

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 Pilz^{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

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.

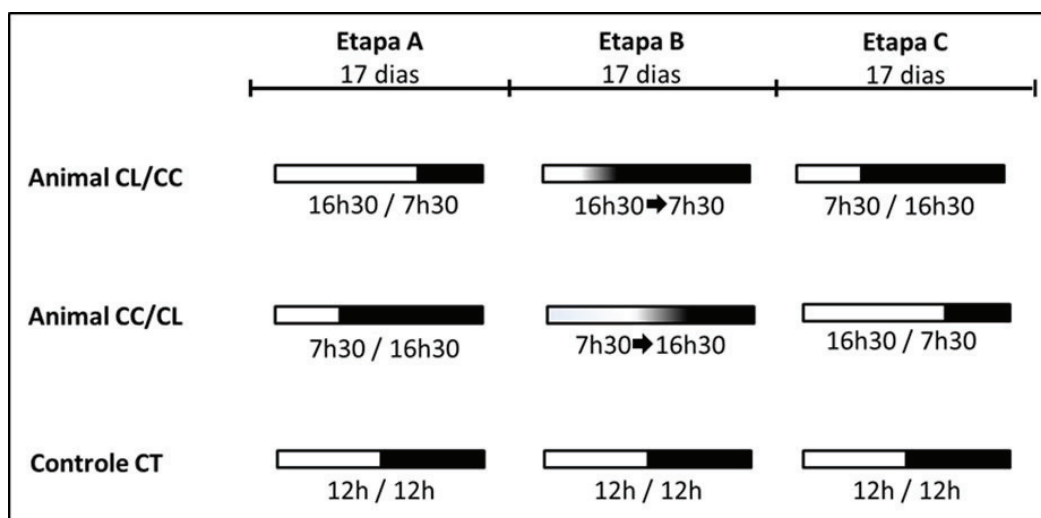


Figura 1: Etapas de modificação do fotoperíodo para cada animal.

A atividade de cada animal foi monitorada continuamente através de actigrafia (monitores de atividade contínua, Actigraph, ADNplín-©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.

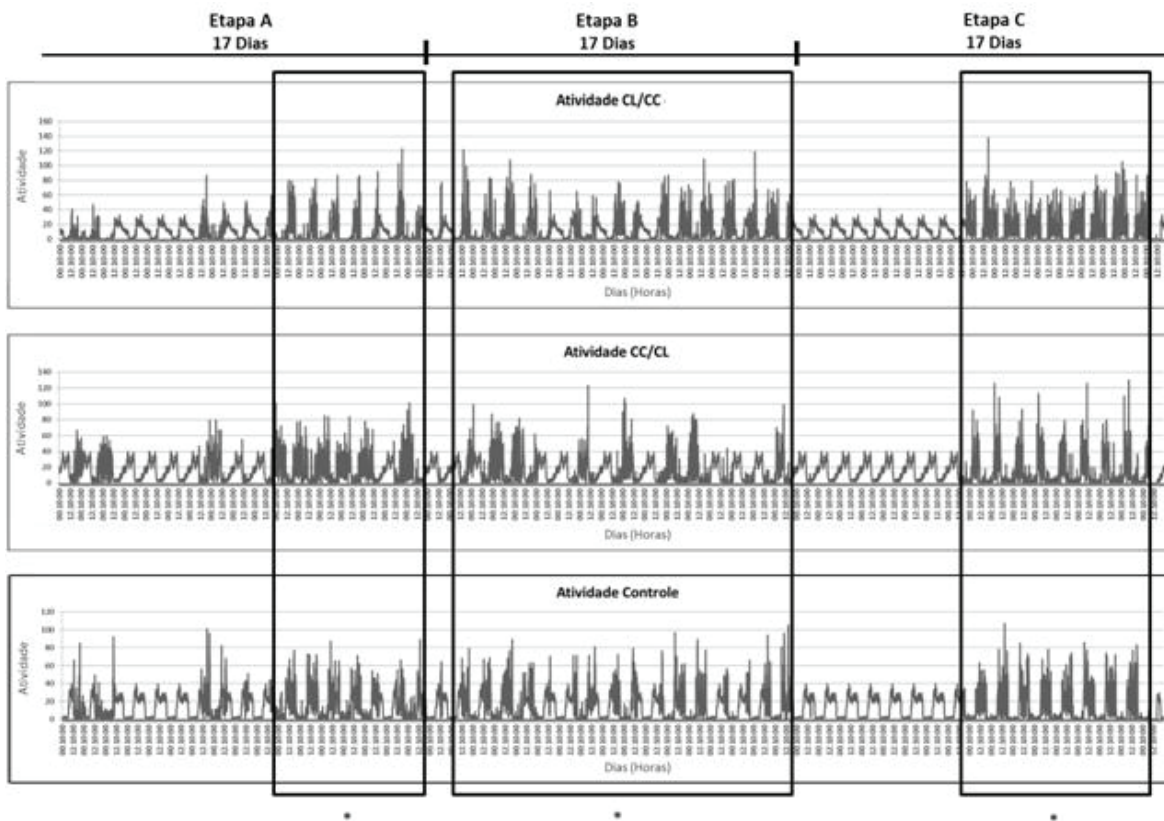


Figura 2: Variação da atividade locomotora durante todo o período do estudo.

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

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

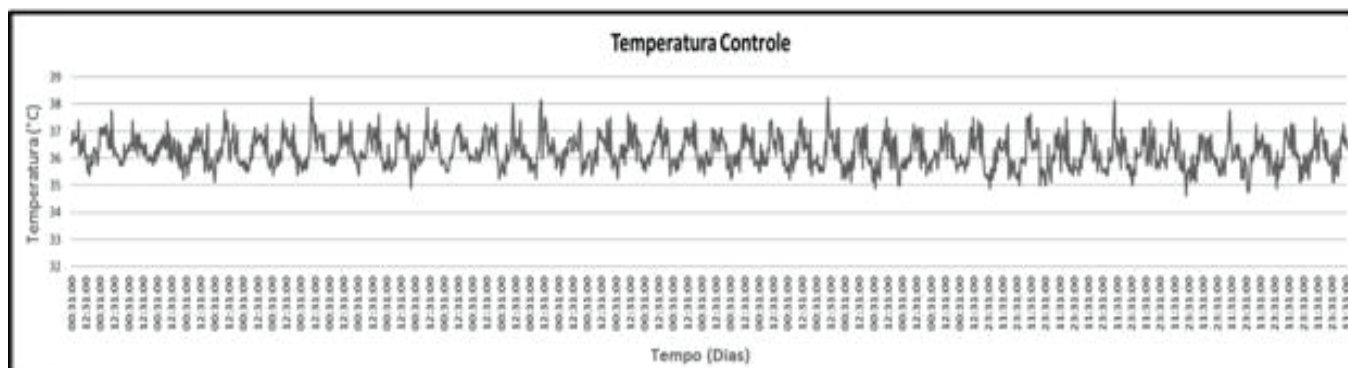


Figura 3: Variação da temperatura do animal CT durante os primeiros 45 dias do estudo. LD 12/12.

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 pôde ser acompanhada constantemente, facilitado 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