

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

CAROLINE LUÍSA QUILES

A INFLUÊNCIA DO CICLO CLARO/ESCURO NOS RITMOS BIOLÓGICOS

PORTO ALEGRE

MAIO/2015

CAROLINE LUÍSA QUILES

A INFLUÊNCIA DO CICLO CLARO/ESCURO NOS RITMOS BIOLÓGICOS

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Paz Loayza Hidalgo

Coorientadora: Luísa Klaus Pilz

PORTO ALEGRE

MAIO/2015

“Estou entre aqueles que pensam que a ciência tem grande beleza. Um cientista em seu laboratório não é apenas um técnico: é também uma criança colocada diante de fenômenos naturais que podem impressioná-la como um conto de fadas.”

Marrie Currie

Primeira mulher a receber um Prêmio Nobel.

Agradecimentos

À minha orientadora, Prof^a Maria Paz Loayza Hidalgo, que agradeço não somente pelo apoio durante a execução deste trabalho, mas também por ter me mostrado o caminho da ciência ao longo dos anos de Iniciação Científica, e ter se tornado um modelo de pesquisadora e pessoa ao qual me espelho.

Aos queridos colegas com que tive o prazer de conviver e aprender no Laboratório de Cronobiologia, em especial à Melissa, André e minha coorientadora Luísa, imprescindíveis coautores deste trabalho.

À minha mãe, Vânia, por todo 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 grande apoio mesmo nos momentos mais diversos, sempre visando minha realização e felicidade.

Ao meu irmão Wagner e toda minha grande família, aos que já foram e aos que estão sempre torcendo por mim.

E por fim, ao meu namorado Marcos Vinícios, pelo incentivo constante, pela confiança, pela compreensão nos momentos em que estive ausente, e acima de tudo pelo amor.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

1. RESUMO	5
2. INTRODUÇÃO	7
Cronobiologia e os Ritmos Biológicos	7
Melatonina: O Hormônio do Escuro	10
Os Ritmos Biológicos no Processo Saúde - Doença	11
3. OBJETIVOS	14
Objetivo Geral	14
Objetivos Específicos	14
4. TRABALHO EXPERIMENTAL NA FORMA DE ARTIGO CIENTÍFICO	15
Abstract	16
1. Introduction	17
2. Materials and Methods	19
3. Results	23
4. Discussion	29
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	35
6. REFERÊNCIAS ADICIONAIS	36
ANEXO 1	40

1. RESUMO

Uma grande quantidade de modelos experimentais de variações no fotoperíodo vem sendo proposto. No entanto, muitos deles impedem uma boa comparação do que realmente acontece na Terra. Deste modo, o nosso objetivo foi avaliar a influência do ciclo claro/escuro nos ritmos biológicos de atividade, temperatura, concentração de melatonina e corticosterona em uma linhagem de rato usual.

O experimento foi realizado com 20 ratos Wistar machos adultos, randomizados nos seguintes grupos: Controle (CT), que foi mantido em um ciclo claro/escuro de 12:12 ao longo de todo o experimento; grupo Fotoperíodo Longo/ Fotoperíodo Curto (LP/SP), que passou por 18 dias com mais exposição ao claro (claro/escuro 16,5:7,5) em seguida, entrou na fase B, com 17 dias de reduções diárias graduais do tempo de exposição ao claro, que no 17º dia da fase teve o ciclo completamente convertido para menor exposição ao claro (claro/escuro 7,5:16,5), que foi mantido durante mais 18 dias (fase C); e o grupo Fotoperíodo Curto/Fotoperíodo Longo (SP/LP), que passou pelas mesmas modificações que o grupo LP/SP, porém em ordem inversa.

Os animais tiveram suas atividade e temperatura monitoradas durante todo o estudo, e após as fases A e C, amostras de sangue foram coletadas para análise de melatonina e corticosterona. Nossos resultados mostraram que a acrofase da atividade e da temperatura de todos os grupos se mantiveram no meio do período escuro, de acordo com o fotoperíodo das diferentes fases. O grupo LP/SP apresentou uma diminuição na amplitude da atividade da fase A para a C ($p < 0.05$), já o grupo SP/LP mostrou menor amplitude da atividade nas fases A ($p < 0.01$) e B ($p = 0.01$) quando comparado com outros grupos. Ainda, o grupo SP/LP apresentou uma diminuição na amplitude da temperatura em todas as fases ($p < 0.01$). Sobre a concentração de melatonina, o grupo LP/SP mostrou uma correlação positiva significativa

entre as fases A e C ($r^2 = 0,707$; $p = 0,018$). O grupo SP/LP apresentou menor concentração de corticosterona na fase C quando comparado com o próprio grupo na fase A ($p < 0.05$) e com o grupo LP/SP na fase C ($p < 0.05$).

Tendo em vista os resultados apresentados, podemos concluir que ratos Wistar mudam a fase de atividade e temperatura de acordo com o fotoperíodo e há indícios de uma maior facilidade de adaptação do deste modelo quando ocorre uma transição de um fotoperíodo longo para um curto.

2. INTRODUÇÃO

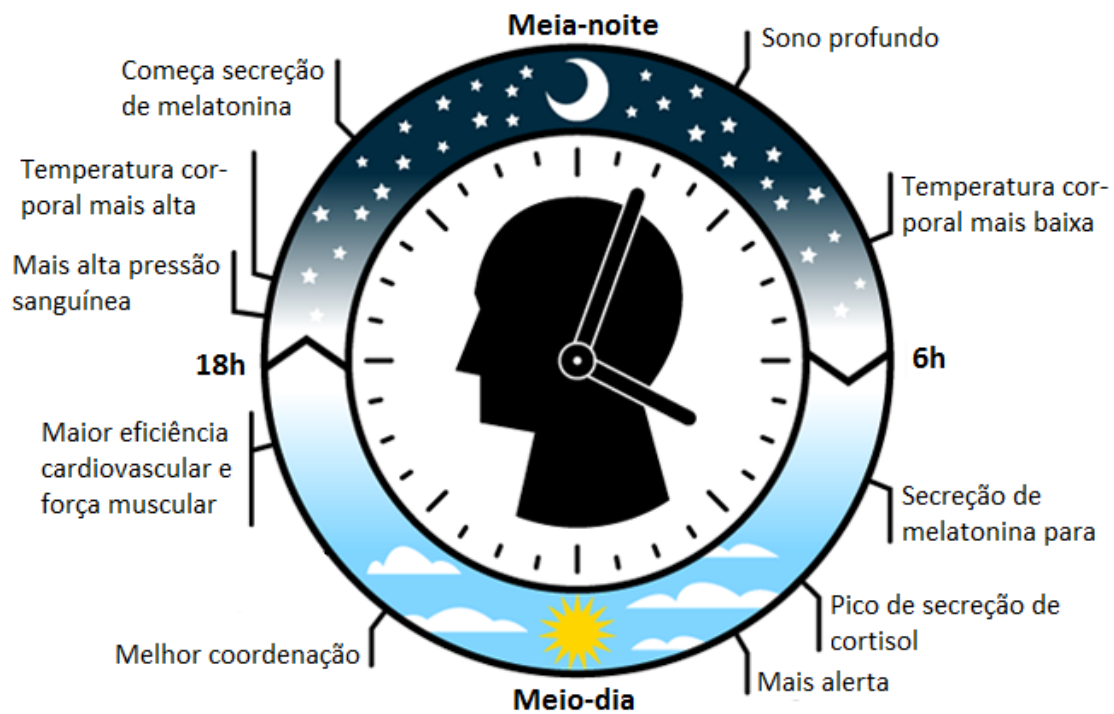
Cronobiologia e os Ritmos Biológicos

A presença de ritmos nos organismos é um fenômeno tão cotidiano que quase não havia chamado a atenção dos cientistas, relativamente só até bem pouco tempo. Vendo os ritmos biológicos 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, fundamental para a sobrevivência das espécies. Deste modo, praticamente todos os seres vivos desenvolveram mecanismos para organizarem-se temporalmente (Noguera et al., 1999).

O primeiro experimento cronobiológico conhecido foi realizado em 1729 pelo astrônomo francês Jacque d'Ortous DeMarian, que notou que uma planta sensível de seu jardim (*mimosa pudica*) abria suas folhas durante o dia e as fechava durante a noite. Ele manteve a planta em um armário escuro, e para sua surpresa, a planta continuou abrindo e fechando suas folhas com o mesmo ciclo que apresentava no ambiente externo (Golombeck, 2007; Gruart et al., 2002). Pela primeira vez se demonstrou que os ritmos circadianos eram capazes de se manter mesmo na ausência de sinais temporais do ambiente (Dunlap et al., 2004).

Os animais, as plantas e provavelmente todos os organismos vivos mostram variações rítmicas em sua fisiologia (taxa metabólica, produção de calor, floração, etc.) que tendem a associar-se com os ciclos ambientais. Os ritmos biológicos dão capacidade aos organismos de estimar o tempo, e assim se antecipar e se preparar para as demandas que surgem das mudanças ambientais cíclicas necessárias para sua sobrevivência (Gruart et al., 2002; Dunlap et al., 2004). Entre os diferentes ritmos biológicos, os mais estudados e mais frequentes nos organismos vivos são os ritmos circadianos (*circa* = cerca de; *diem* = dia), que se ajustam às

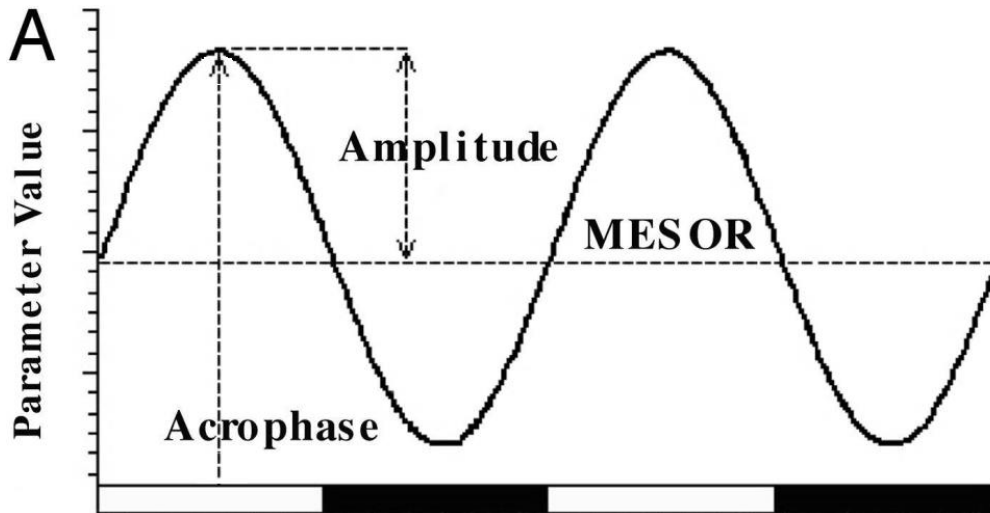
variações cíclicas do dia e da noite (Gruart et al., 2002). Abaixo, podemos ver alguns fenômenos fisiológicos que tem “hora marcada” para acontecer em um indivíduo saudável (Kelly, 2006; Kalsbeek et al., 2006; Couto-Moraes et al., 2009; Shea et al., 2011).



(Figura adaptada de: <http://gladstoneinstitutes.org/node/11312>)

Para melhor compreender os estudos envolvendo ritmos, é necessário dominar determinadas técnicas analíticas, incluindo técnicas matemáticas e estatísticas. Uma das mais utilizadas é o método do Cosinor, que ajusta os dados em uma função sinusoidal e representa os dados graficamente. Com ele, obtêm-se o Mesor (*mean estimate statistic over rhythm*), Acrofase (fase mais alta) e Amplitude (diferença entre o valor máximo e o Mesor) que são variáveis bastante relevantes ao avaliar as alterações dos ritmos biológicos. Muitos estudos dos ritmos biológicos utilizam o Mesor, a Acrofase e a Amplitude para caracterizar o estado

fisiológico do indivíduo e o quanto as interferências exógenas ou endógenas são capazes de modificar essas variáveis. (Noguera et al., 1999).



(Adaptado de Huitron-Resendiz et al., 2007).

A organização temporal rítmica das funções orgânicas faz com que cada atividade se desenvolva em horas determinadas, fato que origina uma sucessão de acontecimentos rigorosamente controlada pelo Núcleo Supraquiasmático (SCN), que é o marca-passo mestre no cérebro dos mamíferos, e uma projeção retino hipotalâmica que encerra no SCN é a via visual primária que serve de sincronizador dos ritmos circadianos através da estimulação da produção de melatonina (Moore, 1983). Em animais superiores, a melatonina é o produto de secreção da glândula pineal, que está sob o controle do núcleo paraventricular do hipotálamo (Kappers, 1960; Reiter, 1991a). A ativação e desativação da complexa via neural que controla a síntese de melatonina na pineal está sob o regimento preciso do SCN.

Além disso, oscilações circadianas também ocorrem em órgãos isolados, e o SCN consegue arrastar a periferia. Tais relações hierárquicas não são as únicas possíveis: dois ou mais osciladores podem se combinar a fim de assumir o mesmo período sem que nenhum ser dominante sobre o outro(s) (Roenneberg et al., 2003).

Melatonina: O Hormônio do Escuro

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é uma molécula produzida por diversos animais e plantas (Stehle et al., 2011; Roopin et al., 2012). Quimicamente, é uma indolamina sintetizada a partir do triptofano, que por ser anfifílica, pode atingir todos os tecidos, podendo até mesmo atravessar a barreira placentária e a barreira hematoencefálica. Em consequência, a melatonina não é armazenada, sendo imediatamente liberada dentro dos capilares sanguíneos logo após a sua formação.

A produção de melatonina 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, noturnos, ou espécies crepuscular), sendo assim, a melatonina pode ser considerada a expressão química da escuridão (Reiter, 1991b).

Além disso, a alta produção é mantida durante a fase escura do ciclo claro/escuro, desde que não haja luz no ambiente, já que a luz durante a noite bloqueia a produção de melatonina (Brainard et al., 1983; Shalin et al., 2013). Estas particularidades funcionais do sistema dos mamíferos que controlam a produção de melatonina na glândula pineal garantem que o relógio circadiano desencadeie a produção diária de melatonina durante a noite, e que iluminação ambiental junto ao relógio determine a duração do episódio diário de síntese de melatonina (Wehr, 1991; Perreau-Lenz et al., 2005).

Por outro lado, com o advento da utilização da luz artificial pelos seres humanos, nos tornamos capazes de modificar o tamanho do dia e da noite, e em casos muito comuns, a noite simplesmente deixou de existir, em função do excesso de aparelhos emissores de luz artificial tanto em ambientes fechados como no ambiente externo. Este fenômeno, chamado

de “Light Pollution”, vem chamando a atenção de pesquisadores por ser um possível agente desencadeante de alterações nos ritmos biológicos. (Kantermann et al., 2009).

Ainda, em ambientes de conglomerados urbanos, na maioria das vezes não há uma preocupação com as implicações que as construções sem possibilidade de contato com a luz natural e uso exclusivo de iluminação artificial podem gerar no processo saúde – doença. Atualmente o ser humano se encontra em luz artificial constante, e se a falta do escuro prejudica a liberação de melatonina, a falta de luz natural pode influenciar a correta secreção de cortisol, podendo gerar alterações na homeostasia do organismo, afetando sistema imune, bem como comportamento (Harb et al., 2015).

Os Ritmos Biológicos no Processo Saúde - Doença

Ao transmitir à todo organismo seu sinal de tempo, o SQN mantém sincronizadas todas as funções e a conduta para que oscilem com uma ordem que obedecem às flutuações externas do dia e da noite (Klerman et al., 1998; Stephan, 2002). Com ele se mantém uma ordem temporal interna, que permite o bom funcionamento do corpo. 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, como uma adaptação instantânea do organismo. Um exemplo disso são as longas viagens transmeridionais, em que observamos que a primeira variável a sofrer alterações para suprir as necessidades fisiológicas e energéticas do ser humano é o ritmo atividade/repouso (Auger et al., 2009). Por outro lado, o ritmo de temperatura corporal é considerado um dos ritmos mais robustos do organismo, pois tem maior resistência para se adaptar ao meio e indica, quando modificado, que a

intervenção sofrida causou um forte impacto fisiológico no indivíduo, podendo ser relacionado à uma condição de doença (Scheer et al., 2005).

De um ponto de vista cronobiológico, o estado de normalidade (saúde) se define como a correta relação de fases tanto entre os ritmos do próprio organismo como entre estes e o ciclo ambiental (Gruart, 2002). Em condições normais de sincronização com o ciclo claro/escuro, cada ritmo circadiano do organismo assume uma relação de fase estável com o sinal de tempo externo e as diversas variáveis fisiológicas mantêm entre si uma relação de fase estável.

Por outro lado, alterações no ambiente também podem modificar os ritmos biológicos, propiciando situações de doença. Um bom exemplo é a alta ocorrência de comportamento tipo depressivo relacionado às mudanças de fotoperíodo, conhecido como Depressão do tipo Sazonal, que se torna mais leve ou severa dependendo da duração do dia ao longo do ano, que costuma ser mais curto no inverno de países do norte Europeu e Americano; a mais comum, chamada “Depressão de Inverno”, atinge por volta de 10% da população de regiões de clima temperado (Hasler et al., 2010).

A dessincronização circadiana, ou seja, a desregulação de fases entre dois diferentes ritmos biológicos, também está envolvida no surgimento e agravamento de quadros depressivos. Estudos indicam que uma maior diferença da amplitude entre o meio do sono (midsleep) e a temperatura mínima corporal, causada por dessincronização circadiana, está associada a uma depressão mais severa (Hasler et al., 2010). Existem evidências de que alterações na atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), que são provocadas por eventos estressantes (gerando elevação dos níveis de cortisol), coexistem com transtornos depressivos e que a normalização da atividade do eixo HPA ocorre quando a terapia com antidepressivos em pacientes deprimidos é bem sucedida (Barden, 2004). Além disso, o eixo

HPA também modula várias funções do organismo, inclusive o eixo imuno-pineal (Couto-Moraes et al., 2009).

Alguns estudos relatam uma grande influência do SCN em problemas relacionados a transtornos de humor, já que células ganglionares da retina intrinsecamente fotossensíveis que medeiam a entrada fotótica para o Núcleo Supraquiasmático fazem projeções para áreas importantes na regulação do humor, como habênula lateral, amígdala medial e substância cinzenta periaquedutal (McCarthy, 2012; McClung, 2011). Além disso, a existência de sinapse entre neurônios do SCN e o núcleo talâmico paraventricular da amígdala indicam a importância desses em transportar para o sistema límbico as informações do relógio biológico (Peng, 2004).

Deste modo, em função o grande aumento de pacientes com transtorno depressivo e sua conhecida associação com modificações nos ritmos biológicos e ambientais (Wirz-Justice, 2008), temos interesse em verificar se existe influência do fotoperíodo em diferentes ritmos: nos ritmos de atividade e repouso, por sua grande adaptabilidade ao ambiente; de temperatura corporal, por de maneira inversa à atividade, ter um perfil mais robusto; de melatonina, por ser o principal responsável pela sinalização da informação temporal ao organismo; e de cortisol (no caso, corticosterona, por se tratar de um modelo com ratos), por ser considerado um marcador fisiológico de estresse.

3. OBJETIVOS

Objetivo Geral

- Avaliar o efeito do fotoperíodo nos ritmos biológicos em ratos da linhagem Wistar.

Objetivos Específicos

- Caracterizar o ritmo de atividade e repouso bem com o de temperatura central e o acoplamento de ambos nas situações de fotoperíodo curto e longo.
- Avaliar a influência do fotoperíodo na concentração de Melatonina e Corticosterona sérica.

4. TRABALHO EXPERIMENTAL NA FORMA DE ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo em preparação a ser submetido para o periódico:

Journal of Neuroscience Methods

THE INFLUENCE OF THE LIGHT/DARK CYCLE IN BIOLOGICAL RHYTHMS

Caroline Luísa Quiles^a, Melissa Alves Braga de Oliveira^a, André Comiran Tonon^a,

Luísa Klaus Pilz^{a, b, 1, *}, Maria Paz Loayza Hidalgo^{a, b, 1}

^a Laboratório de Cronobiologia Hospital de Clínicas de Porto Alegre - HCPA/Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, Brasil.

^b Programa de Pós-Graduação em Medicina, Psiquiatria. Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, Brasil.

¹ Equal contribution.

* Corresponding author at: Laboratório de Cronobiologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Ramiro Barcelos, 2350 sala 2201A, 90035-903, Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 51 33597743. E-mail address: luisakp@gmail.com.

Key Words

Chronobiology, Light, Temperature, Activity, Animal Model

Abstract

Background: A substantial amount of experimental models of photoperiods have been proposed, but many of them do not represent a good comparison of what occurs in real life. Accordingly, our objective was to evaluate the influence of the light/dark cycle on biological rhythms in rats.

Methods: Twenty adult male Wistar rats were assigned to one of the following groups: the CT group, in which rats were kept in a 12:12 LD cycle throughout the experiment; the LP/SP group, in which rats experienced longer exposure to light for 18 days (16.5:7.5 LD cycle) and then entered into phase B with 17 days of gradual reductions in light time; on the 17th day, the cycle was completely modified to a shorter exposure (7.5:16.5 LD cycle) and the rats were kept for 18 more days (phase C); and the SP/LP group, in which rats experienced the same modifications as the LP/SP group, but in the reverse order.

Results: Activity and temperature acrophase of all of the groups changed according to light and remained in the middle of the dark period. A short photoperiod showed a lower activity amplitude compared to other groups ($p < 0.01$). With regard to the melatonin concentration, the LP/SP group showed a significant positive correlation ($r^2 = 0.707$; $p = 0.018$). The short photoperiod demonstrated the lowest corticosteroid concentration ($p < 0.05$).

Conclusions: Wistar rats changed temperature and activity according to the photoperiod and demonstrated greater adaptability in transitioning from the long to the short photoperiod.

1. 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 were capable to avoid 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 and Tokura, 1998). Currently, a considerable amount of people spend most of their time indoors and are barely exposed to natural light.

The indoor environment presents a different quality of light compared with outside areas. The values of the light intensity outside during the day range from approximately 10000 lx to 100000 lx depending on the weather. Indoors, the medium value is 200 lx. This modern lifestyle is something new in the course of human evolution (Morita and Tokura, 1998). As this is a recent phenomenon, the 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 photoperiod changes have been proposed, with the objective of evaluating biological and behavioral disorders (e.g., breast cancer, depression-like behavior, seasonal affective disorder, bipolar disorder) that are related to seasonal changes in daylight (Becker et al., 2010; Otsuka et al., 2014; Workman et al., 2011; Blask et al., 2011). However, many models use extreme photoperiod variation (e.g., LD: 22/2 or LD: 5/19) and abrupt changes in the photoperiod, unlike the conditions that occur throughout the

year (Becker et al., 2010; Workman et al., 2011; Krivisky et al., 2012; Ashkenazy et al., 2009). Additionally, some of these protocols employ genetically modified animals or isogenic strains, hampering a good comparison with the natural changes of the Earth (Becker et al., 2010; Otsuka et al., 2014). For all of these reasons, our aim was to test the influence of a light/dark cycle similar to a biological rhythm using a model that more closely resembles real life.

2. Materials and Methods

2.1. *Animals*

Twenty adult (60 days, weighing 250-300 g) 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 light/dark (LD) cycle, free access to chow [Nuvilab CR1] and water). Animals were relocated to individual acrylic cages (20 x 23 x 23 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). 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).

2.2. *Intervention*

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

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 for 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 passed through 18 days of phase A with a longer exposure to light (16.5:7.5 LD cycle) and

then entered phase B with 17 days of time of light time reductions (30 minutes a day in the beginning of the light cycle) 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 more 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 (phase B) to 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, as in phase C (**Fig. 1**).

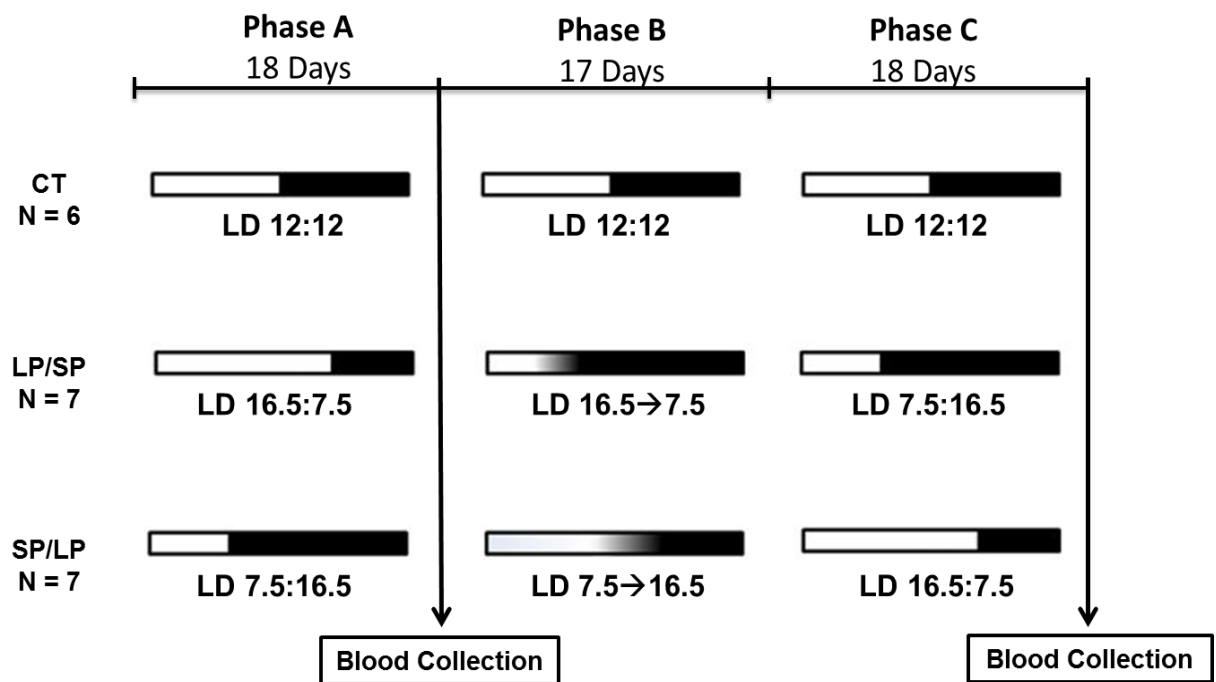


Fig. 1. Flowchart of the Study Design. CT: Control; LP/SP: Long Photoperiod/Short Photoperiod; SP/LP: Short Photoperiod/Long Photoperiod.

2.3. Rhythm Characterization

The rhythm characterization was performed according a previous study of the group (Quiles et al., 2014).

2.3.1. Activity

Activity was recorded every 10 min throughout the experiment in home cages equipped with actigraphs (Actigraph, ADNplin- ©Antoni Díez Noguera, 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. Finally, data from all of the activities during the experiment were analyzed using Microsoft Excel 2010.

2.3.2. Temperature

Temperature was recorded using ThermoChron iButtons (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. iButtons recorded data every 45 min and were removed at the end of the experiment after euthanasia by transcardiac perfusion.

2.4. Melatonin and Corticosterone Analysis

After the last day of phase A and phase C, venipuncture was performed through the retro orbital in the 2nd hour after the lights were turned off in each group. Animals were anesthetized with isoflurane (5% induction and 2-3% maintaining), 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 by pg/mL.

2.4. Analysis of the Chronobiological Parameters

In the graphic analysis, we created Actograms. In the temporal series analysis, we used the Cosinor measure, and to assess differences in acrophase, we used the Rayleigh test. All of the analyses of chronobiological parameters were performed using the EL Temps (©Antoni Díez Noguera, Barcelona, CA, Spain).

2.5. Statistical Analysis

The results are expressed as the group means \pm SEM, and differences between the groups were calculated using Student's t-test and 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).

3. Results

To understand the effects of photoperiod modifications, we evaluated the entrainment of activity and temperature rhythms on the light/dark cycles. As shown in **Fig. 2**, the activity and temperature rhythms shifted according to light modifications.

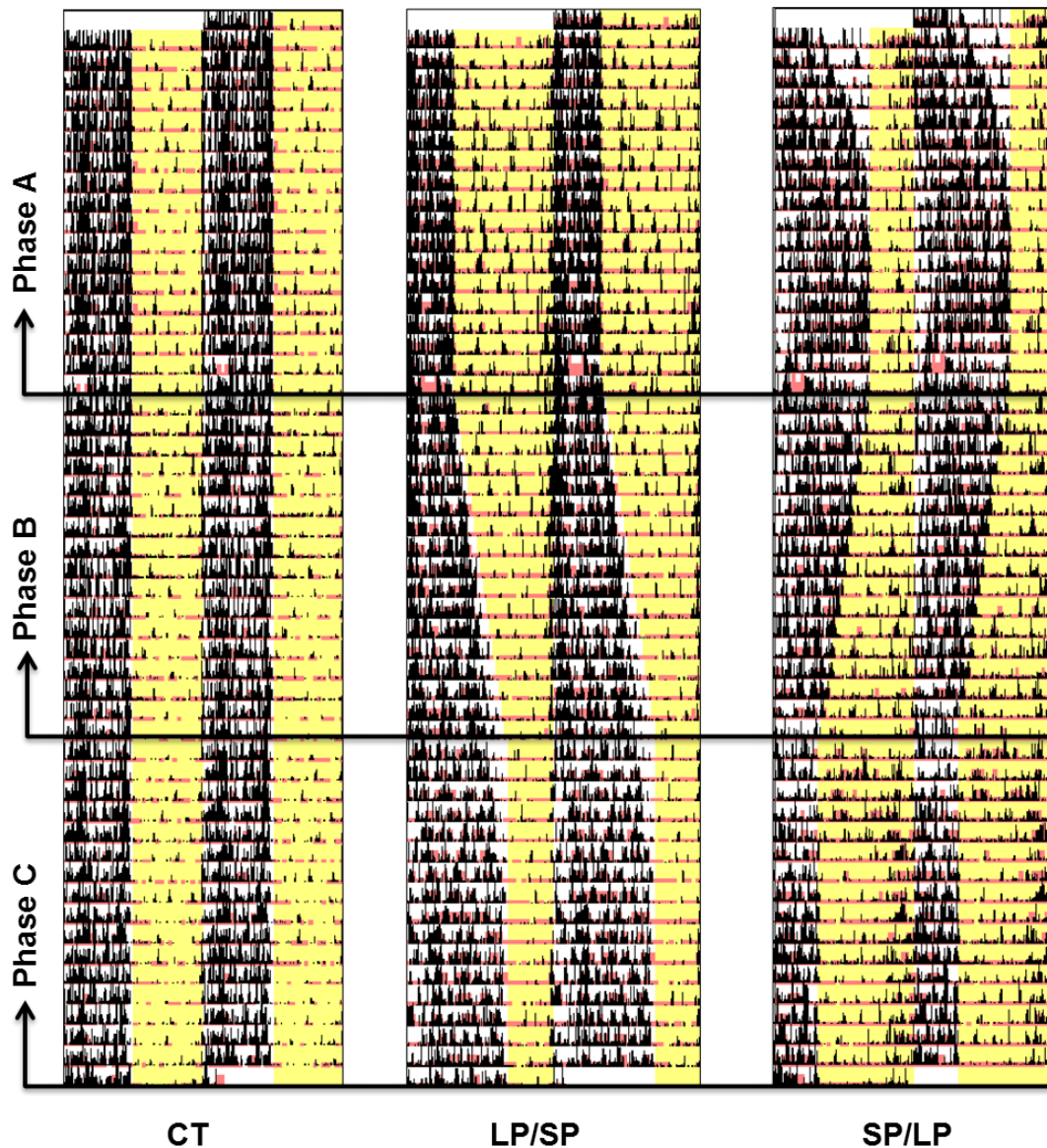


Fig. 2. Changes in activity and temperature according to the photoperiod. Representative double-plot actograms from each group illustrating daily changes in rest/activity (black) and the core body temperature (red) during the entire experiment. Lights-on periods are presented in yellow. The pattern shows 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.

The activity and temperature acrophasis of all of the groups changed according to light and remained in the middle of the dark period during phases A and C. As expected, the control group was not different from phase A to C, which had similar acrophasis at Zeitgeber Time (ZT) 6. The LP/SP group showed acrophasis at ZT 3 in phase A and acrophasis at ZT 8 in phase C. Exactly the opposite occurred in the SP/LP group, which showed the acrophasis at ZT 8 in phase A and acrophasis around ZT 3 at phase C. (**Fig. 3**).

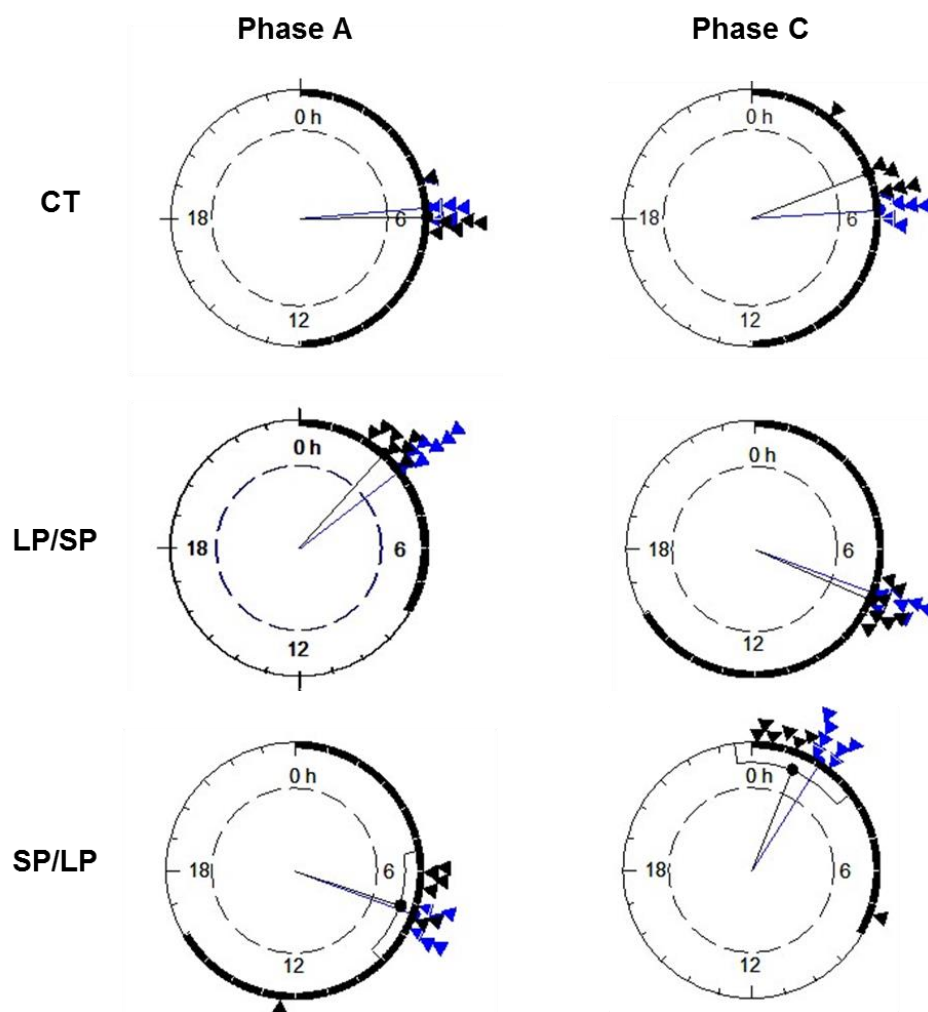


Fig. 3. Changes in activity and temperature acrophasis according to the phase. Rayleigh test of activity (blue) and temperature (black) acrophasis showing the changes according to the photoperiod, which was maintained in all of the groups, and the acrophasis of both variables at the middle of dark phase. Hour 0 represents the moment when the lights were turned off. CT: Control; LP/SP: Long Photoperiod/ Short Photoperiod; SP/LP: Short Photoperiod/ Long Photoperiod.

In comparison with the LP/SP and CT groups, the SP/LP group showed a significantly lower activity amplitude in phases A ($F = 8.2$, $p < 0.01$) and B ($F = 5.7$; $p = 0.01$) (**Fig 4A**). By comparing the means among phases, the LP/SP group presented a significant decrease in activity amplitude from phase A ($16.364307 + \text{sd}$) to C ($11.561429 + \text{sd}$) (Fn, g 4.157, 2; $p < 0.05$.) (**Fig. 4A**). However, no differences in the temperature amplitude were found.

In comparison with the LP/SP and CT groups, the SP/LP group presented a lower temperature in phase A ($F = 25.07$; $p < 0.0001$), B ($F = 28.21$; $p < 0.0001$) and C ($F = 8.11$; $p < 0.01$) (**Fig 4B**).

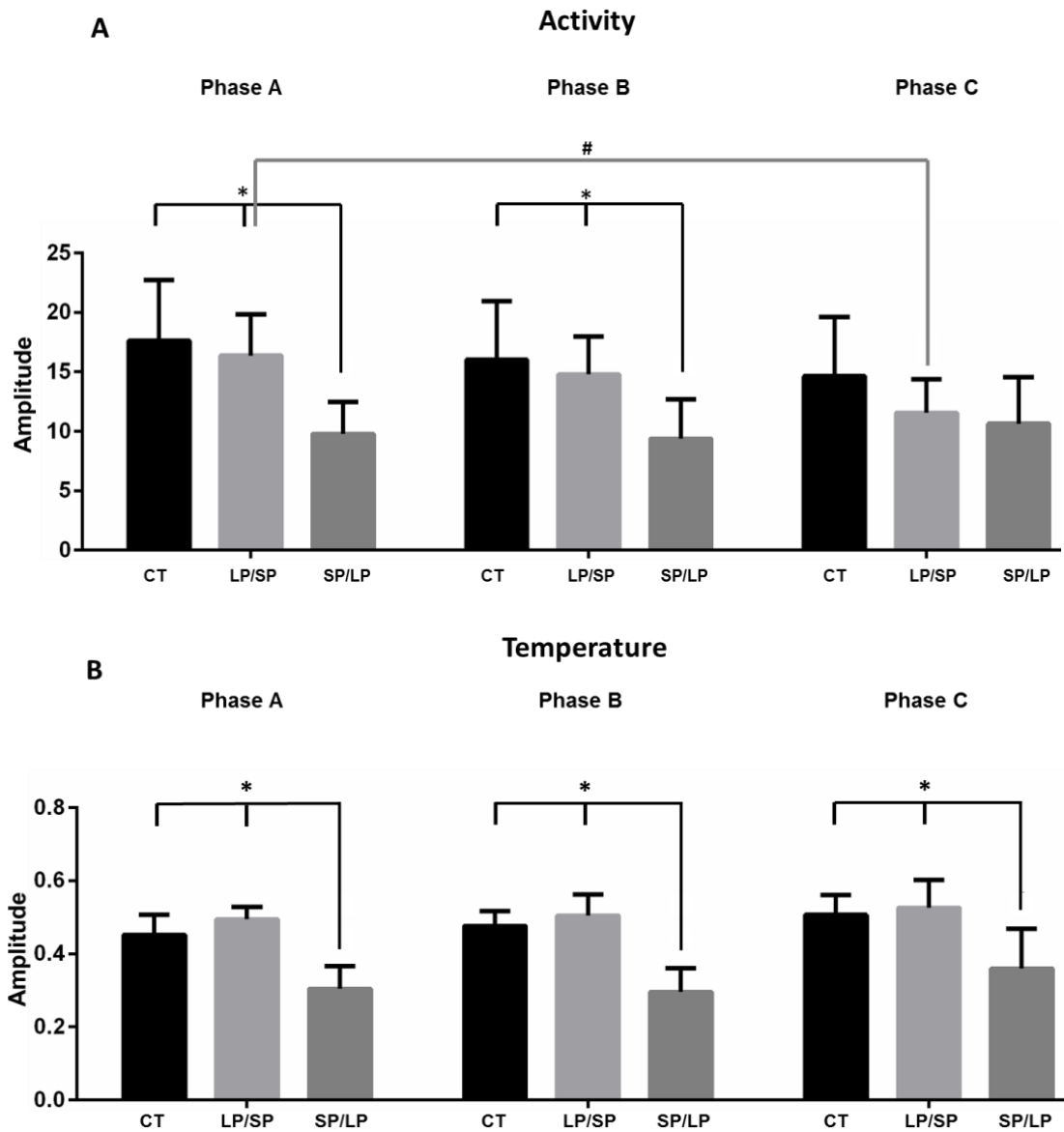


Fig. 4. Activity and Temperature Amplitude. (A) Activity amplitude: The SP/LP group showed significantly lower activity amplitude in phases A and B compared to the other groups. The LP/SP group presented a significant decrease in activity amplitude from phase A to C. Mean \pm SEM * $p \leq 0.01$, ANOVA/Tukey compared to all other groups at same phase. # $p < 0.05$, ANOVA/Tukey compared to phase A in the same group. (B) Temperature amplitude: In comparison with the other groups, the SP/LP group presented a lower temperature in phase A, B and C. Mean \pm SEM. * $p < 0.01$, ANOVA/Tukey compared to all of the other groups at the same phase. CT: Control; LP/SP: Long Photoperiod/ Short Photoperiod; SP/LP: Short Photoperiod/ Long Photoperiod.

The melatonin concentration did not differ between groups and phases; however, a significant positive correlation between phases A and C was found in the LP/SP group ($r^2 = 0.707$; $p = 0.018$) (**Fig. 5**). 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**).

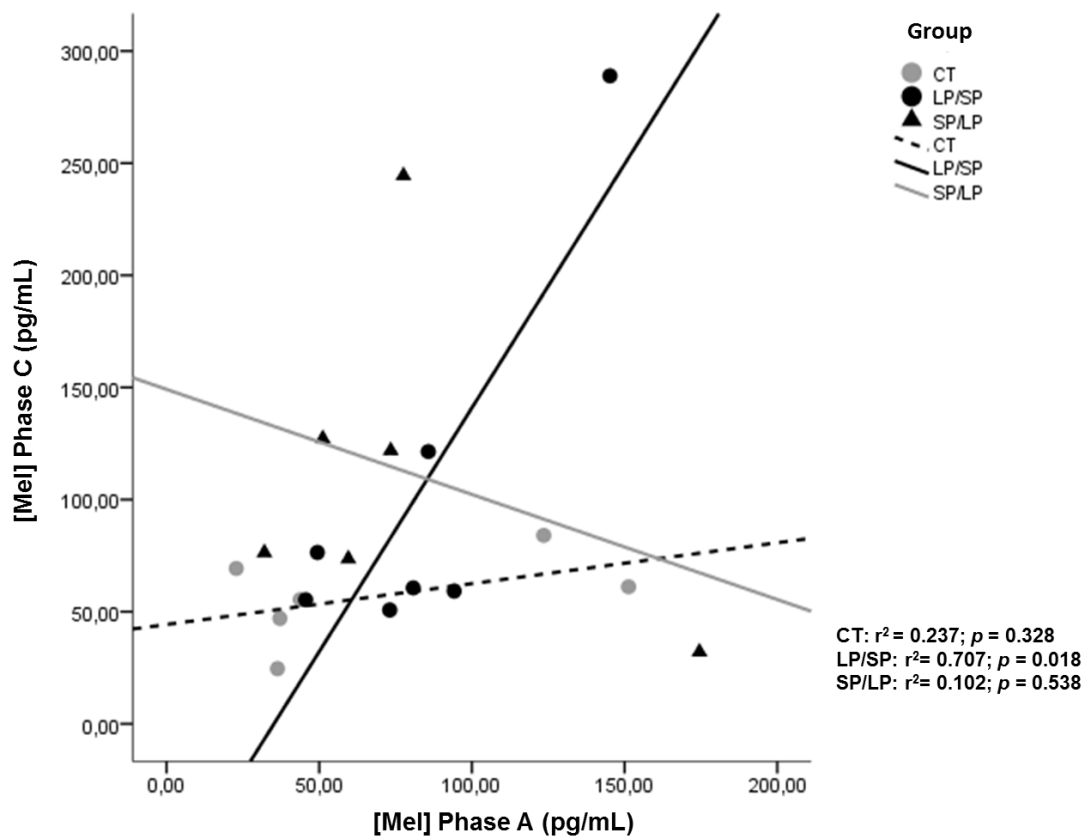


Fig. 5. Correlations of melatonin level between phase A and C in each group. Pearson's correlation of melatonin concentration at phase A and C. The LP/SP group (black line) showed a significant positive correlation ($r^2 = 0.707$; $p = 0.018$). CT: Control; LP/SP: Long Photoperiod/ Short Photoperiod; SP/LP: Short Photoperiod/ Long Photoperiod.

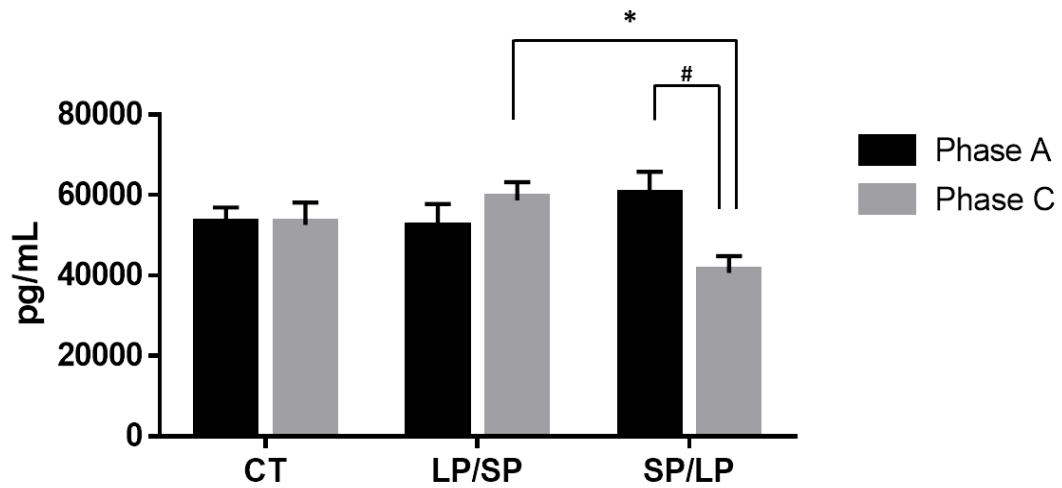


Fig. 6. Mean corticosterone concentration in each group by phase. Graph showing the concentration of corticosterone in each group at phases A and C. A significant difference was found between the LP/SP and SP/LP groups in phase C. Also in phase C, the SP/LP group had a significant decrease in corticosterone concentration compared with phase A. * $p < 0.05$, ANOVA/Tukey compared to all of the 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.

4. Discussion

Activity and temperature were modified according to the length of light and darkness. We demonstrated that being exposed to a short photoperiod decreased the amplitude of rhythms and increased the levels of corticosterone, a hormone related to stress (Barden, 2004). Additionally, the adjustment from the long to short photoperiod was different than the adjustment from the short to long photoperiod, and melatonin correlated better in the former adjustment. The model proposed in this study differs from previously used models because the changes in light/dark were gradually performed in a species that is usually used in behavior experiments.

As we can observe, the temperature and activity achrophase changed from phase A to C and maintained synchrony. Therefore, both variables were influenced by the light/dark period. Biological rhythms are under the control of a complex temporal system in which the main structure is the suprachiasmatic nucleus (SQN) of the hypothalamus (Reiter, 1991). The SQN 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. In turn, 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 (Charles et al., 2013). However, in this study, we did not find different levels of melatonin among the 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,

the transition from LP to SP was not similar to that from SP to LP. It seems that the transition from SP to LP requires more time for the body to adapt.

In this study, short photoperiods were related to a reduction of activity and temperature amplitudes and to high levels of corticosterone. 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) 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 insulin: glucose ratio, suggesting a prediabetic state (Karatsoreos et al., 2011). Memory and learning alterations are modulated by SCN-projecting melanopsin (LeGates et al., 2012). Studies have demonstrated that the serotonergic, but not the dopaminergic, system responds similarly to short period exposure in diurnal (chipmunks) and nocturnal (C57BL/6J mice) animals. In both, 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. In humans, high latitudes demand a circadian adaptation, which includes an increase in the ultradian behavioral patterns. These processes affect mood, sleep timing, and metabolic function (melatonin, cortisol, and electrolytes) (Karatsoreos, 2014). Furthermore, there is evidence that light therapy modifies 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. Light modulates the function of core clock components and consequently modifies the monoaminergic system (Harrison et al., 2015).

In this study, we observed the influence of the light/dark cycle in a model with gradual length photoperiod changes, which is similar to the cycle in temperate regions and more closely resembles real life. The modern lifestyle shortens the dark phase and the exposure to natural light. The results of this study reinforce that a lack of darkness and of sunlight impact the evolutionary circadian system.

Acknowledgements

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

References

- Ashkenazy T, Einat H, Kronfeld-Schor N. 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*. 2009 Feb;12(1):83-93.
- Barden N. Implication of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the physiopathology of depression. *J Psychiatry Neurosci*. 2004 May; 29(3):185-93.
- Becker A, Bilkei-Gorzo A, Michel K, Zimmer A. Exposure of mice to long-light: a new animal model to study depression. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2010 Nov;20(11):802-12.
- Bedrosian TA, Nelson RJ. Influence of the modern light environment on mood. *Mol Psychiatry*. 2013 Jul; 18(7):751-7.
- Blask DE, Hill SM, Dauchy RT, Xiang S, Yuan L, Duplessis T, Mao L, Dauchy E, Sauer LA. 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*. 2011 Oct;51(3):259-69.
- Charles J. Meliska, Luis F. Martínez, Ana M. López, Diane L. Sorenson, Sara Nowakowski, Daniel F. Kripke, Jeffrey Elliott, Barbara L. Parry. Antepartum depression severity is increased during seasonally longer nights: relationship to melatonin and cortisol timing and quantity. *Chronobiol Int*. Author manuscript; available in PMC 2014 November 1. Published in final edited form as: *Chronobiol Int*. 2013 November; 30(9): 1160–1173.
- Goda R, Otsuka T, Iwamoto A, Kawai M, Shibata S, Furuse M, Yasuo S. 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*. 2015 Apr 23;593:95-100.
- Harb F, Hidalgo MP, Martau B. Lack of exposure to natural light in the workspace is associated with physiological, sleep and depressive symptoms. *Chronobiol Int*. 2015 Apr;32(3):368-75.

Harrison SJ, Tyrer AE, Levitan RD, Xu X, Houle S, Wilson AA, Nobrega JN, Rusjan PM, Meyer JH. Light therapy and serotonin transporter binding in the anterior cingulate and prefrontal cortex. *Acta Psychiatr Scand*. 2015 Apr 17.

Reiter RJ. Melatonin: the chemical expression of darkness. *Mol Cell Endocrinol*. 1991b Aug; 79(1-3):C153-8.

Karatsoreos IN, Bhagat S, Bloss EB, Morrison JH, McEwen BS. Disruption of circadian clocks has ramifications for metabolism, brain, and behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Jan 25;108(4):1657-62.

Karatsoreos IN. Links between Circadian Rhythms and Psychiatric Disease. *Front Behav Neurosci*. 2014 May 6;8:162. doi: 10.3389/fnbeh.2014.00162. eCollection 2014.

Krivisky K, Einat H, Kronfeld-Schor N. 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*. 2012 Oct;119(10):1241-8.

Lall GS, Atkinson LA, Corlett SA, Broadbridge PJ, Bonsall DR. Circadian entrainment and its role in depression: a mechanistic review. *J Neural Transm*. 2012 Oct; 119(10):1085-96.

LeGates TA, Altimus CM, Wang H, Lee HK, Yang S, Zhao H, Kirkwood A, Weber ET, Hattar S. Aberrant light directly impairs mood and learning through melanopsin-expressing neurons. *Nature*. 2012 Nov 22;491(7425):594-8.

Lowden A, Åkerstedt T. 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*. 2012 Jun; 29(5):641-9.

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

Morita T, Tokura H. The influence of different wavelengths of light on human biological rhythms. *Appl Human Sci.* 1998 May; 17(3):91-6.

Nagy AD, Iwamoto A, Kawai M, Goda R, Matsuo H, Otsuka T, Nagasawa M, Furuse M, Yasuo S. 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.* 2015 May;32(4):447-57.

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 Feb;40:37-47.

Quiles CL, Oliveira MAB, Piazza FV, Pilz LK, Hidalgo MP. Mudança de fotoperíodo: proposta de modelo experimental. *Clinical & Biomedical Research.* 2014.

Rosenthal NE, Sack DA, Gillin JC, Lewy AJ, Goodwin FK, Davenport Y, Mueller PS, Newsome DA, Wehr TA. Seasonal affective disorder. A description of the syndrome and preliminary findings with light therapy. *Arch Gen Psychiatry.* 1984 Jan;41(1):72-80.

Workman JL, Manny N, Walton JC, Nelson RJ. Short day lengths alter stress and depressive-like responses, and hippocampal morphology in Siberian hamsters. *Horm Behav.* 2011 Nov; 60(5):520-8.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Tendo em vista os resultados obtidos, podemos inferir que as alterações no fotoperíodo geram grande impacto nos ritmos biológicos, e que determinadas modificações demandam maior grau de capacidade adaptativa do organismo do que outras.

Baseado em nossos resultados, pretendemos dar continuidade ao estudo do papel do fotoperíodo nos ritmos biológicos através deste modelo de alteração de fotoperíodo, estendendo o tempo de intervenção para averiguar o que ocorrerá com as variáveis estudadas em uma intervenção crônica. Ainda, avaliaremos outras variáveis, com estudos comportamentais e também a possibilidade de intervenções com terapia luminosa.

Além disso, estamos em andamento em um novo projeto que implica a utilização de um sistema de iluminação com variabilidade de temperatura de cor com ritmicidade circadiana, de modo a tentar mimetizar ou aproximar o ambiente interno às variações externas naturais de iluminação, reduzindo os efeitos indesejados ocasionados por trabalhadores em locais fechados sem janela.

6. REFERÊNCIAS ADICIONAIS

Auger RR, Morgenthaler TI. Jet lag and other sleep disorders relevant to the traveler. *Travel Med Infect Dis.* 2009 Mar; 7(2):60-8.

Barden N. Implication of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the physiopathology of depression. *J Psychiatry Neurosci.* 2004 May; 29(3):185-93.

Brainard GC, Richardson BA, King TS, Matthews SA, Reiter RJ. The suppression of pineal melatonin content and N-acetyltransferase activity by different light irradiances in the Syrian hamster: a dose-response relationship. *Endocrinology.* 1983 Jul; 113(1):293-6.

Couto-Moraes R, Palermo-Neto J, Markus RP. The immune-pineal axis: stress as a modulator of pineal gland function. *Ann N Y Acad Sci.* 2009 Feb; 1153:193-202.

Dunlap J, Jennifer Loros, De Coursey PJ. *Chronobiology. Biological timekeeping.* Sunderland Massachusetts: Sinauer Associates, Inc Publishers; 2004.

Golombeck D. *Cronobiologia humana; ritmos y relojes biológicos en la salud y en la enfermedad.* Editorial Universidad Nacional de Quilmes. Bernal, Buenos Aires, 2007.

Gruart A, Delgado JM, Escobar C, Aguilar R. *Los relojes que gobiernan la vida.* México: Fondo de Cultura Económica; 2002.

Harb F, Hidalgo MP, Martau B. Lack of exposure to natural light in the workspace is associated with physiological, sleep and depressive symptoms. *Chronobiol Int.* 2015 Apr; 32(3):368-75. doi: 10.3109/07420528.2014.982757.

Hasler BP, Buysse DJ, Kupfer DJ, Germain A. Phase relationships between core body temperature, melatonin, and sleep are associated with depression severity: further evidence for circadian misalignment in non-seasonal depression. *Psychiatry Res.* 2010 Jun 30; 178(1):205-7.

Huitron-Resendiz S, Marcondes MC, Flynn CT, Lanigan CM, Fox HS. Effects of simian immunodeficiency virus on the circadian rhythms of body temperature and gross locomotor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Sep 18; 104(38):15138-43.

Kalsbeek A, Palm IF, La Fleur SE, Scheer FA, Perreau-Lenz S, Ruiter M, Kreier F, Cailotto C, Buijs RM. SCN outputs and the hypothalamic balance of life. *J Biol Rhythms*. 2006 Dec; 21(6):458-69.

Kantermann T, Roenneberg T. Is light-at-night a health risk factor or a health risk predictor? *Chronobiol Int*. 2009 Aug;26(6):1069-74.

Kappers JA. The development, topographical relations and innervation of the epiphysis cerebri in the albino rat. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*. 1960; 52:163-215.

Kelly G. Body temperature variability (Part 1): a review of the history of body temperature and its variability due to site selection, biological rhythms, fitness, and aging. *Altern Med Rev*. 2006 Dec; 11(4):278-93.

Klerman EB, Rimmer DW, Dijk DJ, Kronauer RE, Rizzo JF 3rd, Czeisler CA. Nonphotic entrainment of the human circadian pacemaker. *Am J Physiol*. 1998 Apr; 274(4 Pt 2):R991-6.

McCarthy MJ, Welsh DK. Cellular circadian clocks in mood disorders. *J Biol Rhythms*. 2012 Oct; 27(5):339-52.

McClung CA. Circadian rhythms and mood regulation: insights from pre-clinical models. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2011 Sep; 21 Suppl 4:S683-93.

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

Noguera AD, Riu TC, Hortensi JV, Cucurela NC. *Cronobiologia*. Ed Universidad de Barcelona, Barcelona, España. 1999.

Peng ZC, Bentivoglio M. The thalamic paraventricular nucleus relays information from the suprachiasmatic nucleus to the amygdala: a combined anterograde and retrograde tracing study in the rat at the light and electron microscopic levels. *J Neurocytol.* 2004 Jan; 33(1):101-16.

Perreau-Lenz S, Kalsbeek A, Van Der Vliet J, Pévet P, Buijs RM. In vivo evidence for a controlled offset of melatonin synthesis at dawn by the suprachiasmatic nucleus in the rat. *Neuroscience.* 2005; 130(3):797-803.

Reiter RJ. Neuroendocrine effects of light. *Int J Biometeorol.* 1991a Nov; 35(3):169-75.

Reiter RJ. Melatonin: the chemical expression of darkness. *Mol Cell Endocrinol.* 1991b Aug; 79(1-3):C153-8.

Roenneberg T, Daan S, Merrow M. The art of entrainment. *J Biol Rhythms.* 2003 Jun; 18(3):183-94.

Roopin M, Levy O. Temporal and histological evaluation of melatonin patterns in a 'basal' metazoan. *J Pineal Res.* 2012 Oct; 53(3):259-69.

Sahin L, Figueiro MG. Alerting effects of short-wavelength (blue) and long-wavelength (red) lights in the afternoon. *Physiol Behav.* 2013 May 27; 116-117:1-7.

Scheer FA, Pirovano C, Van Someren EJ, Buijs RM. Environmental light and suprachiasmatic nucleus interact in the regulation of body temperature. *Neuroscience.* 2005; 132(2):465-77.

Shea SA, Hilton MF, Hu K, Scheer FA. Existence of an endogenous circadian blood pressure rhythm in humans that peaks in the evening. *Circ Res.* 2011 Apr 15; 108(8):980-4.

Stehle JH, Saade A, Rawashdeh O, Ackermann K, Jilg A, Sebestény T, Maronde E. 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.

Stephan FK. The "other" circadian system: food as a Zeitgeber. *J Biol Rhythms*. 2002 Aug; 17(4):284-92.

Thomson F, Craighead M. Innovative approaches for the treatment of depression: targeting the HPA axis. *Neurochem Res*. 2008 Apr; 33(4):691-707.

Wehr TA. The durations of human melatonin secretion and sleep respond to changes in daylength (photoperiod). *J Clin Endocrinol Metab*. 1991 Dec; 73(6):1276-80.

Wirz-Justice A. Diurnal variation of depressive symptoms. *Dialogues Clin Neurosci*. 2008; 10(3):337-43.

ANEXO 1

Artigo prévio do grupo validando a aplicação dos equipamentos utilizados para aferição de atividade e temperatura contínua em ratos (Quiles et al., 2014).

MUDANÇA DE FOTOPERÍODO: PROPOSTA DE MODELO EXPERIMENTAL

CHANGE OF PHOTOPERIOD: PROPOSAL FOR AN EXPERIMENTAL MODEL

Caroline Luísa Quiles¹, Melissa Alves Braga De Oliveira¹, Francele Valente Piazza^{1,3}, Luísa Klaus Pílz^{1,2}, Maria Paz Loayza Hidalgo^{1,2}

RESUMO

Introdução: Existem variações fisiológicas e comportamentais relacionadas à sazonalidade, e a luz é o principal sincronizador destas variações de acordo com as funções sazonais em latitudes de climas temperados. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi validar uma metodologia de modificação de fotoperíodo com ratos Wistar avaliando sua interferência no ritmo biológico.

Métodos: Três ratos Wistar machos adultos (60 dias) foram expostos a 3 fotoperíodos de 17 dias cada, com diferentes ciclos claro/escuro (*light/dark*, LD): Animal CL/CC, exposto a LD inicial 16:30/07:30 (CL, claro longo) e LD final 07:30/16:30 (CC, claro curto); Animal CC/CL, exposto a LD inicial 07:30/16:30 e LD final 16:30/07:30; e Animal CT, sob LD constante 12:00/12:00. Os animais CL/CC e CC/CL passaram por um fotoperíodo intermediário entre o LD inicial e final, no qual a exposição à luz foi aumentada ou diminuída em 30 min a cada dia até que os fotoperíodos se invertessem. Todos os animais permaneceram isolados durante o estudo e tiveram suas temperaturas corporais continuamente aferidas por sensores implantados na cavidade peritoneal e suas atividades locomotoras medidas por sensores acoplados às suas caixas. Os dados obtidos foram utilizados para construção de histogramas.

Resultados: Os animais CL/CC e CC/CL apresentaram maior período de atividade em CC do que em CL. A temperatura do animal CT seguiu um padrão rítmico. A linhagem utilizada apresentou sensibilidade à mudança de fotoperíodo.

Conclusão: O modelo proposto e validado neste estudo pode ser usado em experimentos que tenham como objetivo avaliar as consequências das mudanças de exposição à luz.

Palavras-chave: *Atividade/repouso; comportamento; cronobiologia; ritmos biológicos; sazonalidade*

ABSTRACT

Introduction: There are some physiological and behavioral variations related to seasonality, and light is the major synchronizer of these variations according to the seasonal functions in temperate latitudes. Thus, the objective of this study was to validate a methodology for photoperiod modification in Wistar rats by evaluating its interference in the biological rhythm.

Methods: Three male adult Wistar rats (60 days) were exposed to 3 photoperiods of 17 days each, with different light/dark cycles (LD): LDPP/SDPP Animal, exposed to initial LD 16:30/07:30 (LDPP, long-day photoperiod) and final LD 07:30/16:30 (SDPP, short-day photoperiod); SDPP/LDPP Animal, exposed to initial LD 07:30/16:30 and

Clin Biomed Res. 2014;34(3):307-312

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

2 Programa de Pós-Graduação em Medicina, Psiquiatria, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

3 Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

Autor Correspondente:

Caroline Luísa Quiles
E-mail: carol.quiles@hotmail.com
Laboratório de Cronobiologia
Hospital de Clínicas de Porto Alegre.
Rua Ramiro Barcelos 2350, sala 12107
90035-903, Porto Alegre, RS, Brasil.

final LD 16:30/07:30; and CT Animal, under constant LD 12:00/12:00. LDPP/SDPP and SDPP/LDPP animals underwent an intermediate photoperiod between initial and final LD, in which light exposure was increased or reduced by 30 min each day until the photoperiods were inverted. All animals remained isolated during the study and had their core temperatures continuously measured by sensors implanted in the peritoneal cavity and their locomotive activity assessed by sensors attached to their cages. The data obtained were used to construct histograms.

Results: LDPP/SDPP and SDPP/LDPP animals had a longer period of activity in the SDPP than in the LDPP. The temperature of the CT animal followed a rhythmic pattern. The rat strain used was sensitive to changes in photoperiod.

Conclusions: The model proposed and validated in this study can be used in experiments that aim to assess the consequences of changes in light exposure.

keywords: Activity/rest; behavior; chronobiology; biological rhythms; seasonality

Sazonalidade é um termo que diz respeito a tempo, sendo um fenômeno sazonal aquele que apresenta variação de ocorrência conforme a época do ano e que está relacionado com diferenças na disponibilidade de luz ao longo do mesmo¹. Existem variações fisiológicas e comportamentais vinculadas à sazonalidade, como fenômenos de hibernação e migração, sendo a luz (fotoperíodo) a principal sincronizadora das funções sazonais em latitudes de climas temperados². Como manifestação patológica do comportamento humano relacionado à sazonalidade, podemos citar o transtorno afetivo sazonal, que se caracteriza por episódios de depressão que se desenvolvem tipicamente no inverno, período este com dias muito curtos e noites muito longas³.

Uma série de processos fisiológicos e comportamentais ocorre de maneira rítmica. A luz solar, que é a principal responsável pela sincronização desses ritmos ao ambiente, vem sendo substituída pela luz artificial, não permitindo ao organismo uma boa compreensão de quando é dia ou noite⁵ e impedindo que este otimize suas funções de acordo com os ciclos externos. Esse fenômeno, denominado de *light pollution*⁶, é preocupante ao percebermos que, tanto os padrões de iluminação circadianos (diários), quanto os sazonais podem estar se descaracterizando e rompendo os ritmos endógenos.

Tendo em vista o grande aumento de pacientes com transtorno depressivo e sua forte associação com alterações nos ritmos biológicos⁷, temos interesse em verificar se existe uma influência do fotoperíodo nesse contexto, por meio do estabelecimento de um modelo experimental que possibilite o estudo do efeito da exposição a

diferentes fotoperíodos nos seres vivos.

O padrão sazonal é atualmente considerado um especificador da depressão recorrente, que apresenta remissão entre os episódios (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders V*). Nos EUA e no norte da Europa encontram-se 7 dos 10 países com maior prevalência de depressão e 6 dos 10 com mais alto índice de suicídio. Considerando isso, utilizaremos um modelo animal que incluirá as mesmas mudanças de ciclo claro/escuro que ocorrem nessas regiões, onde os efeitos das alterações sazonais de luminosidade sobre o comportamento humano parecem ser mais evidentes. Portanto, o objetivo deste artigo foi descrever a metodologia de modificação de fotoperíodo com ratos Wistar avaliando sua interferência nos ritmos biológicos de atividade e temperatura.

MÉTODOS

Foram utilizados 3 ratos albinos machos da linhagem Wistar com 60 dias de idade, sendo cada um exposto a 3 fotoperíodos distintos:

Animal CL/CC: Claro Longo/Claro Curto;

Animal CC/CL: Claro Curto/Claro Longo;

Animal CT: Controle.

Simulando as alterações sazonais do ano, os animais CL/CC e CC/CL passaram por mudanças no ciclo claro/escuro mimetizando as alterações de exposição à luz natural presentes no inverno e verão do norte dos EUA e da Europa. Foram, ao todo, 3 mudanças de ciclo claro/escuro, cada uma delas com duração de 17 dias.

O animal CL/CC passou por uma primeira

Mudança de fotoperíodo

etapa (A) de Claro Longo (ciclo claro/escuro [light/dark, LD] = 16:30/7:30) e posteriormente por uma segunda etapa (B) com modificações diárias de 30 minutos a menos no claro e 30 minutos a mais no escuro, de forma que ao 17º dia o ciclo claro/escuro havia se invertido. Esse ciclo invertido, que chamamos de Claro Curto (LD= 7:30/16:30), foi mantido por mais uma etapa de 17 dias (C).

Simultaneamente, o animal CC/CL passou por uma primeira etapa (A) de Claro Curto (LD 7:30/16:30) e posteriormente por uma segunda etapa (B) com modificações diárias de 30 minutos a mais no claro e 30 minutos a menos no escuro, de forma que ao 17º dia o ciclo claro/escuro havia se invertido. Esse ciclo invertido, que chamamos de Claro Longo (LD = 16:30/7:30), foi mantido por mais uma etapa de 17 dias (C).

Já o animal CT se manteve durante todos os 51 dias do estudo com o fotoperíodo constante (LD: 12/12) como controle em relação aos demais, como pode ser observado na Figura 1.

Essa simulação foi possível através da utilização de uma estante de fotoperíodo nas dependências da Unidade de Experimentação Animal (UEA), que consiste em um equipamento com câmaras independentes contendo quatro temporizadores eletrônicos digitais microprocessados (modelo TT34, COEL). Essa estante permite que os animais permaneçam sob as mesmas condições de temperatura (~22°C), umidade e exposição a ruído, podendo-se obter até 4 programações diferentes de fotoperíodo em uma mesma sala.

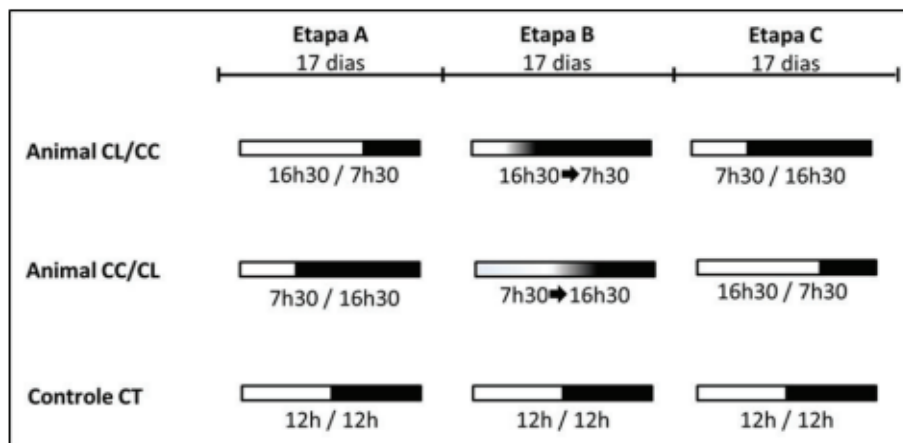


Figura 1: Etapas de modificação do fotoperíodo para cada animal.

A atividade de cada animal foi monitorada continuamente através de actigrafia (monitores de atividade contínua, Actigraph, ADNpln-©Antoni Díez Noguera, Barcelona, CA, Espanha), acoplados à caixa moradia de acrílico transparente (Panlab Harvard Apparatus) medindo 25 x 15 x 25 cm. A caixa de atividade possui 2 emissores de luz infravermelha e 2 receptores, um em cada lateral da caixa, que transmitem informação para um computador, o qual realiza a medida da atividade locomotora através do programa DAS192USB. Posteriormente, os dados foram analisados utilizando Microsoft Excel 2010.

O registro da temperatura foi obtido através de sensores (*Thermochrone iButtons*; Dallas

Semiconductor, Dallas, TX) implantados na cavidade intraperitoneal sob anestesia com isoflurano (indução 5% e manutenção de 2-3%). Tramadol intramuscular (5 mg/kg) foi utilizado como analgésico durante o procedimento e no pós-operatório 6 horas após o procedimento (não foi necessária analgesia no dia seguinte à operação). O fio de sutura utilizado foi o fio Mononylon 4-0 com agulha 3,0 cm. Os 15 primeiros dias pós-cirurgia foram considerados tempo de recuperação, portanto não houve registro de temperatura. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no uso de Animais do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (número de aprovação: 13-0175).

RESULTADOS

O animal CL/CC apresentou pouca atividade na etapa A (no sentido de que esteve ativo por menos tempo), modificando para um evidente aumento da atividade durante a etapa C. Por sua vez, o animal CC/CL apresentou na etapa A atividade maior do que na etapa C. Portanto, os dois animais modificaram seu comportamento única e exclusivamente em função da quantidade de luz

fornecida. Ambos apresentam maior duração da atividade no ciclo Claro Curto (figura 2).

Ainda, podemos perceber que a ordem da mudança de fotoperíodo não influenciou na atividade (Claro Curto antes ou depois do Claro Longo), ou seja, de ambas as formas os animais se mostraram sensíveis ao estímulo luminoso, apresentando maior atividade no período de escuro.

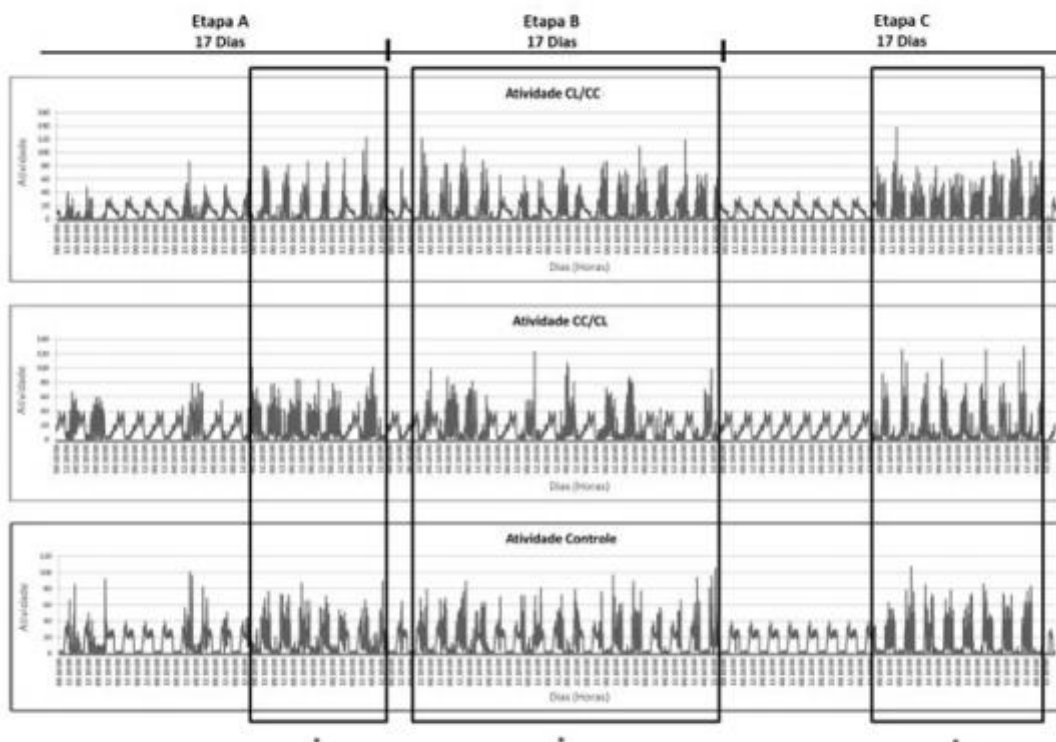


Figura 2: Variação da atividade locomotora durante todo o período do estudo.

* Períodos em que os actígrafos registraram a atividade dos animais. Os dados restantes foram obtidos através de média.

Mudança de fotoperíodo

O animal CT teve, durante um período de 45 dias, registros de temperatura realizados com sucesso (Figura 3).

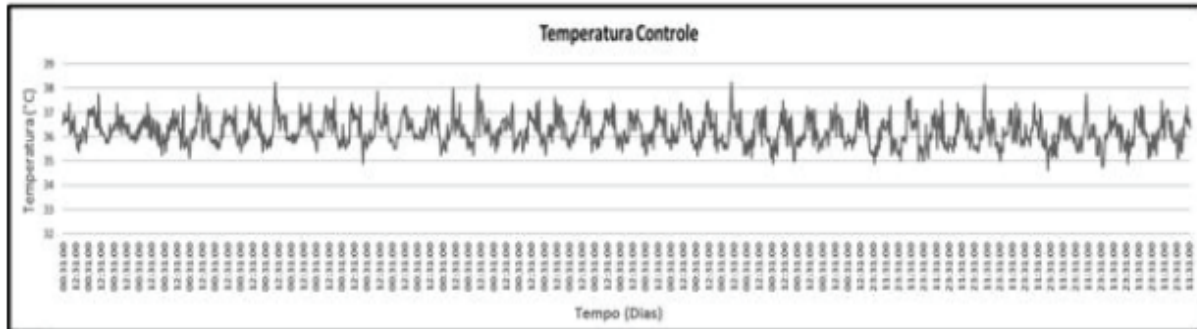


Figura 3: Variação da temperatura do animal CT durante os primeiros 45 dias do estudo. LD 12/12.

DISCUSSÃO

Neste estudo foi escolhida a aferição do ritmo atividade/repouso por ser um dos mais importantes ritmos nos seres vivos e, portanto, um dos primeiros a se adaptar a mudanças ambientais. Um exemplo disso são as viagens transmeridionais, nas quais a primeira variável a sofrer alterações para suprir as necessidades fisiológicas do ser humano é o ritmo sono/vigília⁸. Por outro lado, também escolhemos a temperatura, por ser um dos ritmos mais robustos do organismo, que demora mais tempo para se adaptar e indica, quando modificada, que a intervenção sofrida foi de forte impacto fisiológico no indivíduo⁹.

Nossos dados de atividade locomotora demonstram claramente que a linhagem utilizada é sensível à mudança de fotoperíodo e que o instrumento (estante de fotoperíodo) se adequa às necessidades do estudo das variáveis dependentes da mudança do ritmo de atividade. Isso significa que o modelo pode ser usado em experimentos que tenham como objetivo o estudo dos ritmos biológicos.

Quanto à temperatura, cabe salientar as limitações relacionadas ao método de aferição, principalmente a dificuldade em saber o tempo de bateria que resta em cada aparelho. Como o *software dos Thermochrone iButtons* não informa dados em relação ao tempo de bateria restante, só é possível saber se o aparelho teve ou não carga suficiente após sua retirada.

Portanto, dentre os 3 animais do estudo, apenas o animal CT teve seus registros realizados com sucesso, em um período de 45 dias. Esses dados nos mostram ser possível a averiguação do registro de temperatura; porém, como o animal

CT não sofreu variações no seu fotoperíodo durante as 3 etapas do estudo, não foi possível mostrar a influência deste na temperatura do indivíduo. Já a medida de atividade/repouso pode ser acompanhada constantemente, facilitando a solução de problemas técnicos e, portanto permitindo a aquisição consistente de dados.

A importância do estudo do fotoperíodo é destacada, por exemplo, nas situações em que trabalhadores ficam confinados em locais fechados, sem exposição à luz natural, o que pode vir a ter consequências no metabolismo e na qualidade do sono em longo prazo¹⁰. Vários estudos também têm relacionado o desenvolvimento de câncer de mama em trabalhadores de turno^{11,12}. Além da exposição à luz artificial durante o período da noite, também há questionamentos acerca das consequências advindas da industrialização, que possibilita a utilização de luz elétrica conforme necessidades e anseios do ser humano, resultando em um aumento da iluminação artificial, tanto em ambientes fechados, quanto externos¹³.

Em relação aos efeitos do fotoperíodo no comportamento, um estudo com pacientes que cometeram suicídio nos Estados Unidos mostrou haver um padrão sazonal na ocorrência desses casos, variando conforme a latitude em que ocorreram¹⁴. Isso indicou que, além do comportamento ter sido alterado seguindo uma variação sazonal, o fotoperíodo, que é diferente conforme a latitude, apresentou importante influência sobre a sazonalidade. Em animais, mudanças comportamentais já foram observadas através da comparação entre diferentes manifestações de sintomas tipo depressivo em roedores mantidos em fotoperíodos distintos¹⁵.

Além disso, a variação sazonal também apresentou influência significativa sobre a resposta ao modelo de estresse animal *social defeat*, sendo que, durante o verão, os roedores apresentaram menor suscetibilidade ao estresse¹⁶.

A partir do modelo apresentado, teremos a possibilidade de estudar a influência do fotoperíodo em diferentes áreas, uma vez que a alteração do ritmo claro/escuro vem sendo cada vez mais relacionada a eventos patológicos, tanto em humanos quanto em animais, como no caso de cânceres de mama, útero, de próstata e colo retal,

que estão entre os mais frequentes e preocupantes da atualidade^{17,18}.

Agradecimentos

As autoras agradecem toda equipe da Unidade de Experimentação Animal (UEA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em especial à Enfermeira Marta Justina Giotti Cioato, Chefe da Unidade, por todo apoio técnico e logístico que tornaram possível a realização deste estudo.

REFERÊNCIAS

- Schwartz C, Andrews MT. Circannual transitions in gene expression: lessons from seasonal adaptations. *Curr Top Dev Biol.* 2013;105:247-73.
- Dardente H, Hazlerigg DG, Ebling FJ. Thyroid hormone and seasonal rhythmicity. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2014;5:19.
- Sanassi LA. Seasonal affective disorder: is there light at the end of the tunnel? *JAAPA.* 2014 Feb;27:18-22;quiz 23.
- Gaston KJ, Davies TW, Bennie J, Hopkins J. Reducing the ecological consequences of night-time light pollution: options and developments. *J Appl Ecol.* 2012;49:1256-66.
- Bedrosian TA, Nelson RJ. Influence of the modern light environment on mood. *Mol Psychiatry.* 2013;18:751-7.
- Cho JR, Joo EY, Koo DL, Hong SB. Let there be no light: the effect of bedside light on sleep quality and background electroencephalographic rhythms. *Sleep Med.* 2013;14:1422-5.
- Wirz-Justice A. Diurnal variation of depressive symptoms. *Dialogues Clin Neurosci.* 2008;10:337-43.
- Auger RR, Morgenthaler TI. Jet lag and other sleep disorders relevant to the traveler. *Travel Med Infect Dis.* 2009;7:60-8.
- Scheer FA, Pirovano C, Van Someren EJ, Buijs RM. Environmental light and suprachiasmatic nucleus interact in the regulation of body temperature. *Neuroscience.* 2005;132:465-77.
- Leger D, Bayon V, Elbaz M, Philip P, Choudat D. Underexposure to light at work and its association to insomnia and sleepiness: a cross-sectional study of 13,296 workers of one transportation company. *J Psychosom Res.* 2011;70:29-36.
- Hansen J, Lassen CF. [Shift work and risk of cancer and coronary heart diseases.]. *Ugeskr Laeger.* 2014; 176(2).
- Bonde JP, Hansen J, Kolstad HA, Mikkelsen S, Olsen JH, Blask DE, et al. Work at night and breast cancer-report on evidence-based options for preventive actions. *Scand J Work Environ Health.* 2012;38:380-90.
- Stevens RG, Brainard GC, Blask DE, Lockley SW, Motta ME. Breast cancer and circadian disruption from electric lighting in the modern world. *CA Cancer J Clin.* 2014;64:207-18.
- Davis JM, Searles VB, Severtson SG, Dart RC, Bucher-Bartelson B. Seasonal variation in suicidal behavior with prescription opioid medication. *J Affect Disord.* 2014;158:30-6.
- 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.
- Han Q, Yang L, Liu Y, Lv N, Yu J, Wu G, et al. Resiliency to social defeat stress relates to the inter-strain social interaction and is influenced by season variation. *Neurosci Lett.* 2014;561:13-7.
- Ho A, Gabriel A, Bhatnagar A, Etienne D, Loukas M. Seasonality pattern of breast, colorectal, and prostate cancer is dependent on latitude. *Med Sci Monit.* 2014;20:818-24.
- Blask DE, Hill SM, Dauchy RT, Xiang S, Yuan L, Duplessis T, et al. 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.* 2011;51:259-69.

Recebido: 23/07/2014

Aceito: 16/09/2014