

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

MELISSA ALVES BRAGA DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ILUMINAÇÃO COM RITMICIDADE CIRCADIANA
NO RITMO DE ATIVIDADE/REPOUSO DE RATOS WISTAR**

Porto Alegre
Novembro de 2015

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

MELISSA ALVES BRAGA DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ILUMINAÇÃO COM RITMICIDADE CIRCADIANA
NO RITMO DE ATIVIDADE/REPOUSO DE RATOS WISTAR**

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 Bacharela em Biomedicina.

Orientador: Prof^ª. Dra Maria Paz Loayza Hidalgo

Porto Alegre
Novembro de 2015

AGRADECIMENTOS

Aos meus amados pais, Solano e Tania, por terem me dado a vida, o amor, o carinho, os cuidados, a segurança e os ensinamentos que foram essenciais para que eu chegasse até aqui. Vocês são minha fortaleza e meus maiores amores. Obrigada por todo apoio. Amo vocês!

À minha querida irmã, Maíra, meu maior exemplo de pessoa e profissional. Melhor irmã do mundo!

A toda minha família, pelo amor e consideração que sempre tiveram por mim, pela minha irmã e pelos meus pais.

Aos meus queridos amigos, por tantos momentos de alegria que compartilhamos e pelo apoio e compreensão de sempre.

Ao Colégio Militar de Porto Alegre, por ter feito parte da construção do meu caráter, por ter constituído a base sólida do conhecimento que contribuiu para o meu ingresso na UFRGS e por ter possibilitado a constituição de amizades verdadeiras e eternas durante meus anos escolares.

Aos queridos mestres por todo conhecimento compartilhado e aos colegas de graduação pelo companheirismo durante essa jornada.

A Profª Maria Paz, por todo apoio, estímulo e confiança que foram indispensáveis para que eu me encantasse com a pesquisa científica e acreditasse no meu potencial como profissional. É o meu exemplo de pesquisadora forte e determinada. Quando “crescer”, quero ser igual a você, Paz!

A todos os que já foram e são integrantes do Laboratório de Cronobiologia, por fazerem deste grupo uma família e deste laboratório uma extensão da minha casa, onde sempre me senti acolhida, onde o clima é tranquilo e de amizade. Trabalhar ao lado de todos é sempre divertido, motivador e uma honra para mim.

Às especiais amigas, Caroline e Juliana, que compartilharam das mesmas angústias e alegrias durante a realização deste trabalho. Rumo ao mestrado, meninas!

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre, a Unidade de Experimentação Animal, ao Centro de Pesquisa Experimental pelo suporte e ao FIPE-HCPA e CNPq pelo apoio financeiro que possibilitaram a realização deste trabalho.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela oportunidade da graduação de grande qualidade no curso de Biomedicina, que apesar de novo, já produz grandes frutos através dos grandes profissionais e pesquisadores que forma todos os anos.

SUMÁRIO

1. RESUMO	4
2. INTRODUÇÃO GERAL	5
Cronobiologia e o Relógio Biológico	5
Ritmos Biológicos	6
Luz: principal zeitgeber	7
Luz e o processo saúde-doença	8
3. OBJETIVOS	9
Objetivo geral	9
Objetivos específicos	9
4. ARTIGO CIENTÍFICO	10
Abstract	11
1. Introduction	12
2. Material and Methods	14
Experimental Animals	14
Intervention: Circadian Light	14
Rhythm Characterization	15
Statistical Analysis	15
3. Results	16
4. Discussion	17
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	29
6. REFERÊNCIAS GERAIS	30

1. RESUMO

Diante da grande influência do ciclo claro/escuro na fisiologia e comportamento humanos, é importante considerar os efeitos da luz no sistema circadiano ao projetar ambientes, sendo interessante fortalecer uma sinalização cíclica para o sistema circadiano através de uma iluminação que mimetize as mudanças gradativas que são observadas naturalmente no ambiente. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi verificar o efeito de uma iluminação com temperatura de cor que varia ao longo da fase clara sobre os ritmos de atividade/repouso de ratos Wistar machos.

O experimento foi realizado com 14 ratos Wistar machos adultos mantidos em um ciclo claro/escuro de 16:8h desde o dia do nascimento e divididos em dois grupos experimentais de acordo com o tipo de iluminação utilizada durante a fase clara: luz circadiana (CL) ou luz padrão (SL). Após o 21º dia de vida os animais foram alocados individualmente em caixas moradia equipadas para registro de atividade com comida e água *ad libitum*.

A análise de Cosinor indicou que o grupo exposto a CL apresentou maiores amplitudes de atividade ($p < 0,05$) e mesor de atividade ($p < 0,01$) quando comparado ao grupo SL. Além disso, não houve diferenças nem de acrofase nem de início e fim do período de atividade entre os grupos. Os resultados indicam que a iluminação teve influência na quantidade de atividade, mas que a forma como ela se distribui durante o período escuro não depende da variação de cor e temperatura da iluminação, mas do tamanho do fotoperíodo.

A variação na temperatura de cor da iluminação usada para mimetizar as variações da luz natural pode ter preparado grupo CL para a chegada da fase escura e, desta forma, conferido certa vantagem de antecipação levando a uma melhora do aproveitamento para a realização de tarefas neste período. Por enquanto, os dados obtidos nos fazem acreditar que a iluminação utilizada nos biotérios pode não ser a ideal para a qualidade e confiabilidade dos estudos experimentais com animais, já que as condições de iluminação observadas atualmente diferem significativamente das encontradas no ambiente.

2. INTRODUÇÃO GERAL

Cronobiologia e o Relógio Biológico

A Cronobiologia - do *cronos* (tempo), *bios* (vida) e *logos* (estudo de)- é a ciência que estuda os ritmos biológicos e por sua multidisciplinaridade, inclui o estudo dos aspectos biológicos da ritmicidade, descrição e quantificação dos ritmos (Wetterberg, 1994). As primeiras investigações a cerca da presença de ritmos circadianos datam de 1729 e tiveram como foco a observação de plantas e apenas a partir do século XX, os estudos se aprofundaram em animais e mamíferos. A presença de ritmos circadianos nos organismos começou a chamar a atenção de cientistas há pouco tempo, pois sua associação intrínseca com sobrevivência e a adaptação dos seres ao ambiente é um fenômeno tão cotidiano que quase não destacava a sua importância até então (Noguera et al., 2007).

Como consequência da tendência natural à oscilação na natureza, encontramos fenômenos cíclicos em todos os níveis: no molecular, celular, de órgãos, individual, social/coletivo, geológico, planetário e no astrofísico. A necessidade evolutiva da ritmicidade entre os organismos vivos se deu em função da alternância dia/noite, já que os primeiros organismos vivos não podiam estar diretamente expostos à luz solar devido a altíssima radiação UV capaz de desnaturar as moléculas de DNA, proteínas e outras estruturas. Desta maneira, a primeira e mais importante adaptação que todos necessitaram fazer foi a de prever as mudanças ambientais através de um relógio biológico, e a partir de então cada ser vivo desenvolveu sua própria estratégia fisiológica e comportamental. (Noguera et al., 2007).

Os seres vivos apresentam diversos processos fisiológicos que apresentam padrão rítmico que contribuem para sua homeostase, já que durante a evolução, desenvolveram uma preparação para explorar uma determinada situação ambiental e evitar grandes perdas energéticas. Para tanto, a existência de um relógio biológico se fez necessária, sendo os ritmos regulados por um marcapasso situado no hipotálamo. Esse relógio interno, mais conhecido como núcleo supraquiasmático (NSQ) teve seu papel na gênese dos ritmos descoberto no ano de 1972, e possui aferências originadas no trato óptico por onde recebe as informações relativas à iluminação ou escuridão do ambiente, sendo responsável por transmitir esse sinal temporal para o resto do corpo (Noguera et al., 2007; Reppert e Weaver, 2002).

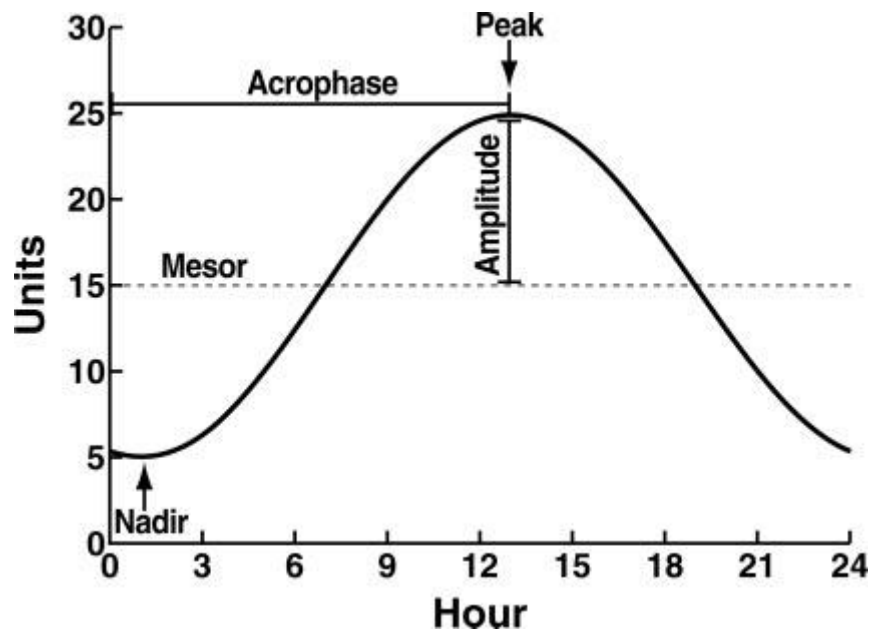
Também existem osciladores periféricos que sustentam a organização circadiana e são capazes de controlar os ciclos de expressão gênica específicos de cada tecido. Esses relógios

locais estão sincronizados entre si e com o horário solar, através de sinais neuroendócrinos e metabólicos que dependem do NSQ (Hastings MH et al., 2003). Com isso, alguns autores comparam esse relógio central ao uma espécie de maestro regendo uma orquestra. Os ritmos precisam estar sincronizados para que o som dos instrumentos juntos seja audível e agradável aos ouvidos. Assim precisam ser os nossos ritmos internos, organizados para que o nosso organismo possa reagir às necessidades diárias da melhor forma possível (Welsh, Takahashi & Kay, 2010; Webb & Oates, 2015).

Ritmos Biológicos

A maioria dos ritmos descritos nos organismos vivos costuma ter alguma correlação com algum tipo de periodicidade característica do ambiente onde vivem. De acordo com sua frequência, esses ritmos podem ser classificados em circadianos, ultradianos e infradianos. Entre os diferentes ritmos biológicos, os mais estudados e mais frequentes nos organismos vivos são os ritmos circadianos (*circa* = cerca de; *diem* = dia) que mesmo na ausência de estímulos ambientais periódicos, se ajustam às variações cíclicas do dia e da noite (Gruart et al., 2002). A variação de temperatura corporal, os níveis de cortisol e melatonina e o rendimento mental são fenômenos ritmos que apresentam frequência circadiana, sendo o ciclo sono-vigília o mais evidente dentre os ritmos circadianos. (LeGates, Fernandez & Hattar, 2014).

A fim de melhor compreender os estudos envolvendo ritmos, é necessário dominar determinadas técnicas analíticas, incluindo técnicas matemáticas e estatísticas. Uma das mais utilizadas é o método de cosinor, que consiste no ajuste dos dados a uma função sinusoidal e posterior representação gráfica dos resultados. Esta análise permite determinar os valores de alguns parâmetros: mesor (valor médio da função), acrofase (fase mais alta) e amplitude (diferença entre o valor máximo da função ajustada e o mesor). Essas variáveis têm grande importância quando se procura avaliar alterações dos ritmos biológicos. Muitos estudos dos ritmos utilizam mesor, acrofase e 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., 2007; O'Dell et al., 2007).



(Extraído de O'Dell et al., 2007)

Luz: principal zeitgeber

Existem alguns elementos ambientais que funcionam como pistas que sincronizam o nosso relógio biológico de acordo com o ambiente que ocupamos. O efeito da luz sobre o nosso ciclo circadiano ou o dos ferormônios sobre o ciclo menstrual, que é circamensal, são exemplos clássicos destas pistas, cientificamente denominadas *zeitgebers* (do alemão *zeit* "tempo" e *geber* "doador") (Grandin, Alloy & Abramson, 2006). Alguns dos *zeitgebers* que comprovadamente têm influência sobre o relógio biológico são o ciclo claro/escuro, alimentação/jejum, interação social, relógios, exercícios, certos remédios, entre outros (Mistlberger & Skene, 2004).

Nos mamíferos, incluindo o homem, o *zeitgeber* com maior capacidade sincronizadora e arrastadora dos ritmos biológicos é a luz (LeGates et al., 2014). Ver a luz do sol no amanhecer pode elevar a pressão arterial e a glicemia em preparação para a rotina, em animais diurnos. Não menos importante, o período do escuro também é essencial para a fisiologia adequada do organismo (Vásquez-Ruiz et al., 2014). A glândula pineal, que recebe inervação do NSQ, produz e libera melatonina na ausência do estímulo luminoso (Reiter RJ, 1991).

A sinalização convencional produzida na retina através de bastonetes e cones pode ser suficiente, mas não é necessária para o arrastamento produzido pela luz. Este é o papel do sistema fotorreceptor com base na melanopsina, fotopigmento expresso em uma subpopulação de células ganglionares da retina (RGCs) que possuem projeções diretas para o

NSQ e outros pontos, mediando a fotorecepção não relacionada a formação da imagem. Na ausência de melanopsina, os RGCs perdem sua fotosensibilidade, estabelecendo essas RGCs como importantes sinalizadoras para o relógio e coloca a melanopsina na cascata de fototransdução circadiana (Menaker, 2003; Hastings MH et al., 2003).

Luz e o processo saúde-doença

Diante da grande influência que a iluminação tem nos organismos vivos, inúmeros processos saúde-doença já foram relacionados à perturbação da ritmicidade circadiana. Estes processos podem ter origem tanto de mudanças naturais de iluminação do ambiente como das provocadas pela ação do homem (Brainard J et al., 2015).

A falta de exposição à luz natural durante o dia e o excesso de iluminação artificial durante a noite predispõe indivíduos a uma ampla gama de distúrbios de humor, incluindo impulsividade, mania e depressão (Salgado-Delgado R et al., 2011; Bedrosian TA e Nelson RJ, 2013). As transições de estações tem importância bastante estudada no metabolismo de mamíferos. Em países do hemisfério norte, o inverno vem acompanhado do aumento de casos de depressão sazonal, resultado da diminuição dos períodos de iluminação do sol.

Com o advento da eletricidade e o crescimento dos espaços urbanos e das demandas de trabalho, ser humano tornou-se capaz de controlar a duração do seu dia e da sua noite independente das variações ambientais e como resultado, o que se percebe, atualmente, é um aumento do “dia” e encurtamento da “noite” (Fonken & Nelson, 2014). Estudos sugerem a associação desta condição de exposição à luz durante a noite com alterações metabólicas significativas, como no caso de trabalhadores de turno, que apresentam maior risco de desenvolver doença cardiovascular e obesidade (Karatsoreos IN et al., 2011; Fonken LK et al., 2013). A população de mulheres também vem sendo alvo de diversos estudos em função dos índices elevados de câncer de mama entre trabalhadoras de turno. Resultados convergentes de pesquisa com cultura celular, roedores e humanos sugerem que as consequências da ruptura circadiana pode provocar danos substanciais. Um modelo experimental inovador tem mostrado que a luz à noite aumenta marcadamente o crescimento de xenoinxertos de câncer da mama humano em ratos (Stevens RG et al., 2014).

Desde que a Science publicou um trabalho que mostrou a supressão da produção de melatonina pela exposição a luz branca durante a noite, além da preocupação em relação a presença de iluminação durante a fase escura, começou-se a pensar nas características dessa

fonte luminosa e diversos estudos procuraram mostrar o impacto do comprimento de onda, intensidade, duração e o período da noite da supressão da melatonina pela luz. Um exemplo é a existência de uma resposta mais intensa de supressão hormonal pode ocorrer se essa luz for caracterizada por um curto comprimento de onda e espectro entre 446 e 477 nm, que tem aparência azul (Stevens et al., 2014; Brainard et al., 2011). Se a falta do escuro prejudica a liberação de melatonina, a exposição à iluminação artificial durante o dia em detrimento da 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).

3. OBJETIVOS

Objetivo geral

Verificar o efeito de uma iluminação apresenta variação de temperatura de cor ao longo da fase clara sobre o ritmo de atividade/repouso de ratos Wistar machos.

Objetivos específicos

- Verificar o padrão de distribuição de atividade dos animais por meio de actogramas.
- Verificar a existência de diferenças entre os parâmetros mesor, amplitude e acrofase na caracterização do ritmo de atividade/repouso dos roedores.

4. ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados preliminares obtidos experimentalmente neste trabalho foram organizados na forma de artigo científico a ser submetido ao periódico “*Lighting Research and Technology*”.

EFFECT OF LIGHT WITH CIRCADIAN RHYTHMICITY IN ACTIVITY / REST RHYTHM OF WISTAR MALE RATS

Melissa Alves Braga de Oliveira^{1,*}, Caroline Luísa Quiles¹, Juliana Castilhos Beauvalet¹,
Maria Paz Loayza Hidalgo^{1,2}

¹ Laboratório de Cronobiologia. Hospital de Clínicas de Porto Alegre - HCPA/Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS. Rua Ramiro Barcelos, Porto Alegre, RS, Brazil.

² Programa de Pós-Graduação em Medicina, Psiquiatria. Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS. Rua Ramiro Barcelos, Porto Alegre, RS, Brazil.

* Corresponding author: Melissa Alves Braga de Oliveira, Laboratório de Cronobiologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Ramiro Barcelos, 2350 sala 12107, 90035-903, Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 51 33598849. E-mail address: meaboliveira@gmail.com

Abstract

The light-dark cycle is the main external clue that synchronizes the circadian system to the environment. However human beings are ceasing organizing their routines according to the transitions between day and night spending most of the day in closed spaces and most of the night exposed to artificial illumination. To oppose the substitution of natural light/dark cycles for artificial illumination with constant characteristics arises the interest in strengthening cyclic signaling to the circadian system through illumination which could mimic the gradual light changes that occur in nature. Presented here is the study developed with male Wistar rats (n=14) kept under light-dark cycle of 16:8 h since birthday and divided in two groups according to the type of illumination they were exposed during lights-on phase: circadian light and standard light. Activity/rest recordings from around 20 days were analyzed for each animal. The cosinor analysis indicated that the group exposed to circadian light presented higher activity amplitudes ($p<0,05$) and activity mesor ($p<0,01$) if compared to standard light group. The variation in the illumination temperature of color used to mime natural daylight variations may have prepared circadian light group for the arrival of the dark and can be related to certain advantage to better accomplish their activities. Results obtained reinforce the importance of light as an important clue to the regulation of physiology and behavior. Thus the lighting currently used in the housing of experimental animals may not be the best way to mimic natural environment according to the differences between groups. The use of a circadian light could increase the reliability of studies conducted with experimental animals and for future perspective could be used by hospitals and offices where often is not possible to have contact with natural light.

Keywords: Circadian light, activity/rest rhythm, animal model

1. Introduction

Besides sleep-wake cycles, various physiological and behavioral processes occur in a rhythmic way. Human beings are sustained by a circadian system which coordinates the internal oscillators in different organs and organizes bodily functions for the most adequate response to external stimuli (Bechtold et al, 2010).

The light-dark cycle (LD) is the main external clue that synchronizes the circadian system to the environment. As result, humans tend to be active during day (light) and to rest during night (dark) (Eisenstein, 2013; de Souza & Hidalgo, 2014). However, with electrical energy at our disposal and growing work demands, human beings are ceasing organizing their routines according to the transitions between day and night ruled by Earth's rotation, and this is inducing body processes to happen at times of the day different from the preferential. Since it became possible to choose when the day starts and when it ends despite natural transitions, a considerable number of people spend most of the day in closed spaces, with little exposition to natural light, and most of the night exposed to artificial illumination (Bedrosian and Nelson, 2013).

Synchronization to the environment is done mainly by the master circadian pacemaker in mammalian brain: the suprachiasmatic nucleus (SQN). Retinal ganglion cells are photosensitive and transduce photic signals to the SQN which, through a neuroendocrine link with the pineal gland, controls several physiological processes by synthesis of melatonin hormone. The quantity of pineal gland activity and melatonin secretion varies cyclically, being inhibited by light and markedly stimulated by dark, informing the organism that night fell (Reiter, 1991).

Thus, ocular light exposure induces a range of circadian, neuroendocrine, and neurobehavioral responses, including circadian phase resetting, melatonin suppression, and enhancement of alertness and performance (Rahman et al., 2014). There is evidence of the

role played by rhythm alterations originated from inadequate light exposition, also called light pollution, in the etiology of many pathologies including inflammation, metabolic diseases and cancer (Bittencourt et al., 2010; Haus & Smolensky, 2006; Roenneberg et al., 2012).

It has been shown that the way the organism reacts to illumination depends not only of the presence or absence of the light, but of aspects like its wave length. For example, shorter wave length and higher temperature (blue) lights activate strongly the SQN and block melatonin synthesis, not being the best choice for illumination at night (Brainard et al., 2011; West et al., 2011). Also been exposed to natural light in the place of artificial light have important biological effects. A study developed with hospital employees showed subjects who worked most of their time under electrical lighting presented higher levels of melatonin at morning, lower levels of melatonin at night and higher cortisol levels at night than subjects who work in a place with a window. The results obtained might reflect signs of chronodisruption, as increased levels of cortisol and lower levels of melatonin are related to several diseases (Harb et al., 2015).

Nowadays, the objectives of illumination in architecture are: optimize visual performance; provide visual comfort; allow aesthetical appreciation of the ambient; and preserve energy (Lucas et al, 2014). Since the influence of light in human physiology and behavior is clear, it is important to consider the effects of light in the circadian system when designing areas. To oppose the substitution of natural light/dark cycles for artificial illumination with constant characteristics arises the interest in strengthening cyclic signaling to the circadian system through illumination which could mimic the gradual light changes that occur in nature. This way, the concept of circadian light arises as an electromagnetic stimulus capable of stimulate the circadian system rather than produce visual responses (Rea et al., 2010) and the aim of this study was investigate the effect of a light with a variable wavelength along the light phase on activity / rest rhythms of rodents.

2. Material and Methods

Experimental Animals

Experiments were performed with male Wistar rats (n=14) obtained from Unidade de Experimentação Animal (UEA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Pregnant female rats were kept under 12:12 LD cycle with lighting normally used in UEA during all pregnancy. On each birthday, cages with mother and pups were allocated in photoperiod station under the same controlled temperature (22 ± 2 °C), humidity and noise exposure but with illumination according to circadian light group (CL) or standard light group (SL). Animals were kept under 16:8 h LD cycle with lights off at 9 am. After 21 days young rats were individually housed with food and water *ad libitum* in transparent acrylic home-cages (Panlab Harvard Apparatus; 25 x 15 x 25cm) couple to equipment for activity detection and remained at the same conditions during more 20 days. 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 15-0059 - GPPG/HCPA).

Intervention: Circadian Light

Pregnant female rats were randomly assigned to CL or SL group and after delivering pups were placed in the correspondent lighted chamber of photoperiod station. The CL group (n=6) was composed by 4 animals from the same litter and 2 from other, while all animals from SL group (n=8) came from the same litter.

In order to try to reproduce human light exposition daily pattern and following protocols already established, the two groups were exposed to a photoperiod of 16 hours light and 8 hours dark throughout the study (Workman et al 2011; Otsuka T. et al 2014). The photoperiod station has four separate independent chambers wherein two of them are attached

to fluorescent light that have no variation during the period they are on (SL). On the other hand other two chambers were equipped with specials LED luminaries that we called “Circadian Light” as the intention was to mimic ambient daily light changes and were designed and provided by *Luxion Iluminação* (**Fig. 1**).

These lamps have 1500 lumens and are powered with 10W. The intensity of these equipments scheduled to be linear and so have 1500 lm regardless of color. The temperature ranges from 2700 K to 6500 K. The lamps are set to pass through 32 changes of 6.25% of its current in each LED. The light from lamps will have changes will have changes in color temperature from 2700 K to 6500 K that should last 8 hours and after that returns up to 2700 K during more 8 hours.

Rhythm Characterization

Rest-activity: The activity rhythm of each animal was monitored daily every 10 minutes by actigraphy (ADNplin- © Antoni Díez Noguera, Barcelona, AC, Spain). This device emits two laser beams that cross the animal’s home-cage longitudinally and transversely and are detected by receivers on the opposite face of the cage. When a beam is interrupted by the interposition of the animal when it moves, one locomotion unit is recorded. Each device is connected to a board responsible for converting its information to digital format and sending them to a computer, where the data can be accessed at DAS192USB program. The recordings of activity were converted into Excel files and organized in order to prepare data for analysis using specific software to measure rhythmicity parameters.

Statistical Analysis

The evaluation of rhythms was performed using the integrated program of Chronobiology El Temps (A. Díez-Noguera, Universitat de Barcelona, 1999) to calculate

rhythmicity parameters - amplitude, acrophase, mesor and VE% of the activity recordings - through cosinor analysis, as well as to run Rayleigh tests for acrophases and to generate actograms and perform *two flanks* and *partial sum* analysis.

Comparison of mesor, amplitude and acrophase between groups was performed using nonparametric test Kruskal Wallis. Comparison of activity sum in dark and light phases among group was performed by Mann-Whitney nonparametric test. The results are presented as the group median (\pm SEM) with the statistical significance level set at $p \leq 0.05$. Graphics were generated in GraphPad Prism 5 software and analyses were performed using SPSS 18.0 software (SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

3. Results

Data obtained from actigraphy enable the characterization of animal's rest/activity rhythms. **Figure 2** shows the derived actogram generated from the overlap of all actograms obtained. In addition to showing greater amount of activity in the CL group during the dark in comparison to SL, derived actogram suggests that from the seventh day of activity log, corresponding to the thirtieth day of animal's life this difference is more obvious.

The cosinor analysis provided activity acrophases values of each group. Rayleigh test plotted this data into and circular distribution and its possible to compare this variable between groups (**Fig. 3**). As it shows, acrophases do not differ according to the lighting type. The cosinor analysis also indicated that the group exposed to CL presented higher activity amplitudes ($p=0,02$) and activity mesor ($p=0,005$) if compared to SL group (**Fig. 4**). When plotting amplitude in a line is possible to see that during all days of the experiment the group CL shows higher amplitudes in comparison to SL group (**Fig. 5**).

In order to further analyze the distribution and amount of activity we proceed with the *two flanks* and *partial sum* analysis. The higher activity mesor observed in CL group agrees with the *partial sum* analysis that shows the total sum of activity calculated from number of

beam's interruptions. Both in dark phase (CL 2341 ± 135 , 2; SL 1847 ± 91 , 72; $P < 0,01$) and light phase (CL 1044 ± 117 ; SL $892 \pm 20,85$; $P < 0,01$) the CL group presented elevated medians than SL group. (**Fig. 6**). *Two flank* analyses showed similar activity beginning and end during the around the dark phase (**Fig. 7**).

4. Discussion

The results here presented reflect a work in progress toward the development of a circadian light and evaluation of its effects on physiology e behavior of rodents. Despite short period of activity data analyzed so far, significant differences in activity amplitude and mesor were observed.

As seen in a previous study developed by our research group with Wistar male rats, activity and temperature were modified according to the length of light and darkness showing that light duration is capable to change both behavior and physiological patterns in rodents (Quiles et al., 2014). The same adaptation can be seen in the results here presented, so that activity follows very well the 8 hour dark phase. According to this previous study, there is a high probability that body temperature also be elevated in these animals following activity pattern (Scheer et al., 2005).

The amplitude of a rhythm is the variation of the same during the study period. What is expected from the assessment of the activity amplitude of an organism with normal physiology is that it indicates the robustness of this rhythm by means of high amplitude. The activity rhythm is considered to be robust considering its pattern during the animal's 24-hour-day influenced by light/dark cycle: markedly active at night and with little movement during the day. As activity of both groups followed light/dark cycle and exposition to circadian light was the only difference between groups, activity amplitude was detected among them and was higher in CL. Variations in the color temperature of illumination used to mime natural

daylight transitions may have prepared CL group for the arrival of the dark phase. The increase in the amplitude could be related to animals taking advantage of being able to predict the beginning of the night and better accomplish their activities.

Beyond amplitudes, higher activity mesor and activity sum in CL group underlie what was seen in actograms. It is important to consider that results here discussed belong to nocturnal animals. Therefore activity behavior seen in CL group during the dark might be even more evident during the light phase in diurnal animals.

The fact activity acrophases occur at the same time among group showed there was no phase shift and so activity distribution across dark phase depends on the length of light phase and not on variations of illumination. This result is also supported by *two flanks* analysis that did not showed difference in the activity period allocation.

Besides the fact some researchers are focusing in devices for measurement of circadian light exposure in order to better quantify light effects on sleep and behavior (Figueiro et al., 2011), studies developing special lighting technologies are still poor. Analyzing the circadian light concept, the results presented here cannot describe all the effects of this light equipment on the circadian system. As a perspective, hormone levels, weight gain data, inflammatory interleukins dosages and behavioral tests will be included as analyzes to be held.

Results obtained reinforce the importance of light as an important clue to the regulation of physiology and behavior. Thus the lighting currently used in the housing of experimental animals may not be the best way to mimic natural environment according to the differences between groups. The use of a circadian light could increase the reliability of studies conducted with experimental animals.

Finally, we expect that this light technology designed for this study could be improved and in the future used by hospitals and offices where often is not possible to have contact with natural light.

Acknowledgements

The authors acknowledge Celso Tissot from Luxion Iluminação for the partnership, Marta Cioato and Fernanda Soldatelli Valente from Animal Experimentation Unit (UEA) of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre - HCPA for technical and logistical support. The study was also supported by Incentive Fund to Research and Events (FIPE – HCPA) and National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq - UFRGS).

References

Bechtold DA, Gibbs JE, Loudon AS. Circadian dysfunction in disease. *Trends Pharmacol Sci.* 2010 May;31(5):191-8.

Bedrosian TA, Vaughn CA, Galan A, Daye G, Weil ZM, Nelson RJ. Nocturnal light exposure impairs affective responses in a wavelength-dependent manner. *J Neurosci.* 2013 Aug 7;33(32):13081-7.

Bittencourt LR, Santos-Silva R, de Mello MT, Andersen ML, Tufik S. Chronobiological disorders: current and prevalent conditions. *J Occup Rehabil.* 2010 Mar;20(1):21-32.

Quiles CL, Oliveira MAB, Piazza FV, Pilz LK, Hidalgo MP. Mudança de fotoperíodo: proposta de modelo experimental. *Clinical & Biomedical Research* 2014 Out [S.l.], v. 34, n. 3.

Eisenstein M. Chronobiology: stepping out of time. *Nature*. 2013 May 23;497(7450):S10-2

Figueiro M, Brons J, Plitnick B, Donlan B, Leslie R, Rea M. Measuring circadian light and its impact on adolescents. *Light Res Technol*. 2011 Jun;43(2):201-215.

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.

Haus E, Smolensky M. Biological clocks and shift work: circadian dysregulation and potential long-term effects. *Cancer Causes Control*. 2006 May;17(4):489-500.

Lucas RJ, Peirson SN, Berson DM, Brown TM, Cooper HM, Czeisler CA, Figueiro MG, Gamlin PD, Lockley SW, O'Hagan JB, Price LL, Provencio I, Skene DJ, Brainard GC. Measuring and using light in the melanopsin age. *Trends Neurosci*. 2014 Jan;37(1):1-9.

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.

Rahman SA, Flynn-Evans EE, Aeschbach D, Brainard GC, Czeisler CA, Lockley SW. Diurnal spectral sensitivity of the acute alerting effects of light. *Sleep*. 2014 Feb 1;37(2):271-81.

Rea MS, Figueiro MG, Bierman A, Bullough JD. Circadian light. *Journal of Circadian Rhythms*. 2010;8:2.

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

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.

West KE, Jablonski MR, Warfield B, Cecil KS, James M, Ayers MA, Maida J, Bowen C, Sliney DH, Rollag MD, Hanifin JP, Brainard GC. Blue light from light-emitting diodes elicits a dose-dependent suppression of melatonin in humans. *J Appl Physiol* (1985). 2011 Mar;110(3):619-26.

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

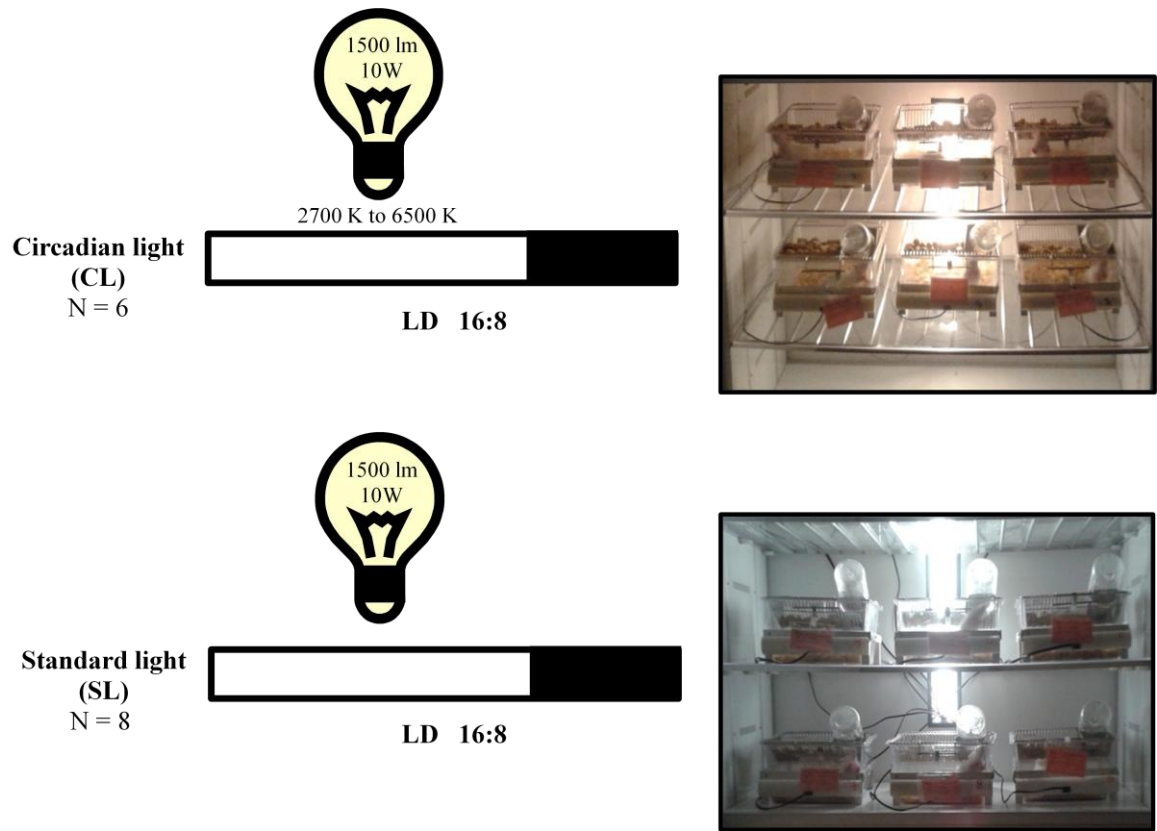


Figure 1. Study Groups and Lighting Characteristics.

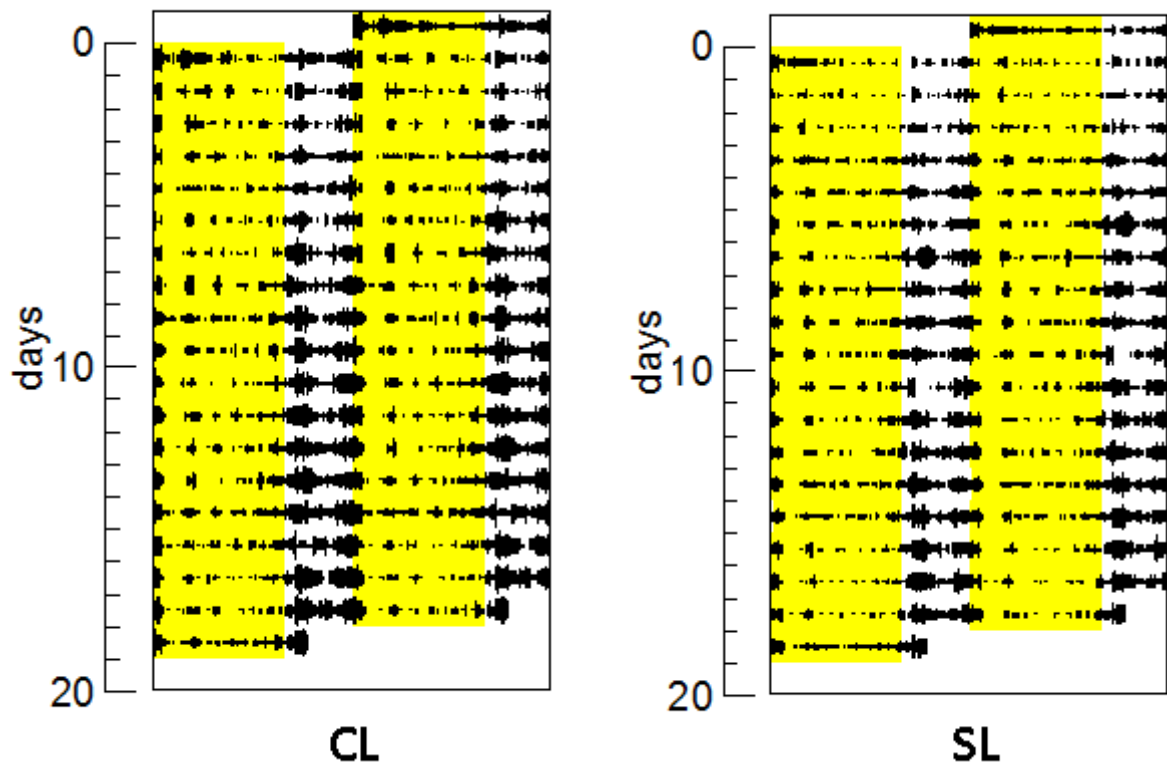


Figure 2: Effect of the exposition to circadian illumination in rest-activity rhythm.

Derived obtained from the overlap of all double-plot actograms in each group showed daily variance of activity (black) throughout the experiment days. Lights-on periods are shown in yellow. The rest-activity patterns are similar between groups and no phase advance is observed. However is possible to see the greater amount of activity during the dark phase in the group exposed to circadian light in comparison to the group exposed to standard illumination. CL= circadian light; SL= standard light.

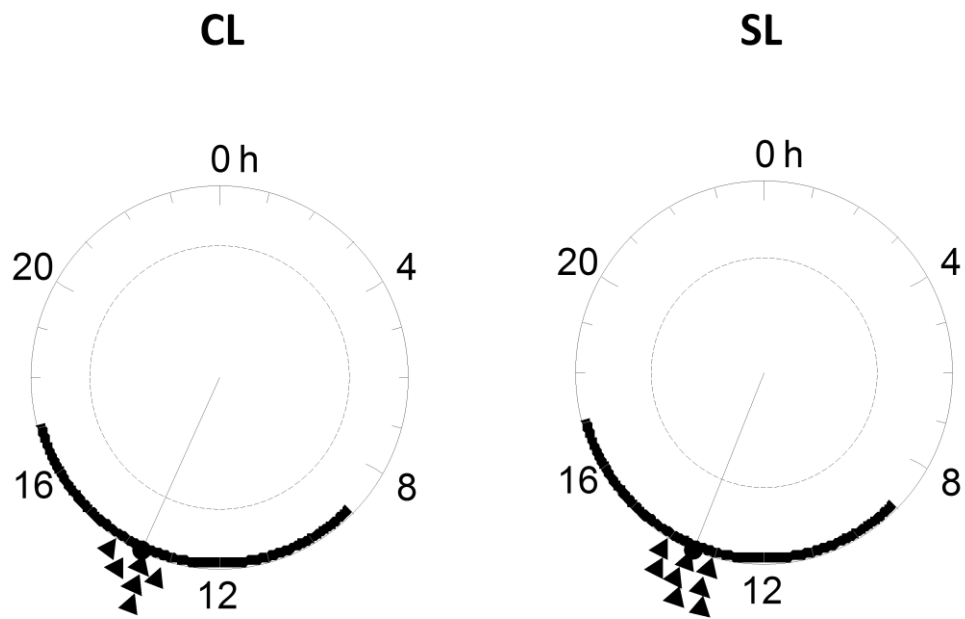


Figure 3: Acrophases of activity rhythm. Rayleigh tests of activity acrophases (black triangles) demonstrating they remained in the middle of the dark phase (9:00 am - 17:00 pm) in both groups. CL= circadian light; SL= standard light.

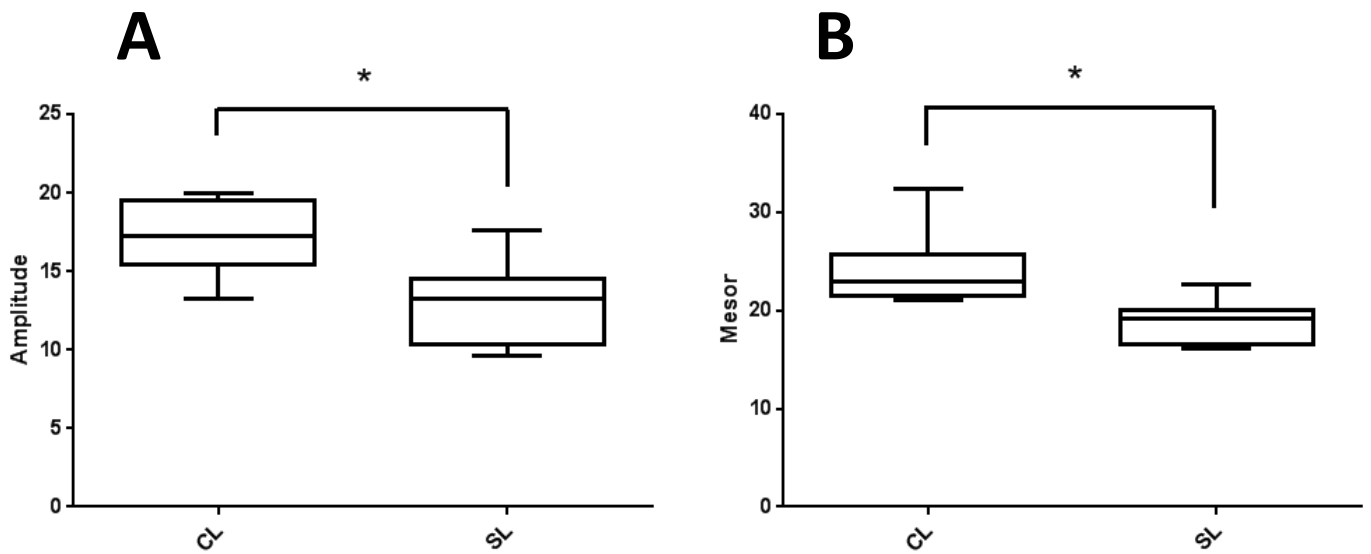


Figure 4. Activity amplitude and mesor. (A) Activity amplitude: the CL group showed significantly higher activity amplitude compared to the SL group. Data presented in median (\pm SEM) * $p = 0.02$, Kruskal Wallis test. (B) Activity mesor: the CL group showed significantly higher activity mesor compared to the SL group. Data presented in median (\pm SEM) * $p = 0.005$, Kruskal Wallis test. CL= circadian light; SL= standard light.

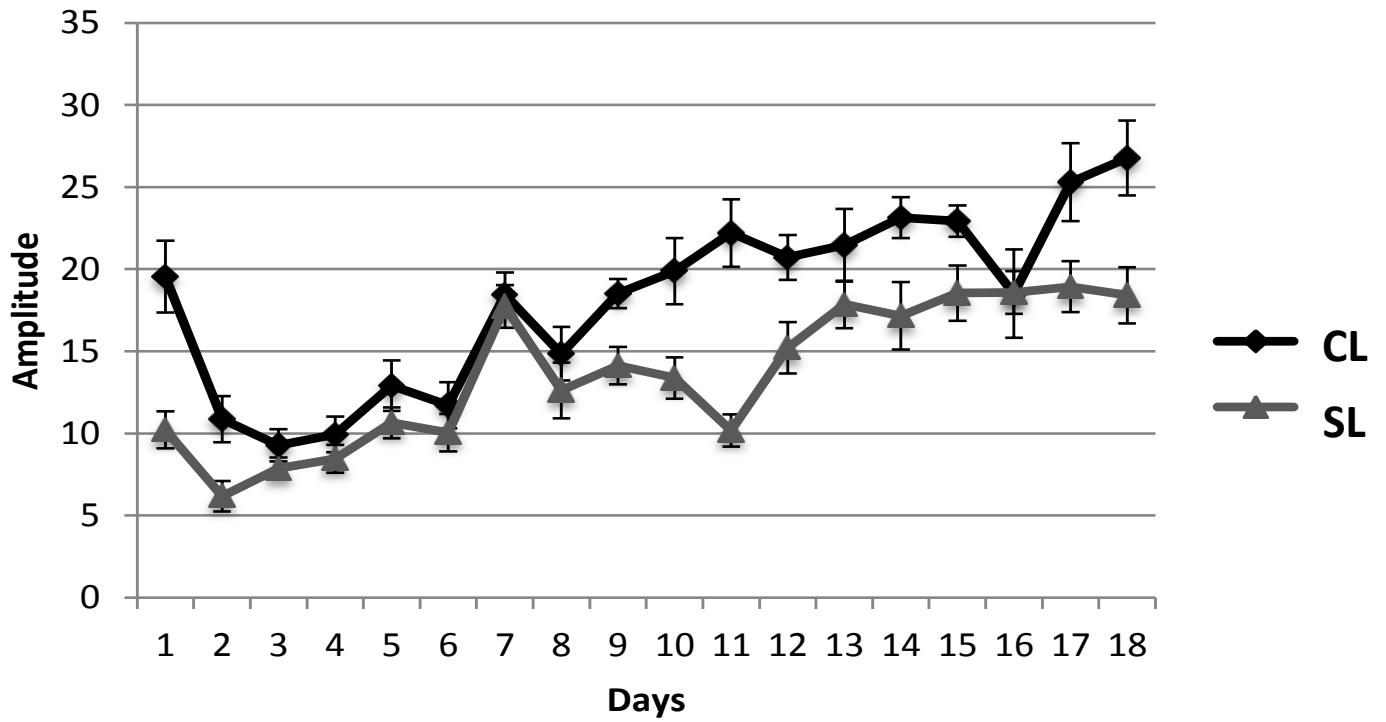


Figure 5. Activity amplitude variation during experiment days. Data presented in mean (\pm SEM). CL= circadian light; SL= standard light.

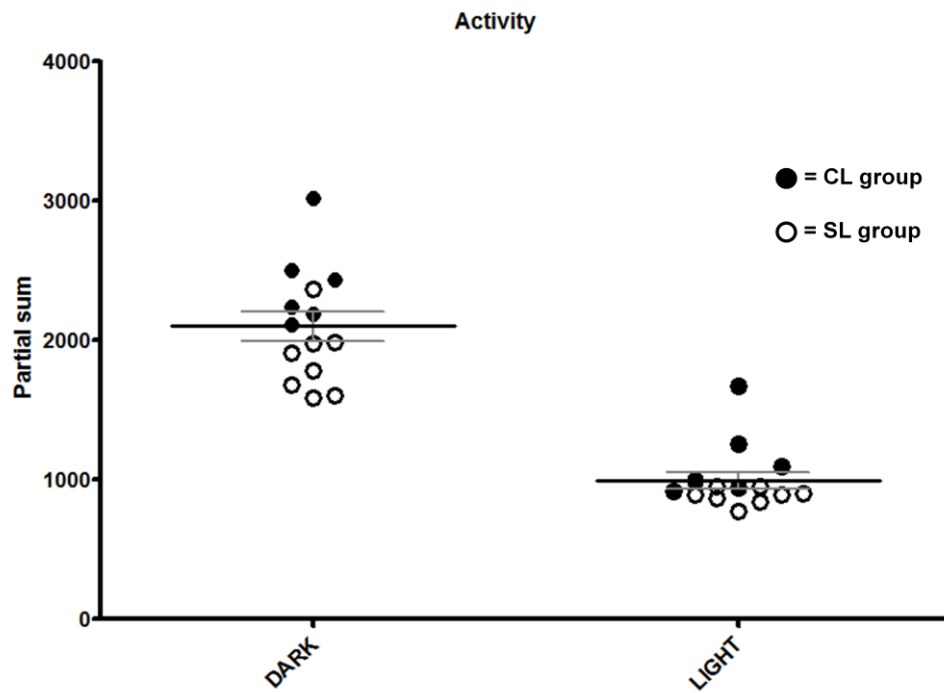


Figure 6. Partial activity sum. *Partial sum* analysis indicating higher activity levels on CL group both in dark and light phases. CL= circadian light; SL= standard light.

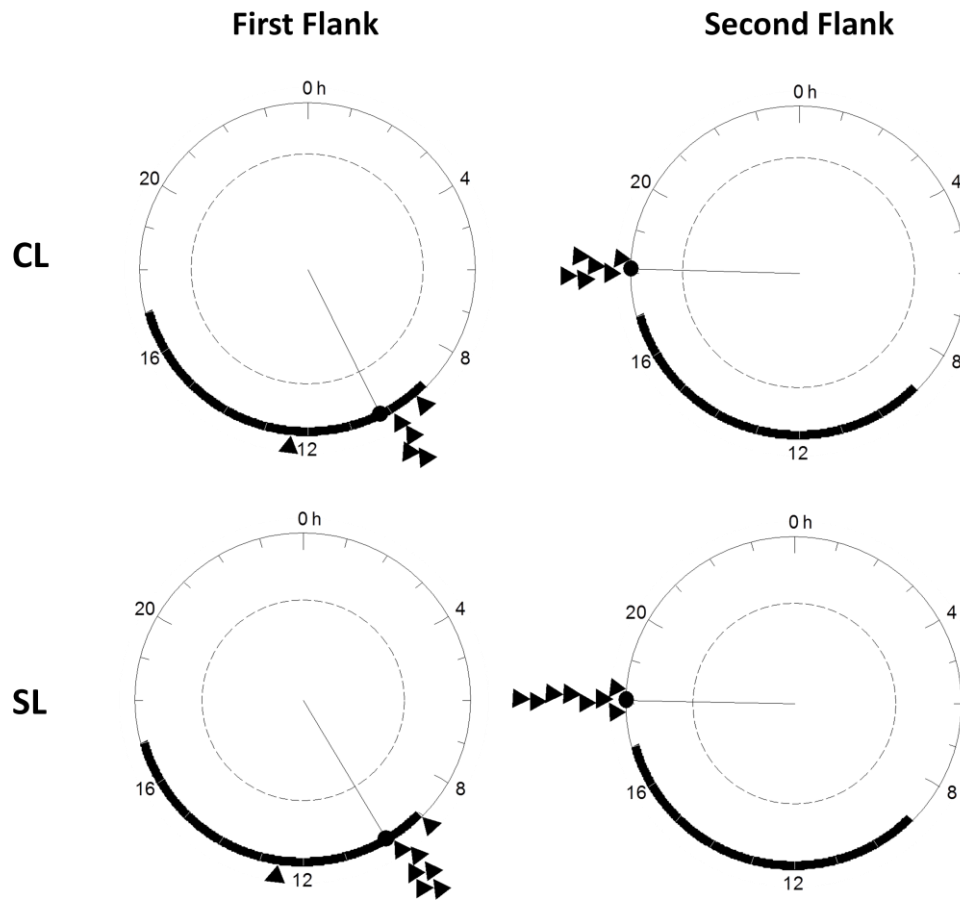


Figure 7. Beginning and end of activity period among CL and SL groups. Two flanks and Rayleigh analysis showing the beginning and end of activity period do not vary among groups. CL= circadian light; SL= standard light.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos sugerem que a exposição a uma fonte luminosa que mimetize as variações gradativas de luz que são observadas no ambiente pode influenciar os níveis de atividade durante a fase escura de roedores. O aumento da variação e da quantidade de atividade observada no grupo LC pode ser um reflexo de uma preparação para o período ativo provocado pela iluminação, que pode representar uma vantagem para o animal que consegue prevê mais facilmente a chegada da noite.

Os dados preliminares aqui apresentados fazem parte de um projeto em parceria com a empresa *Luxion Iluminação*. Vários outros parâmetros ainda serão avaliados ao final do estudo, como ganho de peso, consumo de alimento, comportamento e quantificação de hormônios e interleucinas. A ideia central é avaliar em modelo animal os efeitos desse sistema de iluminação.

Como perspectiva futura, esperamos que essa tecnologia de iluminação possa ser melhorada e adaptada para utilização em leitos hospitalares e ambientes de trabalho, reduzindo os efeitos indesejados ocasionados pela iluminação artificial constante em locais fechados sem janela.

6. REFERÊNCIAS GERAIS

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

Brainard J, Gobel M, Scott B, Koeppen M, Eckle T. Health implications of disrupted circadian rhythms and the potential for daylight as therapy. *Anesthesiology*. 2015 May; 122(5):1170-5.

Fonken LK, Aubrecht TG, Meléndez-Fernández OH, Weil ZM, Nelson RJ. Dim light at night disrupts molecular circadian rhythms and increases body weight. *J Biol Rhythms*. 2013 Aug; 28(4):262-71.

Fonken LK, Nelson RJ. The effects of light at night on circadian clocks and metabolism. *Endocr Rev*. 2014 Aug;35(4):648-70. doi: 10.1210/er.2013-1051. Epub 2014 Mar 27. Review.

Grandin LD, Alloy LB, Abramson LY. The social zeitgeber theory, circadian rhythms, and mood disorders: review and evaluation. *Clin Psychol Rev*. 2006 Oct;26(6):679-94.

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. Review

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.

LeGates TA, Fernandez DC, Hattar S. Light as a central modulator of circadian rhythms, sleep and affect. *Nat Rev Neurosci*. 2014 Jul; 15(7):443-54.

Menaker, M. Circadian rhythms. Circadian photoreception. A contemporary mini-review of the breakthrough findings that melanopsin and melanopsin-containing retinal ganglion cells are components of the circadian photoreceptive pathway in mammals. *Science*. 2003. 299, 213–214 2003

Mistlberger RE, Skene DJ. Social influences on mammalian circadian rhythms: animal and human studies. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 2004 Aug;79(3):533-56. Review.

Noguera AD, Riu TC, Hortensi JV, Cucurela NC. *Cronobiologia*. Editora Livre. 2007

O'Dell LE, Chen SA, Smith RT, Specio SE, Balster RL, Paterson NE, Markou A, Zorrilla EP, Koob GF. Extended access to nicotine self-administration leads to dependence: Circadian measures, withdrawal measures, and extinction behavior in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007 Jan; 320(1):180-93.

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

Reppert SM, Weaver DR. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature.* 2002 Aug 29; 418(6901):935-41. Review.

Salgado-Delgado R, Tapia Osorio A, Sadari N, Escobar C. Disruption of circadian rhythms: a crucial factor in the etiology of depression. *Depress Res Treat.* 2011; 2011:839743.

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 May-Jun ;64(3):207-18. Review.

Vásquez-Ruiz S, Maya-Barrios JA, Torres-Narváez P, Vega-Martínez BR, Rojas-Granados A, Escobar C, Angeles-Castellanos M. A light/dark cycle in the NICU accelerates body weight gain and shortens time to discharge in preterm infants. *Early Hum Dev.* 2014 Sep;90(9):535-40.

Webb AB, Oates AC. Timing by rhythms: Daily clocks and developmental rulers. *Dev Growth Differ.* 2015 Nov 6.

Welsh DK, Takahashi JS, Kay SA. Suprachiasmatic nucleus: cell autonomy and

network properties. *Annu Rev Physiol.* 2010;72:551-77.

West KE, Jablonski MR, Warfield B, Cecil KS, James M, Ayers MA, Maida J, Bowen C, Sliney DH, Rollag MD, Hanifin JP, Brainard GC. Blue light from light-emitting diodes elicits a dose-dependent suppression of melatonin in humans. *J ApplPhysiol* (1985). 2011 Mar; 110(3):619-26.

Wetterberg L. Light and biological rhythms. *J Intern Med.* 1994 Jan;235(1):5-19. Review.