisiológicas como consequência do teste. A exposição à luz fixa gerou tanto alterações metabólicas (ocasionando maior presença de gordura visceral no grupo de animais a ela exposto) quanto mudanças no tamanho de órgãos, como o cérebro, que apresentou tamanho reduzido em comparação aos ratos expostos à luz dinâmica.

O grupo de pesquisa ainda está buscando respostas que esclareçam o motivo específico dessas alterações ou o que exatamente elas representam. No entanto, é possível afirmar que, além da já conhecida interferência da iluminação artificial sobre o chamado relógio biológico, ela também pode afetar nosso organismo e induzir ao surgimento de doenças como obesidade, depressão e problemas cardiovasculares, cuja ligação com a iluminação artificial era, até então, desconhecida.

O próximo passo da pesquisa será estudar aplicações da iluminação circadiana em ambientes de maternidades, a fim de auxiliar na aceleração do crescimento e do desenvolvimento de neonatos, e em Unidades de Tratamento Intensivo, nas quais poderia contribuir com a orientação temporal dos pacientes.

As possibilidades podem ir além dos ambientes relacionados à saúde, como prevê Fernanda Tissot, da Luxion, "pode haver também aceitação muito grande em ambientes de escritórios, nos quais ficamos às vezes até 12 horas seguidas sob luz artificial, sem janelas e sem noção de tempo e espaço". (Por Débora Torii)