

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE  
CENTRO DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOBIOLOGIA

ROSANE MARIA SIMON LAMPERT DIAS

**Efeito do comprimento de onda e da intensidade da luz sobre o  
ritmo circadiano de atividade motora em saguis  
(*Callithrix jacchus*)**

NATAL

2016

ROSANE MARIA SIMON LAMPERT DIAS

EFEITO DO COMPRIMENTO DE ONDA E DA INTENSIDADE DA LUZ  
SOBRE O RITMO CIRCADIANO DE ATIVIDADE MOTORA EM SAGUIS  
(*Callithrix jacchus*)

Tese apresentada à Universidade Federal do Rio Grande do Norte, para obtenção do título de Doutor em Psicobiologia.

*Orientadora: Profa. Dra. Carolina Virginia Macêdo de Azevedo*

*Co-Orientador: Prof. Dr. Alexandre Augusto de Lara Menezes*

Natal

2016

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN  
Sistema de Bibliotecas - SISBI  
Catalogação de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial do Centro de Biociências - CB

Dias, Rosane Maria Simon Lampert.

Efeito do comprimento de onda e da intensidade da luz sobre o ritmo circadiano de atividade motora em saguis (*Callithrix jacchus*) / Rosane Maria Simon Lampert Dias. - Natal, 2016.  
114 f.: il.

Orientadora: Profa. Dra. Carolina Virgínia Macêdo de Azevedo.  
Coorientador: Prof. Dr. Alexandre Augusto de Lara Menezes.  
Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia

1. Comprimento de onda da luz - Tese. 2. Fotoarrastamento - Tese. 3. Primatas diurnos - Tese. 4. *Callithrix jacchus* - Tese.  
I. Azevedo, Carolina Virgínia Macêdo de. II. Menezes, Alexandre Augusto de Lara. III. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. IV. Título.

RN/UF/BSE-CB

CDU 62-533.52

EFEITO DO COMPRIMENTO DE ONDA E DA INTENSIDADE DA LUZ SOBRE O  
RITMO CIRCADIANO DE ATIVIDADE MOTORA EM SAGUIS  
(*Callithrix jacchus*)

ROSANE MARIA SIMON LAMPERT DIAS

Data da apresentação: 29/07/2016

Banca examinadora:

---

Profa. Dra. Gisele Akemi Oda  
Universidade de São Paulo, SP.

---

Profa. Dra. Christiane Andressa da Silva  
Universidade Federal da Paraíba, PB.

---

Prof. Dr. John Fontenele Araújo  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte, RN.

---

Prof. Dra. Rovena Clara Galvão Januário Engelberth  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte, RN.

---

Profa. Dra. Carolina V. M. de Azevedo (orientadora)  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte, RN.

*Pos meus dois amores: Geomar e Louise*

## AGRADECIMENTOS

Impossível começar os “Agradecimentos” sem pensar na minha orientadora, a professora Carolina Virgínia Macedo de Azevedo, a Carol. Eu a considero a grande responsável por essa caminhada. Somente quem tem o privilégio de conviver com ela sabe de seu envolvimento, sua dedicação integral, seu exemplo. *Carol, você ampliou meus limites e me deu serenidade e força para seguir em frente. Devo essa jornada a você. Obrigada, de todo o coração.*

Ao querido professor Alexandre, meu orientador no mestrado e co-orientador, pelos ensinamentos e exemplo de vida. Tenho muito orgulho de ter sido sua aluna.

Um agradecimento muito especial aos professores Daniel Pessoa e Marconi Câmara, que acompanharam este estudo e estiveram disponíveis todas as vezes que precisei de ajuda.

Também aos professores John Araújo e Jeferson Cavalcante, pelas sugestões na submissão do projeto e qualificação da tese.

E aos professores Gisele Oda, Crhisthiane Andressa, John Araújo e Rovena Engelberth, que gentilmente aceitaram participar desta banca examinadora.

Agradeço ainda aos demais professores do Departamento de Fisiologia, em especial aos professores Fívia Lopes e Arrilton Araujo.

Aos funcionários do LEAP da UFRN, principalmente Janaína, Ednólia, Tota e Luís, pelo auxílio ao longo desse trabalho.

Aos meus queridos colegas: Jonathas, Sabinne, Maria Luíza e Edileusa, que dividiram comigo três anos de coleta de dados: *Sempre serei grata a vocês.*

E aos demais colegas da Pós: Galileu, Jacke, Camila, Karlyne, Jane, Paula e Aline, pelas risadas, descontração, incentivo e pelos bons momentos divididos. E claro, um agradecimento especial para a Fabi, que me conduziu pelos labirintos do “*El Temps*”, e sempre sorrindo suportou minhas frustrações...

Muitas vezes, ao longo desse caminho, cansada e desanimada, encontrei apoio em três grandes amigas, que tenho a sorte de ter: *Jura, Lili e Chris, vocês são tão diferentes e tão especiais em minha vida. Obrigada pelo apoio, pela amizade, pelas risadas!*

Ao Gui, meu querido sobrinho que atravessou o Brasil para cuidar de Louise, quando precisei.

E ao Gustavo, o sobrinho mais fofo do mundo: quantas vezes parei tudo para olhar uma foto ou um vídeo dele, tomando forças para as madrugadas insones.

À minha querida mãe, Terezinha, sempre tão longe e tão perto, sempre presente, torcendo e acreditando... *Obrigada por ser uma mãe tão maravilhosa.*

Para minha linda e amada filha, que tantas e tantas vezes abriu mão de minha companhia em prol desse trabalho: *Louise, você é o que há de mais belo em minha vida e agradeço a Deus todos os dias por ter você como filha.*

E ao Geomar, que esteve tão privado de sono quanto eu... E cedeu sextas, sábados, domingos, férias e feriados aos saguis, artigos, análises e noites em claro: *“Obrigada por sonhar os meus sonhos. (E pela Nespresso!) Te amo demais”.*

A vida é o dever que nós trouxemos para fazer em casa.  
Quando se vê, já são seis horas!  
Quando se vê, já é sexta-feira!  
Quando se vê, já é natal...  
Quando se vê, já terminou o ano...  
Quando se vê perdemos o amor da nossa vida.  
Quando se vê passaram 50 anos!  
Agora é tarde demais para ser reprovado...  
Se me fosse dado um dia, outra oportunidade, eu nem olhava o relógio.  
Seguiria sempre em frente e iria jogando pelo caminho a casca dourada e inútil das horas...  
Seguraria o amor que está a minha frente e diria que eu o amo...

*Trecho do poema "O tempo," de Mario Quintana*

## RESUMO

O fotoarrastamento circadiano depende de uma complexa interação entre informação luminosa e células fotorreceptoras. Os efeitos circadianos neurocomportamentais da luz são mediados primariamente pelas células ganglionares da retina. Cones e bastonetes operam na detecção de luz e também interferem no sistema de temporização circadiana, mas o modo de ação desses fotorreceptores no controle dos ciclos circadianos em primatas não-humanos diurnos é desconhecido. Nosso estudo avaliou o efeito do comprimento de onda e intensidade de luz sobre os parâmetros do ritmo circadiano de atividade (RCA) em saguis, verificando o efeito dos comprimentos de onda curtos e longos da luz, em três intensidades de iluminação. A atividade locomotora de 16 saguis machos adultos mantidos em temperatura e umidade controladas, submetidos a um ciclo claro/escuro (CE) 12:12, foi monitorada por sensor infravermelho. Foi avaliado o efeito de dois comprimentos de onda na fase de claro: curto, com  $\lambda_{max}$  463 nm – na região espectral da luz azul, e longo: com  $\lambda_{max}$  631 nm – na região espectral da luz vermelha, em três intensidades de iluminação: 200, 100 e 10 lux, em relação à condição controle, feita com luz fluorescente. Ao final de cada etapa (azul, vermelha e fluorescente), os saguis eram mantidos em claro constante (CC) em 10 e 200 lux, para verificar os mecanismos de sincronização. Entre as etapas com diferentes comprimentos de onda, ocorreu um intervalo com duração de 15 dias (luz fluorescente – 200 lux/2 lux). Os resultados evidenciaram que o ângulo de fase do final da fase ativa foi antecipado, e a duração da fase ativa e o total de atividade diária foram menores durante a exposição dos animais às luzes azuis e vermelhas em relação ao controle, com modulações em 10 lux. Houve aumento na potência espectral do período circadiano durante o uso das luzes azuis e vermelhas em CC na intensidade de 200 lux. Também observamos que a duração do experimento modifica a expressão do ritmo circadiano de atividade, possivelmente por afetar os mecanismos de fotorrecepção dos saguis. A partir destes resultados sugere-se que: 1) os comprimentos de onda azul e vermelho da luz utilizada nos ciclos CE modificam a expressão endógena e a sincronização fótica do RCA em saguis; 2) os animais respondem de modo distinto aos comprimentos de onda azul e vermelho da luz no início e fim da fase ativa, com maior antecipação no final da fase ativa, reduzindo a duração da fase ativa e o total de atividade diária, provavelmente por um efeito de mascaramento do ritmo; 3) O efeito do comprimento de onda varia em função da intensidade de luz, sem diferenças entre as intensidades de 200 e 100 lux, com maior instabilidade em 10 lux; 4) a duração da exposição dos animais aos comprimentos de onda azul e vermelho é um fator a ser considerado na construção de protocolos experimentais com essa espécie.

**Palavras-chave:** Comprimento de onda da luz; Fotoarrastamento; Primatas diurnos; *Callithrix jacchus*.

## ABSTRACT

Circadian entrainment depends on a complex interaction between light information and photoreceptor cells. The neurobehavioral circadian light effects are mediated primarily by retinal ganglion cells. Rods and cones operate in light detection and also interfere in the circadian timing system, but the mode of action of these photoreceptors in the control of circadian rhythms in diurnal non-human primates is unknown. Our study evaluated the effect of wavelength and intensity of light on parameters of the circadian activity rhythm in marmosets by analyzing the effect of short and long wavelengths of light in three light intensities. The locomotor activity was monitored by infrared sensors in 16 adult male marmosets, kept in controlled temperature and humidity in a light/dark (LD) cycle 12:12. The effect of two wavelengths in light phase were evaluated: short, with  $\lambda_{\max}$  463 nm - in the spectral region of blue light, and long: with  $\lambda_{\max}$  631 nm - in the spectral region of red light, in three light intensities: 200, 100 and 10 lux, in relation to control condition (fluorescent light). At the end of each stage, the marmosets were maintained in constant light (LL) under 10 lux and 200, to analyze the mechanisms of synchronization. An interval lasting 15 days (fluorescent light - 200 lux/2 lux) was given between the stages with different wavelengths. During the exposure to blue and red lights, the phase angle of the end of active phase was anticipated, and the duration of the active phase and the total daily activity were lower in relation to the control condition, with modulations at 10 lux. There was an increase in the spectral power of circadian period in blue and red lights in LL under 200 lux. We also observed that the duration of the experiment modifies the expression of circadian activity rhythm, possibly affecting the photoreception mechanisms in marmosets. From these results it is suggested that: 1) blue and red wavelengths of light used in LD cycles modify the endogenous expression and photic synchronization of the circadian activity rhythm in marmosets; 2) the animals respond differently to blue and red wavelengths of light at the beginning and end of active phase, with a larger advance the end of active phase, reducing the length of alpha and total daily activity, probably due to a masking effect; 3) the effect of wavelength varies depending on light intensity, with no difference between the intensities of 200 and 100 lux and a greater instability at 10 lux; 4) the duration of exposure of animals to blue and red wavelengths is a factor to be considered in the construction of experimental protocols with this species.

**Keywords:** Lights wavelength; Photic entrainment; Diurnal primates; *Callithrix jacchus*.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	34
3. HIPÓTESES E PREDIÇÕES	35
4. METODOLOGIA	37
5. RESULTADOS	50
6. DISCUSSÃO	80
7. CONCLUSÃO	100
REFERÊNCIAS	101
ANEXO	112

# 1. INTRODUÇÃO

Com as primeiras discussões sobre o papel da luz na saúde humana, o conceito de qualidade de iluminação tornou-se mais complexo, e estudos encontraram uma correlação positiva entre a iluminação ambiental, a saúde e o desempenho humanos (Daurat *et al.* 1993; Knez & Kers 2000; Cajochen 2007). Por outro lado, a iluminação deficiente ou inapropriada pode modificar a ritmicidade circadiana, trazendo consequências adversas ao bem-estar físico e mental de pacientes em ambientes hospitalares (Cajochen 2007; Burgess, Sharkey & Eastman 2002). Atualmente, a luz é utilizada como tratamento prático em diversos campos da medicina, tanto para minimizar desordens na ritmicidade como para diminuir a sonolência dos trabalhadores em turnos (Kaida *et al.* 2006; Skene & Arendt 2006). Adicionalmente, o uso da luz em tratamentos de distúrbios psiquiátricos, como o transtorno afetivo sazonal cresceu nos últimos anos e atualmente procura-se estender esse tipo de tratamento a outros transtornos psiquiátricos não sazonais, como a depressão pós-parto, tensão pré-menstrual, déficit de atenção e hiperatividade (Terman 2007). Além disso, a luz é um fator regulador do comportamento animal, uma vez que favorece a integração do organismo ao ambiente e controla através do sistema de temporização circadiana, a alocação temporal de ritmos como a secreção de hormônios, a temperatura corporal, o comportamento alimentar, a reprodução, o sono e a vigília, a atividade e o repouso, entre outros.

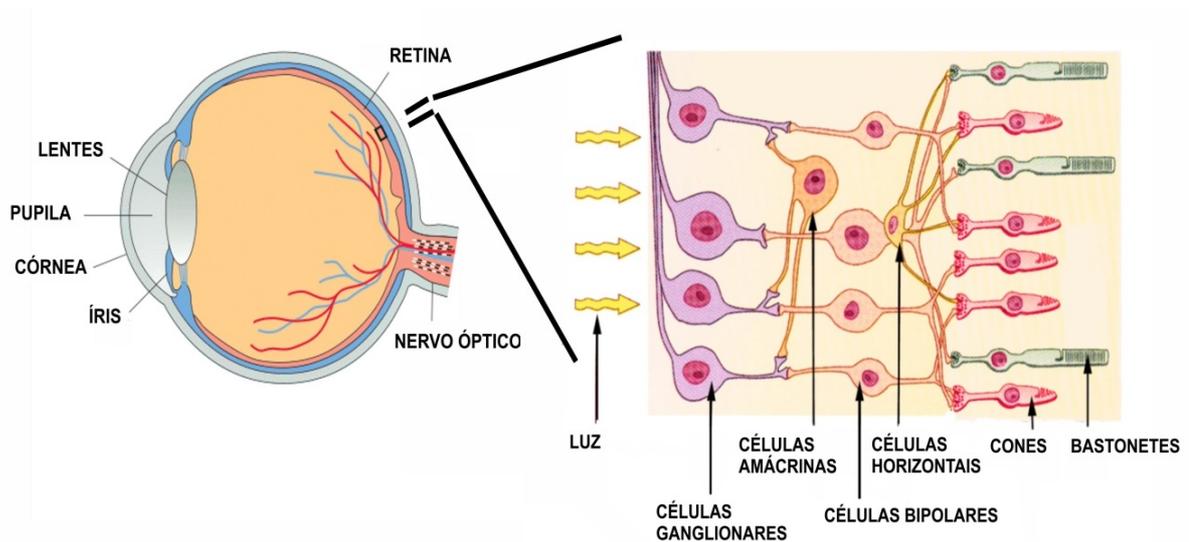
A presença de ciclos ambientais, tais como o dia e a noite, as fases da lua, as estações do ano e as marés, entre outros, é evidente em quase todas as regiões do planeta, e a alocação dos organismos a nichos temporais específicos, sincronizando a fisiologia e o comportamento aos sinais externos, foi fundamental para a sobrevivência dos mesmos

(Golombeck & Rosenstein 2010). O ciclo ambiental mais estudado é a alternância entre o dia e a noite, considerado um dos mais importantes na adaptação dos seres vivos em diferentes habitats (Roenneberg & Foster 1997, Crowley *et al.* 2007).

Para entendermos como os mamíferos processam as informações fóticas, precisamos compreender o mecanismo da visão, que foi resumido por Tovée em 2008. Segundo ele, a luz possui natureza dual e ora se comporta como onda (que varia em frequência e comprimento), ora como partícula (fóton). Ambas são usadas para explicar como o sistema visual responde à luz: para determinar a sensibilidade fótica do sistema visual (limiar mínimo de detecção de luz) é usual falarmos em fótons. No entanto, quando se discute a percepção da cor, nos referimos a luz em termos de comprimento de onda, medido em nanômetros (*nm*). Ainda segundo esse autor, somente radiações eletromagnéticas com comprimento de onda situados nas regiões entre 380 a 760 *nm* são visíveis ao olho humano, e essa sensibilidade é determinada pelos fotopigmentos presentes nos fotorreceptores da retina em cada espécie. Conforme Bailes e Lucas (2010), a sensibilidade espectral relaciona-se à resposta à luz de diferentes comprimentos de onda, e depende da faixa de absorção de cada fotopigmento.

Após ser focada sobre a retina, a informação luminosa é codificada em impulsos elétricos, desencadeando a atividade neural que representará a imagem para o cérebro. Esse processo é denominado *transdução*, e é realizado pelos fotorreceptores da retina, cones e bastonetes. A luz mais intensa estimula as opsinas, os fotopigmentos dos cones, responsáveis pela visão diurna ou fotópica, de alta acuidade visual e em cores. Já os bastonetes (cujo fotopigmento é a rodopsina) são os responsáveis pela visão noturna ou escotópica, fornecendo uma imagem monocromática (em gradações de cinza) e com menor acuidade visual (Mollon & Bowmaker 1992).

A partir dos terminais sinápticos dos cones e bastonetes, os sinais elétricos são enviados para as células bipolares, horizontais e amácrinas da retina, e destas para as células ganglionares, cujos axônios constituem o nervo óptico, via responsável pelo tráfego das informações da retina para o córtex visual (Tovée 2008). Podemos observar a estrutura interna da retina humana na Figura 1.



**Figura 1:** Estrutura interna da retina humana (Modificado de Dowling & Boycott 1966).

Segundo Dartnall e colaboradores (1983), nos seres humanos e em primatas do Velho Mundo, existem três classes de cones, e a sensibilidade fotóptica resulta da estimulação combinada destas células. Os cones “S” possuem opsinas que detectam os comprimentos de onda curtos da luz, com um pico de sensibilidade em torno de  $437\text{ nm}$ , na região espectral correspondente à cor azul; cones “M” detectam comprimentos de onda médios da luz, e suas opsinas possuem um pico de sensibilidade em torno de  $535\text{ nm}$ , na região espectral da cor verde; já as opsinas dos cones “L” detectam comprimentos de onda longos da luz, com pico de sensibilidade em torno dos  $570\text{ nm}$ , na região espectral da cor

vermelha; enquanto o pico de sensibilidade da rodopsina dos bastonetes situa-se na faixa dos 507 nm (Aggelopoulos & Meissl 2000, Rea 2000).

Segundo Lucas e colaboradores (2012), inicialmente pensava-se que toda a fotorrecepção seria mediada por cones e bastonetes, já que esses fotorreceptores eram capazes de absorver a luz, transduzi-la em sinais neuroquímicos, e transportá-la através da retina, cabendo às células ganglionares um papel coadjuvante nesse circuito, apenas recebendo e transferindo as informações da retina ao cérebro ao longo de seus axônios.

No entanto, uma descoberta surpreendente mostrou que um pequeno grupo de células ganglionares da retina era intrinsecamente fotossensível, passando a ser denominado de “células ganglionares intrinsecamente fotossensíveis da retina” (Provencio *et al.* 2000). Essas células constituem menos de 2% da população de células ganglionares da retina, e contém como pigmento fotossensível a melanopsina, uma opsina diferente da encontrada nos cones, e cujo pico de absorção fica na região espectral dos comprimentos de onda curtos da luz azul, com  $\lambda_{max}$  em torno de 480 nm (Berson, Dunn & Takao 2002; Hattar *et al.* 2002).

Estudos posteriores revelaram que as células ganglionares intrinsecamente fotossensíveis dos mamíferos são diversificadas, compreendendo, pelo menos, cinco subtipos, que se projetam para distintas regiões cerebrais, envolvidas em respostas visuais e não visuais (Ecker *et al.* 2010, Schmidt & Kofuji 2009, Schmidt *et al.* 2011).

A primeira evidência de que as células ganglionares intrinsecamente fotossensíveis atuavam no processamento visual partiu dos estudos de Dacey e colaboradores (2005), que demonstraram que essas células se projetavam para o núcleo geniculado lateral, um importante centro de ligação com o córtex visual. Adicionalmente, novos estudos mostraram que as células ganglionares intrinsecamente fotossensíveis da

retina combinam suas respostas fóticas aos sinais derivados dos cones e bastonetes, transmitindo-os a um subconjunto de alvos da retina no cérebro (Bailes & Lucas 2010; Ecker *et al.* 2010; LeGates, Fernandez & Hattar 2014).

Assim, as células ganglionares intrinsecamente fotossensíveis podem não apenas detectar a luz, mas também conectar-se aos demais tipos celulares da retina externa, recebendo sinapses dos cones e bastonetes através das células amácrinas e bipolares. Desse modo, conforme explicam Belenky e colaboradores (2003), na retina intacta a resposta à luz é um composto de influências intrínsecas (a partir da melanopsina das células ganglionares intrinsecamente fotossensíveis) e extrínsecas (pela ação das opsinas - dos cones e rodopsina - dos bastonetes).

Hoang e Yau (2010) explicam que à medida que o sistema visual dos mamíferos foi sendo estudado, tornou-se evidente que as células ganglionares intrinsecamente fotossensíveis da retina não formavam um grupo único e homogêneo. Atualmente, sabe-se que há pelo menos cinco classes dessas células, que são distinguidas através de sua ramificação dendrítica e campos receptores (Ecker *et al.* 2010; LeGates, Fernandez & Hattar 2014). Entre as classes mais estudadas estão as células tipo 1, ou M1, que, apesar de não serem muito numerosas, fornecem a maioria das fibras nervosas do trato retino-hipotalâmico, representando a principal via de informações fóticas aos núcleos supraquiasmáticos, e as células tipo 2, ou M2, que se projetam principalmente para o núcleo olivar pré-tetal, área responsável pelo reflexo pupilar à luz (Hattar *et al.* 2006; Schmidt & Kofuji 2009). Desse modo, além de compor o nervo óptico, realizando a transferência das informações visuais, as fibras nervosas das células ganglionares intrinsecamente fotossensíveis também constituem o trato retino-hipotalâmico, o mais importante elo entre a retina e o sistema de temporização circadiana.

Portanto, além da função visual, os olhos dos mamíferos detectam a luz e processam uma gama de respostas comportamentais e fisiológicas independentes da visão. Chamadas de respostas fóticas não visuais, atividades como a secreção de hormônios, a temperatura corporal, o comportamento alimentar, a reprodução, o sono e a vigília, a atividade e o repouso, entre outras, são coordenadas pelo sistema de temporização circadiana, que organiza cronologicamente os mecanismos regulatórios desses eventos no organismo.

A alocação temporal dessas respostas comportamentais e fisiológicas de forma sincronizada às condições ambientais envolve a recepção das pistas fóticas ambientais pela retina e a posterior transmissão desses sinais ao núcleo supraquiasmático (NSQ), considerado o principal oscilador do sistema de temporização circadiana em mamíferos (Moore 1993, 1999), e a principal via aferente desse sistema de temporização é o trato retino-hipotalâmico, que comunica a retina diretamente aos NSQs. O trato retino-hipotalâmico é formado por fibras das células ganglionares que percorrem o nervo óptico, cruzam-se no quiasma óptico e atingem bilateralmente os NSQs. Já o trato geniculohipotalâmico é uma via secundária e indireta, que liga a retina aos NSQs através do folheto intergeniculado do complexo geniculado lateral do tálamo (Moore 1993; 1999). Há ainda uma terceira via de ligação com o NSQ, a rafe-NSQ, que se origina no núcleo da rafe mesencefálica e é considerada a via de entrada da informação não fótica aos NSQs, além de modular a sincronização fótica (Cavalcante *et al.* 2006). Por sua vez, os núcleos supraquiasmáticos enviam projeções para células-alvo: neurônios endócrinos, neurônios autonômicos do núcleo para-ventricular do hipotálamo e também para osciladores secundários situados em outras áreas cerebrais e em órgãos periféricos, tais como o fígado, rins, pulmões e coração, entre outros (Challet & Pévet 2003).

Uma das principais referências do NSQ é sua conexão com a glândula pineal. A pineal atua como um transdutor neuroendócrino, recebendo informações da retina e dos NSQ e liberando melatonina durante a noite. A melatonina é o hormônio que informa ao organismo a duração do fotoperíodo, mediando a regulação de ritmos sazonais (como a reprodução) e do ciclo vigília-sono (Simmoneaux & Ribelayga 2003). Em animais diurnos e noturnos, a síntese e os maiores níveis circulantes de melatonina ocorrem durante a fase de escuro, e pulsos de luz suprimem a síntese e a secreção dessa substância. Segundo Panda e colaboradores (2003), essa supressão seria uma resposta obtida através da ação da melanopsina das células ganglionares da retina, pois esses autores verificaram que camundongos com cones e bastonetes ausentes não tiveram a produção de melatonina interrompida pela luz. Adicionalmente, conforme mostram Hatori e Panda (2010), a sensibilidade espectral para a supressão da melatonina ocorre em uma faixa distinta dos valores dos pigmentos de cones e bastonetes, e ratos geneticamente cegos por degeneração dos cones e bastonetes, mas com as células ganglionares intrinsecamente fotossensíveis da retina intactas ainda apresentavam essa resposta.

Assim, podemos compreender o sistema de temporização circadiana como um sistema multioscilar, onde as informações processadas no NSQ coordenam os órgãos efetores ou o funcionamento de osciladores periféricos nos órgãos efetores, que, por sua vez, podem retroalimentar o núcleo supraquiasmático (Brandstaetter 2004).

A contribuição dos cones e bastonetes no mecanismo de sincronização foi comprovada em vários estudos, como os realizados por Aggelopoulos e Meissl (2000). Esses autores realizaram registros eletrofisiológicos em neurônios dos NSQs de ratos em condições fotópicas e escotópicas de iluminação, e demonstraram que os neurônios do núcleo supraquiasmático apresentavam atividade elétrica nessas condições, em limiares

espectrais correspondentes aos valores de sensibilidade máxima dos cones e bastonetes. Segundo esses autores, tais achados sinalizam a convergência dos sinais de ambos os fotorreceptores ao NSQ, caracterizando a participação dos cones e bastonetes no mecanismo do foto arrastamento.

Em 2002, Panda e colaboradores, em um estudo realizado com camundongos transgênicos que não produziam melanopsina, mostraram que mesmo na ausência do fotorreceptor, os animais sincronizaram ao ciclo claro-escuro e entraram em livre-curso no escuro constante, evidenciando a participação dos cones e bastonetes no arrastamento do ritmo de atividade dos animais. No entanto, esses autores destacam que os camundongos exibiram respostas atenuadas aos pulsos de luz, alertando que, embora a melanopsina não seja fundamental para a promoção das respostas não visuais, desempenha um papel chave no arrastamento circadiano. Resultados semelhantes foram encontrados por Ruby e colaboradores (2002): esses autores, estudando camundongos knockout para o gene da melanopsina, também perceberam que esta, apesar de não essencial para a recepção das pistas fóticas pelo sistema circadiano, contribui significativamente para a magnitude das respostas.

Além disso, estudos sobre a sincronização da atividade locomotora em camundongos transgênicos, realizados por Mrosovsky (2003) e Hattar e colaboradores (2003), reforçaram a ideia de que cones e bastonetes contribuíam para promover respostas tais como mudanças de fase, contração pupilar e foto arrastamento do ritmo de atividade desses animais. Adicionalmente, nesse mesmo estudo, Hattar e colaboradores (2003), utilizando camundongos com ausência dos três tipos de fotorreceptores (cones, bastonetes e células ganglionares intrinsecamente fotossensíveis), mas com as demais células da retina

intactas, demonstraram que as demais classes de células da retina não participavam do mecanismo de sincronização fótica.

Em 2005, os estudos desenvolvidos por Dacey e colaboradores demonstraram que cones, bastonetes e células ganglionares da retina agiam conjuntamente para fornecer ao NSQ os sinais necessários ao processo de regulação circadiana e contração pupilar em mamíferos. Mais tarde, Güler e colaboradores (2008), investigando a transmissão das informações fóticas entre os três tipos de fotorreceptores, estudaram camundongos geneticamente modificados, com as células ganglionares intrinsecamente fotossensíveis da retina ausentes, e verificaram que os animais mantinham a visão, mas apresentavam deficiência nos processos de foto arrastamento e contração pupilar, ocorrendo perda do foto arrastamento após a lesão seletiva dessas células, e destacaram a importância das células ganglionares intrinsecamente fotossensíveis para desencadear as respostas não visuais nessa espécie.

Portanto, cones e bastonetes operam em diferentes mecanismos da detecção de luz para a visão, mas também interferem no sistema de temporização circadiana (Webb 2006; Dollet *et al.* 2010). Em síntese, conforme explica Altimus (2010), as células ganglionares intrinsecamente fotossensíveis não são os únicos fotorreceptores envolvidos na regulação circadiana, nem tampouco cones e bastonetes são fundamentais para a sincronização fótica. Segundo esse autor, o processo de fotoarrastamento, os diferentes fotorreceptores envolvidos e suas conexões com a retina devem receber novas abordagens, pois seus mecanismos de ação ainda não se encontram completamente elucidados.

Segundo Foster e Helfrich-Forster (2001), os requisitos sensoriais para o fotoarrastamento circadiano não são fundamentalmente diferentes daqueles necessários à formação da visão, pois a marcação temporal diária está relacionada à intensidade da luz

ambiente (ou irradiância<sup>1</sup>), e é esse o parâmetro que define a magnitude das respostas do sistema circadiano aos estímulos luminosos. E cones, bastonetes e células ganglionares da retina contribuem em conjunto para codificar a variação temporal da intensidade luminosa no processo de arrastamento fótico (Güler *et al.* 2008).

A sincronização dos ritmos endógenos aos ciclos ambientais pode ocorrer através de dois processos distintos: o arrastamento e o mascaramento, e conforme explicam Golombek e Rosenstein (2010), ambos os mecanismos contribuem para a adaptação dos organismos ao ambiente.

Aschoff (1960), explica que, no arrastamento, um estímulo cíclico age como agente sincronizador ou "*Zeitgeber*", influenciando os osciladores endógenos, que se ajustam ao ciclo ambiental, adiantando (se o período é menor do que 24 h) ou atrasando (se possuir períodos superiores a 24 h) suas fases, e modificando a expressão do ritmo. Essa ordenação temporal de vias anatômicas e mecanismos fisiológicos favorece a exploração dos diversos nichos ambientais, permitindo aos organismos antecipar mudanças periódicas (Roenneberg, Daan & Merrow 2003).

Conforme o tipo de estímulo fótico recebido pelo organismo (luz contínua ou pulsos de luz), distintas são as respostas originadas nos osciladores circadianos. Desse modo, as respostas dos osciladores a pulsos de luz descontínuos caracterizam o modelo de arrastamento discreto ou "não paramétrico", enquanto a exposição à luz de forma contínua promove o arrastamento contínuo ou "paramétrico" (Aschoff 1960 e 1999; Pittendrigh 1960).

No modelo não paramétrico, as respostas obtidas com o uso da luz nem sempre são semelhantes, e dependem da fase em que são aplicadas, pois em determinados momentos, pulsos de luz são ineficazes em modificar a fase dos osciladores (ou seja, não

<sup>1</sup>Irradiância: Fluxo de energia radiante que atinge determinada superfície.

geram uma resposta), e quando há uma resposta, essa varia em função da fase. De um modo geral, os organismos respondem aos estímulos luminosos da seguinte maneira: pulsos de luz no final do dia subjetivo e no início da noite subjetiva promovem atrasos de fase, enquanto pulsos de luz no final da noite subjetiva e no início do dia subjetivo promovem avanços de fase (Carrier & Dumont 1995; Roenneberg & Merrow 2002). Tais respostas podem ser verificadas através da construção de uma curva de resposta dependente de fase (CRF), que representa graficamente o momento em que o pulso de luz pode induzir atrasos ou avanços de fase, ou mesmo nenhuma mudança, e pode ser utilizada para conhecer os mecanismos de ajuste do período endógeno ao *zeitgeber* ambiental, sendo uma das principais ferramentas para o estudo da sensibilidade do sistema circadiano à luz no modelo não paramétrico (Roenneberg, Daan & Merrow 2003).

No modelo de arrastamento paramétrico, os ajustes das fases dos ritmos biológicos pelas oscilações ambientais ocorrem por mudanças gradativas na velocidade do NSQ através da ação contínua da luz sobre o sistema circadiano (Daan & Aschoff 2001). Mesmo assim, as respostas obtidas no modelo paramétrico também dependem da fase em que a luz é fornecida e parece haver um consenso de que, a sincronização, em ambiente natural, ocorre pela ação conjunta de ambos os mecanismos, o paramétrico e o não paramétrico (Aschoff 1999; Daan & Aschoff 2001; Marques *et al.* 2003).

Na sincronização por mascaramento (Aschoff 1960), o estímulo ambiental atua diretamente sobre a expressão do ritmo, sem que haja modificações no funcionamento do oscilador biológico. Segundo Mrosovsky (1999), no mascaramento o organismo pode responder ao estímulo sem que este seja cíclico, e, conforme explicam Marques & Waterhouse (1994), esse mecanismo permite uma reação mais rápida aos estímulos externos, fornecendo uma resposta valiosa no escopo da prontidão biológica, com a mesma

importância do arrastamento em determinar a relação de fase mais adequada à sobrevivência. Além disso, o mascaramento não tem caráter antecipatório, e é denominado positivo quando o estímulo intensifica a expressão do ritmo, e negativo quando a expressão rítmica é diminuída ou suprimida (Marques *et al.* 2003). No entanto, como as respostas à luz e ao escuro diferem entre espécies diurnas e noturnas, Mrosovsky (1999) propôs os seguintes termos: mascaramento paradoxal positivo – para o aumento da atividade motora promovido pela luz em espécies noturnas e pelo escuro em espécies diurnas, e mascaramento paradoxal negativo – para a diminuição na atividade motora provocada pela luz em espécies diurnas e pelo escuro em espécies noturnas.

Ao investigar o efeito de pulsos de luz de 1h de duração sobre o ritmo de atividade de hamsters *Mesocricetus auratus*, Redlin & Mrosovski (1999) relataram que quando os pulsos de luz foram apresentados no início da noite, a atividade foi fortemente suprimida (mascaramento), mesmo com intensidades bastante reduzidas (em torno de 1 lux). Além disso, os autores observaram que o efeito supressor da luz sobre o ritmo de atividade dos animais foi máximo no horário coincidente ao início da fase ativa (entardecer), e sugerem que este fato sinalize o valor adaptativo do mascaramento da atividade pela luz, limitando o forrageamento às horas de escuro.

Em outro interessante estudo (Mrosovsky, Foster & Salmon 1999), ratos mutantes (com degeneração da retina), receberam pulsos de luz (1h), com diferentes intensidades de luz (500, 55, 9 e 2 lux), durante a fase ativa, e apresentaram mascaramento negativo do ritmo de atividade locomotora à luz em comparação aos ratos do tipo selvagem. Por outro lado, quando foram utilizados os pulsos de luz com a intensidade mais baixa (2 lux) os mutantes não modificaram o ritmo de atividade, enquanto os ratos selvagens apresentaram mascaramento positivo. Segundo os autores, tais resultados sugerem que os

mecanismos de mascaramento positivo e negativo podem depender de processos sensoriais e centrais diferentes.

Em uma recente revisão sobre o sistema de temporização circadiano e a saúde humana, Roenneberg & Merrow (2016) argumentam que, embora os osciladores biológicos possam ser sincronizados a períodos de tempo maiores ou menores que o período endógeno, os limites dessa sincronização são estreitamente dependentes da força do *zeitgeber* utilizado. Conforme os autores, assim como ocorre para a maioria das espécies estudadas, a sincronização em humanos resulta das relações entre a força do *zeitgeber* e o oscilador circadiano, e a resposta sincronizadora (seja por arrastamento ou mascaramento) depende da força que a pista temporal (*zeitgeber*) exerce sobre o ritmo, promovendo maior ou menor acoplamento entre os osciladores e, conseqüentemente, gerando um ritmo mais ou menos robusto.

Não há dúvidas de que, para a maior parte dos mamíferos, o *zeitgeber* mais forte é o ciclo claro-escuro (Roenneberg & Merrow 2002, 2016; Chang *et al.* 2011), mas a força do *zeitgeber* pode variar em função da natureza do agente sincronizador ou conforme a espécie considerada, e diferentes respostas podem ser observadas segundo as características do estímulo luminoso utilizado (intensidade, duração ou comprimento de onda da luz). Em alguns primatas não-humanos, como o prossímio noturno *Microcebus murinus* e o primata neotropical diurno, sagui (*Callithrix jacchus*), o aumento na intensidade da luz promove um aumento do efeito sincronizador deste *zeitgeber* (Perret *et al.* 2010; Gonçalves 2015).

Em humanos, os efeitos da luz promovendo mascaramento sobre medidas de alerta e desempenho foram demonstrados em estudos nos quais a exposição a intensidades superiores a 100 lux elevou a excitabilidade fisiológica, aumentando o alerta e minimizando a sonolência (Crowley *et al.* 2007; Cajochen *et al.* 2000; Kaida *et al.* 2006). Outros trabalhos,

mostraram que a luz azul foi mais eficaz que a verde em aumentar o estado de alerta, diminuindo o tempo de reação e apresentando maior excitação eletro encefálica em comparação ao uso da luz verde (Lockley & Gooley 2006). Diversas pesquisas demonstraram uma maior sensibilidade na supressão da melatonina (Brainard *et al.* 2008; Cajochen *et al.* 2005) e no atraso de fase dos ritmos circadianos em humanos (Lockley, Brainard & Czeisler 2003) quando são utilizadas nos protocolos experimentais radiações luminosas com comprimentos de onda curto, na região espectral da luz azul, evidenciando a participação das células ganglionares intrinsecamente fotossensíveis da retina nessas respostas.

Adicionalmente, Cajochen *et al.* (2005) e Brainard *et al.* (2001), estudando tratamentos de distúrbios circadianos humanos utilizando a luz, perceberam melhores respostas com exposição à luz monocromática azul do que quando utilizaram luz verde. Segundo Gooley (2008), a eficácia desses tratamentos depende da irradiância e duração do estímulo luminoso, e esclarece que em laboratório, o uso de intensidades acima de 500 lux promove saturação de respostas, tanto para mudança de fase como para supressão de melatonina, quando precedidas de luz com baixa intensidade (inferior a 15 lux).

Os picos de sensibilidade dos fotorreceptores do sistema visual e não visual são diferentes, e em decorrência disso, percebe-se um aumento no número de estudos com seres humanos e diferentes espécies animais que passaram a considerar também a composição espectral da luz nos protocolos experimentais, buscando uma resposta mais específica sobre a participação de cada fotorreceptor no processo do fotoarrastamento, além da compreensão da sensibilidade espectral do sistema circadiano (Brainard *et al.*, 2001; Brainard *et al.* 2008; West *et al.* 2010; Warman *et al.* 2003; Revell *et al.* 2006).

Entre esses estudos, uma investigação sobre os efeitos dos diferentes comprimentos de onda a exposições de curta duração da luz monocromática, verificou que a

luz com os comprimentos de onda mais curtos é mais eficaz na supressão de melatonina em humanos (Brainard *et al.* 2001). Igualmente, examinando-se os efeitos dos diferentes comprimentos de onda da luz em promover avanços (Wright *et al.* 2004) e atrasos de fase (Lockley *et al.* 2003) nos ritmos de secreção de melatonina em humanos, novamente a luz com comprimento de onda curto foi mais eficiente para desencadear as respostas que a luz com comprimento de onda longo. Além disso, nesse mesmo estudo, a luz monocromática na região espectral do comprimento de onda curto, correspondendo à luz azul foi também considerada mais eficaz que a luz fluorescente em promover mudanças de fase dos ritmos circadianos.

O sagui (*Callithrix jacchus*) é um primata do Novo Mundo bastante utilizado em estudos controlados, servindo como modelo experimental para o uso de fármacos, na compreensão do mecanismo de infecções e no estudo de distúrbios psicológicos ou metabólicos em humanos (Abbott *et al.* 2003; Nelson & Winslow 2009). Devido ao pequeno tamanho, relação filogenética com o homem e fácil adaptação ao cativeiro, é um importante modelo para a pesquisa científica, sendo estudado em grupos (Barbosa & Mota 2009; Mota, Franci & Sousa 2006), pares reprodutivos (Barbosa & Mota 2004; Ziegler *et al.* 2005) ou isolados (Ziegler *et al.* 2005; Rukstalis & French 2005; Cunha *et al.* 2006; Sasaki *et al.* 2009). Apresentam um rico repertório comportamental, e diversos comportamentos apresentam periodicidade circadiana, tais como: a catação (Menezes *et al.* 1994), a marcação de cheiro (Nogueira *et al.* 2001), a proximidade, o contato (Sousa & Pontes 2008), e a atividade motora (Erkert 1989; Menezes *et al.* 1993).

Em relação ao sistema visual, os primatas exibem uma elevada acuidade, resultante de algumas características presentes no grupo, como o grande tamanho dos

olhos, o campo visual binocular e a alta densidade de fotorreceptores e células ganglionares da retina (Provis *et al.* 2013).

A visão tricromática de cores é outra capacidade perceptiva muito importante para a acuidade visual, e decorre diretamente das adaptações da retina. A maioria dos mamíferos é dicromata, isto é, apresenta apenas dois tipos de cones, os curtos (S) e os longos (L), com a sensibilidade para o comprimento de onda específico de cada cone determinado pelos genes das opsinas que levam à expressão seletiva do fotorpigmento S ou L dentro de cada segmento exterior do cone (Jacobs 1998; 2007).

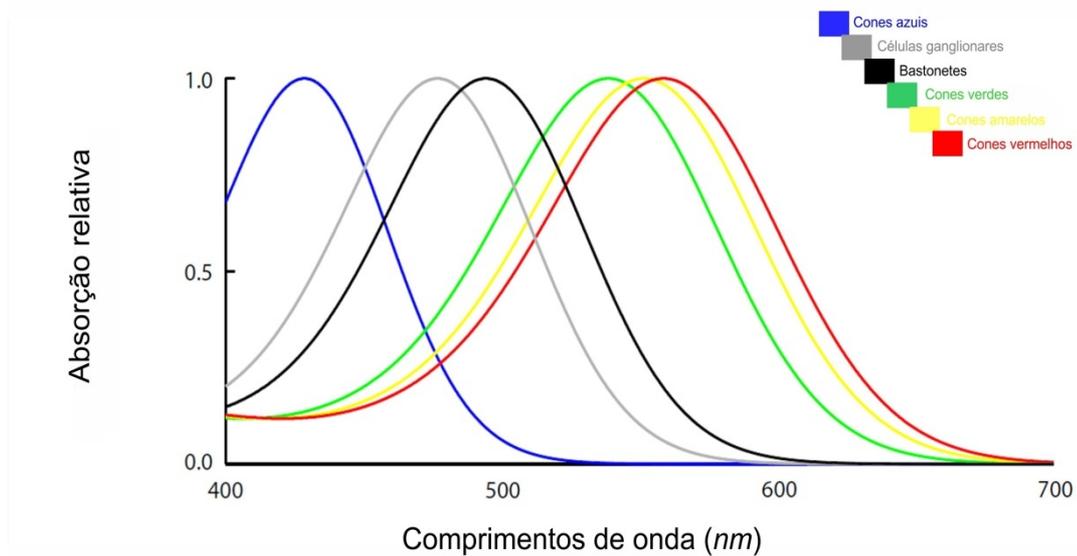
No entanto, conforme explica Jacobs (2008), os primatas têm um tipo adicional de cone (médio, M), possibilitando-lhes a visão tricromática. Assim, todos os macacos do Velho Mundo são tricromatas, mas muitas espécies de macacos do Novo Mundo são marcadas por polimorfismos genéticos que tornam alguns indivíduos dicromatas e outros tricromatas (Mitchell & Leopold 2015). Segundo Jacobs (1998), a visão tricromática para as cores implica na presença de múltiplos fotorpigmentos retinianos, para a exploração das inúmeras fontes de informação visual oferecidas pela natureza, além de uma organização adequada do sistema nervoso, necessária para processar tais informações.

Nos calitriquídeos, a visão das cores está ligada ao sexo, com diferenças nos fenótipos visuais: os machos são sempre dicromatas, enquanto as fêmeas podem ser dicromatas, quando possuem o genótipo homozigoto, ou tricromatas, quando possuem o genótipo heterozigoto (Jacobs 2007).

Estudando a morfologia das células ganglionares da retina de saguis, Ghosh e colaboradores (1996) explicaram que esse animal é um modelo interessante para a visão em primatas devido à boa acuidade visual, além de apresentar vias visuais muito semelhantes às dos humanos e macacos do Velho Mundo. Em seu estudo, os autores não encontraram

diferenças nos tipos de células ganglionares da retina entre saguis machos e fêmeas, e comentam que, assim como ocorre em outras espécies de macacos do Novo Mundo, que também apresentam polimorfismo ligado ao sexo para a expressão do gene responsável pela formação dos fotopigmentos dos cones, a tricromacia não é acompanhada por alterações morfológicas específicas nas células ganglionares. Esses achados estão de acordo com estudos mais recentes, realizados por Fitzgibbon e colaboradores (2015), com machos e fêmeas de saguis, em que foi mostrado que há pouca diferença com relação à idade, peso, sexo ou entre os fenótipos dicromata e tricromata dos animais, e explicam que a morfologia das células ganglionares da retina é praticamente indistinguível entre os dois fenótipos.

Em outro experimento, também sobre a organização do sistema visual desse primata diurno, Ghosh e colaboradores (1997), estudaram as vias de acesso aos cones sensíveis aos comprimentos de onda curto da luz (ou "cones azuis") na retina de saguis, e observaram que as células ganglionares da retina dos saguis apresentavam morfologia, tamanho e nível de estratificação dendrítica semelhantes às observadas nas retinas de outros primatas e humanos, sugerindo que essa via visual seria primordial para a visão dos primatas. Igualmente, Silveira e colaboradores (1999) realizaram uma análise comparada entre a estrutura e as repostas fisiológicas das células ganglionares da retina do macaco-prego (*Cebus apella*) e do sagui (*Callithrix jacchus*), e não encontraram diferenças entre indivíduos dicromáticos e tricromáticos, reforçando a hipótese de que essas vias formam um sistema filogeneticamente antigo, organizado de modo semelhante em primatas do Novo e do Velho Mundo. A curva de absorção estimada para os fotorreceptores em saguis está representada na Figura 2.



**Figura 2:** Faixa de absorção dos diferentes fotorreceptores em *Callithrix jacchus* (Fonte: Daniel M. A. Pessoa).

Para os saguis, assim como para a maioria dos animais diurnos, o ciclo claro-escuro é um importante Zeitgeber (Erkert 1989), e os aspectos ecológicos, comportamentais e fisiológicos dessa espécie têm sido bastante estudados (Sousa *et al.* 2006; Galvão-Coelho *et al.* 2008). Os saguis apresentam o início da fase ativa pouco antes do início do claro e o final da atividade antes do início da fase de escuro, tanto em ambiente natural (Castro *et al.* 2003), em ciclo artificial - CE 12:12 (Erkert 1989), ou em condições seminaturais (Menezes *et al.* 1993; Moreira *et al.* 1991).

Nesses animais, a distribuição da atividade motora expressa um perfil bimodal, caracterizado por dois picos, um pela manhã e outro à tarde, com uma redução da atividade em torno do meio dia, em cativeiro (Menezes *et al.* 1993), e em animais de vida livre (Castro *et al.* 2003). Em condições seminaturais, a fase ativa dos animais tem uma duração em torno de 11 h (Menezes *et al.* 1993).

Roenneberg & Merrow (2002) destacam que muitos estudos cronobiológicos são realizados sob a luz artificial, desprezando as variações na composição espectral e nas intensidades da luz natural que ocorrem sazonalmente e ao longo do dia, sem considerar que a percepção da luz pelos osciladores biológicos não ocorre em condições constantes. Esses autores enfatizam que para melhor compreender o mecanismo de foto sincronização dos ritmos circadianos, todas as características da iluminação natural devem ser observadas.

Além disso, Spoelstra e colaboradores (2016) explicam que, nas últimas décadas, a iluminação artificial noturna dos habitats naturais têm aumentado incessantemente, e os estudos que avaliam o impacto da luz artificial em várias espécies na natureza não têm levado em conta essas modificações. Segundo esses autores, deve-se pensar nas consequências da iluminação artificial sobre populações e ecossistemas a longo prazo e a recente chegada de lâmpadas LED no mercado possibilita o uso da iluminação com uma composição espectral pensada para reduzir o impacto negativo da luz artificial.

A ação da intensidade da luz sobre o ritmo de atividade motora em *Callithrix jacchus* em laboratório foi caracterizada por Erkert (1989). Nesse estudo, Erkert submeteu os animais a ciclos CE 12:12 com diferentes intensidades de iluminação (0,1 a 500 lux) e evidenciou a natureza estritamente diurna dessa espécie, que despertava antes do acender das luzes, mas iniciava sua atividade somente após o início da iluminação artificial, com uma fase ativa de aproximadamente 11 h, e apresentando diferença de ângulo de fase positiva entre o início da fase ativa e o início da fase de claro. No mesmo trabalho, buscando caracterizar o período endógeno dessa espécie, Erkert manteve os animais em claro constante experimentando várias intensidades de luz (0,1 a 500 lux) e observou que o período circadiano dos saguis ( $23,2 \pm 0,3h$ ) não diferiu entre machos e fêmeas ou entre as

intensidades da luz, mas variou em função da idade dos animais e da duração do experimento.

Em um estudo anterior com saguis (Lampert, Azevedo & Menezes 2011), testamos o efeito de diferentes intensidades de luz fluorescente na fase de claro (10, 100, 200 e 500 lux) sobre os ritmos de atividade motora e catação em quatro machos adultos, e observamos a ocorrência de mascaramento paradoxal positivo, caracterizado pelo aumento na atividade motora dos animais em 10 lux.

Em outro trabalho com essa mesma espécie, Wechselberger & Erkert (1994) observaram que os efeitos de mudança de fase promovidos por pulsos de luz de 1h (1.100 lux) no sistema circadiano de saguis mantidos em claro constante é similar ao observado nos ritmos de outros mamíferos diurnos, em que pulsos de luz no final do dia subjetivo e no início da noite subjetiva promovem atrasos, enquanto pulsos de luz no final da noite subjetiva e no início do dia subjetivo promovem avanços de fase.

Em um elegante trabalho com saguis cegos, Silva e colaboradores (2005) mantiveram os animais sob ciclo CE 12:12 (intensidade de 150 lux na fase de claro e 1 lux na fase de escuro) durante 14 dias e então atrasaram o início da fase de claro em seis horas. Três semanas depois, anteciparam o acender das luzes novamente em seis horas, retornando ao ciclo CE original por três semanas e finalmente submeteram os animais ao CC por 4 semanas. Os autores perceberam que os saguis cegos sincronizaram aos ciclos propostos, com um padrão de atividade semelhante aos registros dos animais não cegos, apesar de expressarem um padrão bimodal menos proeminente e uma fase ativa mais curta. Durante o claro constante, o *tau* dos saguis cegos foi de 23,2 horas, enquanto os animais não cegos tiveram um *tau* de 23,6 horas. Segundo os autores, o *tau* mais curto nos animais cegos poderia ser explicado por sua fase ativa menor, com conseqüente diminuição do

mecanismo de realimentação da atividade para o sistema circadiano, ou ainda pela participação dos fotorreceptores clássicos (cones e bastonetes) na geração dos ritmos circadianos em livre-curso. Nesse estudo, os autores sugeriram que a perda dos bastonetes e cones nos animais cegos exerceria um impacto sobre a natureza da informação da luz que atinge o NSQ nesses primatas, pois o arrastamento fótico ficaria restrito a ação das células ganglionares intrinsecamente fotossensíveis da retina desses animais.

Adicionalmente, Gonçalves e colaboradores (2009), estudando a influência da auto seleção à luz no ritmo circadiano de atividade motora de machos adultos de *Callithrix jacchus*, em ciclo CE 12/12 (intensidade luminosa de 350 lux na fase de claro e 2 lux na fase de escuro), e sob claro constante (350 lux) relataram que a exposição forçada à luz (animais mantidos em gaiolas sem caixa-ninho) prolongou a duração da fase ativa dos animais nas duas condições. Além disso, os autores sugerem que embora a exposição forçada à luz induza a um acentuado mascaramento, o arrastamento também é afetado, concluindo que esses mecanismos podem ter ações complementares no controle da sincronização fótica nessa espécie.

As características espectrais da luz também foram consideradas em um estudo sobre o mecanismo de sincronização do prossímio noturno *Microcebus murinus*, no qual Perret e colaboradores (2010) avaliaram o efeito dos comprimentos de onda da luz (400 a 610 nm) e da intensidade de iluminação (6, 13, 45 e 320  $nmol.m^{-2}.s^{-1}$ ) sobre a sincronização do ritmo circadiano de atividade e repouso, e verificaram que o comprimento de onda médio foi mais eficiente em promover a sincronização que os comprimentos de onda curto e longo da luz, não coincidindo com o pico de sensibilidade da melanopsina. Ainda nesse estudo, os autores observaram um avanço de fase no início da atividade sincronizado ao apagar das luzes em duas das intensidades testadas (13 e 45  $nmol.m^{-2}.s^{-1}$ ) e perceberam que

a sincronização do ritmo de atividade-reposo em *Microcebus murinus* aumentou com a intensidade da luz. A partir destes resultados, Perret e colaboradores sugerem que particularmente os cones M/L estariam envolvidos no arrastamento fótico do ritmo circadiano de atividade desse primata noturno.

Em um estudo com esse mesmo primata, Gomez e colaboradores (2012) investigaram os efeitos do envelhecimento sobre a sincronização do ritmo circadiano de atividade e repouso e as bases fisiológicas do mecanismo de fotorrecepção da luz. Utilizando um protocolo que testou diferentes comprimentos de onda em várias intensidades de luz, esses autores perceberam que o envelhecimento afetou o fotoarrastamento, diminuindo a sensibilidade à luz e modificando os ritmos de atividade e temperatura corporal. Os autores observaram também que, diferente do observado em indivíduos adultos, nos animais idosos os comprimentos de onda curtos (430 nm) foram mais eficientes em promover a sincronização da atividade do que comprimentos de onda longos (540 nm) e observaram ainda respostas distintas ao amanhecer e entardecer, sugerindo a necessidade de investigações complementares.

A partir da revisão da literatura, percebemos que estudos cronobiológicos com saguis em cativeiro utilizam exclusivamente medições da intensidade para quantificar a luz, sem abranger as características espectrais correspondentes aos diferentes fotorreceptores (Erkert 1989; Lampert, Azevedo & Menezes 2011), e não há estudos analisando as respostas desse primata diurno aos diferentes comprimentos de onda da luz.

Segundo Duffy & Wright (2005), o fotoarrastamento circadiano depende de uma complexa interação entre pigmentos, informação luminosa e células fotorreceptoras, e a compreensão desse processo requer que as características espectrais da luz sejam consideradas em protocolos experimentais utilizando iluminação artificial.

Assim, estudar os efeitos de diferentes comprimentos de onda da luz sobre o ritmo de atividade de primatas pode fornecer novos subsídios para a compreensão do modo de ação da luz sobre o sistema de temporização circadiana. O conhecimento das respostas obtidas através do uso de diferentes comprimentos de onda e variações na intensidade da luz sobre o ritmo circadiano da atividade locomotora em *Callithrix jacchus*, pode auxiliar a compreensão do modo como cones, bastonetes e células ganglionares intrinsecamente fotossensíveis da retina participam no processo de regulação da ritmicidade em primatas diurnos, ampliando o conhecimento sobre o sistema de temporização nessa espécie e contribuindo para as condições de manutenção desses animais em cativeiro.

## 2. OBJETIVO GERAL

- Avaliar o efeito do comprimento de onda e intensidade da luz sobre o ritmo circadiano de atividade motora em saguis (*Callithrix jacchus*) adultos.

### 2.1 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar as diferenças de ângulo de fase do início da fase ativa em relação ao início da fase de claro, e do fim da fase ativa em relação ao fim da fase de claro, entre os dois comprimentos de onda e em relação ao controle.

- Comparar a duração da fase ativa e o total de atividade diária dos animais entre os dois comprimentos de onda e em relação ao controle.

- Comparar as diferenças dos ângulos de fase do início e fim da fase ativa em relação ao início e fim da fase de claro entre as diferentes intensidades de luz em cada comprimento de onda.

- Comparar a duração da fase ativa e o total de atividade diária dos animais entre as diferentes intensidades de luz em cada comprimento de onda.

### 3. HIPÓTESES E PREDIÇÕES

**H1:** Os parâmetros do ritmo circadiano de atividade motora de saguis mantidos em ciclo claro escuro modificam-se em função dos diferentes comprimentos de onda utilizados na fase de claro.

- ✓ **P1:** *As diferenças de ângulos de fase entre o início da fase ativa e o acender das luzes, e entre o final da fase ativa e o apagar das luzes serão mais estáveis sob a luz azul e mais instáveis sob a luz vermelha em relação ao observado na condição controle.*

**H2:** Os parâmetros do ritmo circadiano de atividade motora em saguis mantidos em ciclo claro escuro modificam-se em função das diferentes intensidades dos comprimentos de onda utilizados na fase de claro.

- ✓ **P1:** *As diferenças de ângulos de fase entre o início da fase ativa e o acender das luzes, e entre o final da fase ativa e o apagar das luzes, e a duração da fase ativa não apresentarão diferenças entre as intensidades de 200 e 100 lux, dentro do mesmo comprimento de onda.*
- ✓ **P2:** *As diferenças de ângulos de fase entre o início da fase ativa e o acender das luzes, e entre o final da fase ativa e o apagar das luzes serão mais instáveis em 10 lux, dentro do mesmo comprimento de onda.*
- ✓ **P3:** *Haverá uma diminuição na duração da fase ativa em 10 lux, dentro do mesmo comprimento de onda.*

**H3:** A expressão da periodicidade circadiana do ritmo de atividade motora dos saguis varia entre os diferentes comprimentos de onda da luz.

- ✓ **P1:** *Haverá um aumento na potência espectral do ritmo circadiano de atividade dos saguis em CC durante o uso da luz azul e redução da potência espectral durante o uso da luz vermelha em relação ao observado na condição controle.*

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 - SUJEITO EXPERIMENTAL

Esse estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRN (protocolo nº 052/2012 – ANEXO 01).

Nesse experimento, foram utilizados dezessete machos adultos de saguis (*Callithrix jacchus*), provenientes do Núcleo de Primatologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, todos nascidos em cativeiro. As características dos animais estão descritas no Quadro 01.

**Quadro 01:** Identificação dos animais estudados.

ANIMAIS	DATA DE NASCIMENTO	PARTICIPAÇÃO	IDADE NO INÍCIO DO EXPERIMENTO
Jerônimo (nº 1107)	29/11/2008	Experimento 1	5 anos
Amaro (nº 1159)	08/12/2009	Experimento 1	4 anos
Jauro (nº 1065)	27/04/2008	Experimento 1	5 anos
Felinto (nº 1087)	18/03/2008	Experimento 1	5 anos
Opus (nº 1097)	03/05/2008	Experimento 1	5 anos
Genilson (nº 1117)	11/02/2009	Repetição do Exp. 1	5 anos
Opache (nº 1113)	16/01/2009	Repetição do Exp. 1	5 anos
Otelo (nº 1111)	06/11/2008	Repetição do Exp. 1	5,5 anos
Oboé (nº 1167)	07/02/2010	Repetição do Exp. 1	4 anos
Cody (nº 1185)	26/01/2011	Repetição do Exp. 1	3,5 anos
Francil (nº 1157)	15/11/2009	Repetição do Exp. 1	5 anos
Ari (nº 1103)	03/10/2008	Experimento 2	6 anos
Flocão (nº 1105)	22/11/2008	Experimento 2	6 anos
Ravi (nº 1135)	05/05/2009	Experimento 2	5 anos
Otelo (nº 1163)	19/12/2009	Experimento 2	5 anos
Max (nº 1243)	03/04/2011	Experimento 2	3,5 anos
Augusto (nº 1089)	24/03/2008	Experimento 2	6 anos

Todos os animais selecionados passaram por uma avaliação veterinária e receberam suplementação vitamínica antes, durante e após o término do experimento.

Foram considerados como critérios de inclusão para esse estudo: ser macho, não ter mais de sete anos na data do início do experimento, estar saudável, não estar inserido em um grupo familiar - para evitar o estresse da separação do grupo.

## 4.2 – AVALIAÇÃO VISUAL

Além dos critérios de inclusão citados anteriormente, todos os saguis foram testados quanto à capacidade visual no início do experimento. Para tanto, elaboramos um teste simples, para o qual confeccionamos um artefato que consistia em um fio de nylon com uma pequena esfera de plástico transparente presa na ponta. Esse instrumento era colocado próximo aos animais, que imediatamente tentavam pegá-lo. Os intervalos de tempo para o animal perceber (1) e manipular (2) o artefato eram cronometrados. A partir dessa observação, os animais seriam considerados visualmente aptos ou não para a realização do experimento. Definimos como critério de exclusão, o animal que apresentasse um intervalo de tempo igual ou superior a 3 s (para perceber) e 30 s (para manipular) o objeto. Todos os animais foram considerados visualmente aptos, apresentando intervalos médios de 1,2 s (para perceber) e 16 s (para manipular) o objeto.

## 4.3 - CONDIÇÕES DE MANUTENÇÃO

Os animais foram mantidos em duas salas experimentais do laboratório do Núcleo de Primatologia da UFRN durante todo o experimento, em gaiolas isoladas, sem

contato visual, mas com contato acústico e olfativo entre si. As condições de temperatura ( $25,5 \pm 0,9^\circ \text{C}$ ) e umidade relativa ( $68,3 \pm 12\%$ ) foram mantidas ao longo das diferentes condições experimentais, utilizando-se um aparelho de ar condicionado (modelo Split) e um exaustor de ar, acionado em intervalos irregulares.

As gaiolas utilizadas são construídas em malha de ferro e mediam 74 X 60 X 89 cm. Houve um cuidado com o enriquecimento ambiental das mesmas, e todas receberam vários poleiros, rede, cordas, caixa-ninho de plástico, bebedouro e um recipiente plástico para colocação de reforço alimentar (Figura 3).



**Figura 3:** Gaiola utilizada no experimento.

A água, uvas-passa e ração (Zoomed, para pequenos primatas) estiveram disponíveis *ad libitum*. Além disso, foram fornecidos outros itens alimentares duas vezes ao dia, em horários irregulares, ao longo da fase de claro. No início da fase ativa era fornecida uma papa composta de leite, ovos cozidos, pão e banana, enriquecida três vezes por semana

com vitaminas (D e complexo B), aminoácidos e glicose (foi utilizado o suplemento alimentar *Glicopan Pet* e a vitamina *Aderogil*). Após a remoção dos restos da papa e ainda na fase de claro, os animais recebiam frutas, frango cozido e ovos ou legumes cozidos (conforme o cardápio semanal elaborado pela veterinária do Núcleo de Primatologia), além de uma suplementação semanal de insetos (*Tenebrio molitor*).

O horário para introdução da primeira refeição matutina variava entre 07:00 - 09:00 h. Entre 12:00 e 15:00 h, os resíduos alimentares da primeira refeição eram retirados, sendo fornecida a segunda refeição, cujos restos só eram removidos no dia seguinte, durante a colocação da primeira alimentação.

#### 4.4 - DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para verificar o efeito dos comprimentos de onda da luz sobre o RCA em saguis, submetemos os animais ao **Experimento 01**, utilizando um ciclo claro/escuro (CE) 12:12, com luzes acendendo as 06:00 e desligando as 18:00 h. Nesse experimento, durante a fase de claro, os animais foram expostos a três diferentes tipos de luz:

- 1) LUZ POLICROMÁTICA FLUORESCENTE – por ser o tipo de iluminação tradicionalmente utilizada em estudos cronobiológicos com saguis mantidos em cativeiro com iluminação artificial, e por isso usada como controle em nosso estudo.
- 2) LEDS AZUIS – luz com comprimento de onda curto (na faixa espectral da luz azul).
- 3) LEDS VERMELHAS – luz com comprimento de onda longo (na faixa espectral da luz vermelha).

Adicionalmente, para avaliar o efeito da intensidade da luz em cada comprimento de onda, promovemos mudanças de intensidade da luz durante a fase de claro (200, 100 e 10 lux), a cada 15 dias. Durante a fase de escuro, utilizamos, em todas as condições experimentais, uma iluminação reduzida (em torno de 2 lux), para evitar o escuro absoluto (uma pequena lâmpada da marca OSRAM, tipo vela, com luz amarela incandescente e potência de 7 watts). Ao final de cada etapa em CE, os animais permaneceram por 30 dias em claro constante (CC), na intensidade de 10 lux, para verificarmos os mecanismos de sincronização utilizados pelos animais durante a condição de iluminação prévia (a transição entre as condições de CE para CC foi realizada através do prolongamento da fase de claro) e avaliarmos o período endógeno. Antes de cada mudança no tipo de iluminação utilizada, os animais passavam por um intervalo de 15 dias em CE (200 lux/2lux) com a iluminação controle (fluorescente).

Iniciamos este estudo com 05 animais, mas um sagui veio a óbito durante a execução do experimento, e para ampliar o tamanho da amostra, repetimos o protocolo experimental com mais 06 machos. Assim, tivemos um total de 10 animais para a análise de dados do Experimento 01. Na repetição, a condição em CC foi de apenas 10 dias, para reduzir a permanência dos animais no laboratório. O protocolo experimental do **Experimento 01** está representado no Quadro 2.

**Quadro 02-** Etapas do experimento 1:

	<b>Ciclo</b>	<b>Intensidade</b>	<b>Lâmpada</b>	<b>Duração</b>
<b>CONTROLE</b>	CE 12:12	200 lux	Fluorescente	15 dias
	CE 12:12	100 lux	Fluorescente	15 dias
	CE 12:12	10 lux	Fluorescente	15 dias
	CC	10 lux	Fluorescente	30/10* dias
<b>Intervalo – 15 dias CE 200 lux – Fluorescente</b>				
<b>ETAPA AZUL</b>	<b>Ciclo</b>	<b>Intensidade</b>	<b>Lâmpada</b>	<b>Duração</b>
	CE 12:12	200 lux	LED Azul	15 dias
	CE 12:12	100 lux	LED Azul	15 dias
	CE 12:12	10 lux	LED Azul	15 dias
	CC	10 lux	LED Azul	30/10* dias
<b>Intervalo – 15 dias CE 200 lux – Fluorescente</b>				
<b>ETAPA VERMELHA</b>	<b>Ciclo</b>	<b>Intensidade</b>	<b>Lâmpada</b>	<b>Duração</b>
	CE 12:12	200 lux	LED Vermelha	15 dias
	CE 12:12	100 lux	LED Vermelha	15 dias
	CE 12:12	10 lux	LED Vermelha	15 dias
	CC	10 lux	LED Vermelha	30/10* dias
<b>Intervalo – 15 dias CE 200 lux – Fluorescente</b>				

\*Na repetição do protocolo experimental do Experimento 1, o número de dias em claro constante foi reduzido de 30 para 10.

Em seguida, submetemos os animais ao **Experimento 02**, que teve início com um ciclo CE 12:12 (luzes acendendo as 06:00 e desligando as 18:00 h), com duração de 10 dias, e o uso dos três diferentes tipos de iluminação (fluorescente- controle, azul e vermelho).

Nesse experimento, utilizamos uma única intensidade de iluminação durante a fase de claro (200 lux) e fase de escuro (< 2 lux). Ao final da etapa em CE 12:12, os animais foram mantidos em CC (intensidade de 200 lux) por 30 dias, para verificar o efeito dos diferentes comprimentos de onda sobre a expressão do ritmo em livre-curso (a transição entre CE e CC foi realizada através do prolongamento da fase de claro). Entre os diferentes comprimentos de onda utilizados, os animais passavam por um intervalo de 15 dias em CE

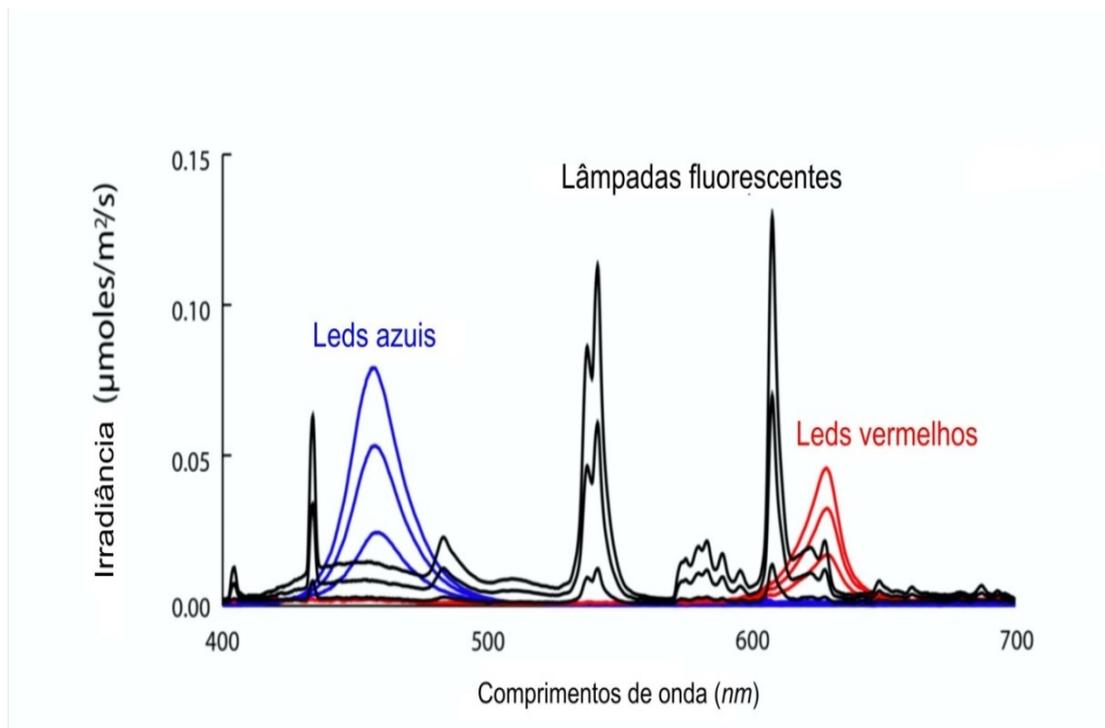
(200 lux/<2lux) com a luz controle. Este segundo experimento foi feito com 06 animais. O **Experimento 02** está representado no Quadro 3.

**Quadro 03-** Etapas do experimento 2:

	<b>Ciclo</b>	<b>Intensidade</b>	<b>Lâmpada</b>	<b>Duração</b>
<b>CONTROLE</b>	CE 12:12	200 lux	Fluorescente	10 dias
	CC	200 lux	Fluorescente	30 dias
<b>Intervalo – 15 dias CE 200 lux – Fluorescente</b>				
	<b>Ciclo</b>	<b>Intensidade</b>	<b>Lâmpada</b>	<b>Duração</b>
<b>ETAPA AZUL</b>	CE 12:12	200 lux	LED Azul	10 dias
	CC	200 lux	LED Azul	30 dias
<b>Intervalo – 15 dias CE 200 lux – Fluorescente</b>				
	<b>Ciclo de</b>	<b>Intensidade</b>	<b>Lâmpada</b>	<b>Duração</b>
<b>ETAPA VERMELHA</b>	CE 12:12	200 lux	LED Vermelha	10 dias
	CC	200 lux	LED Vermelha	30 dias
<b>Intervalo – 15 dias CE 200 lux – Fluorescente</b>				

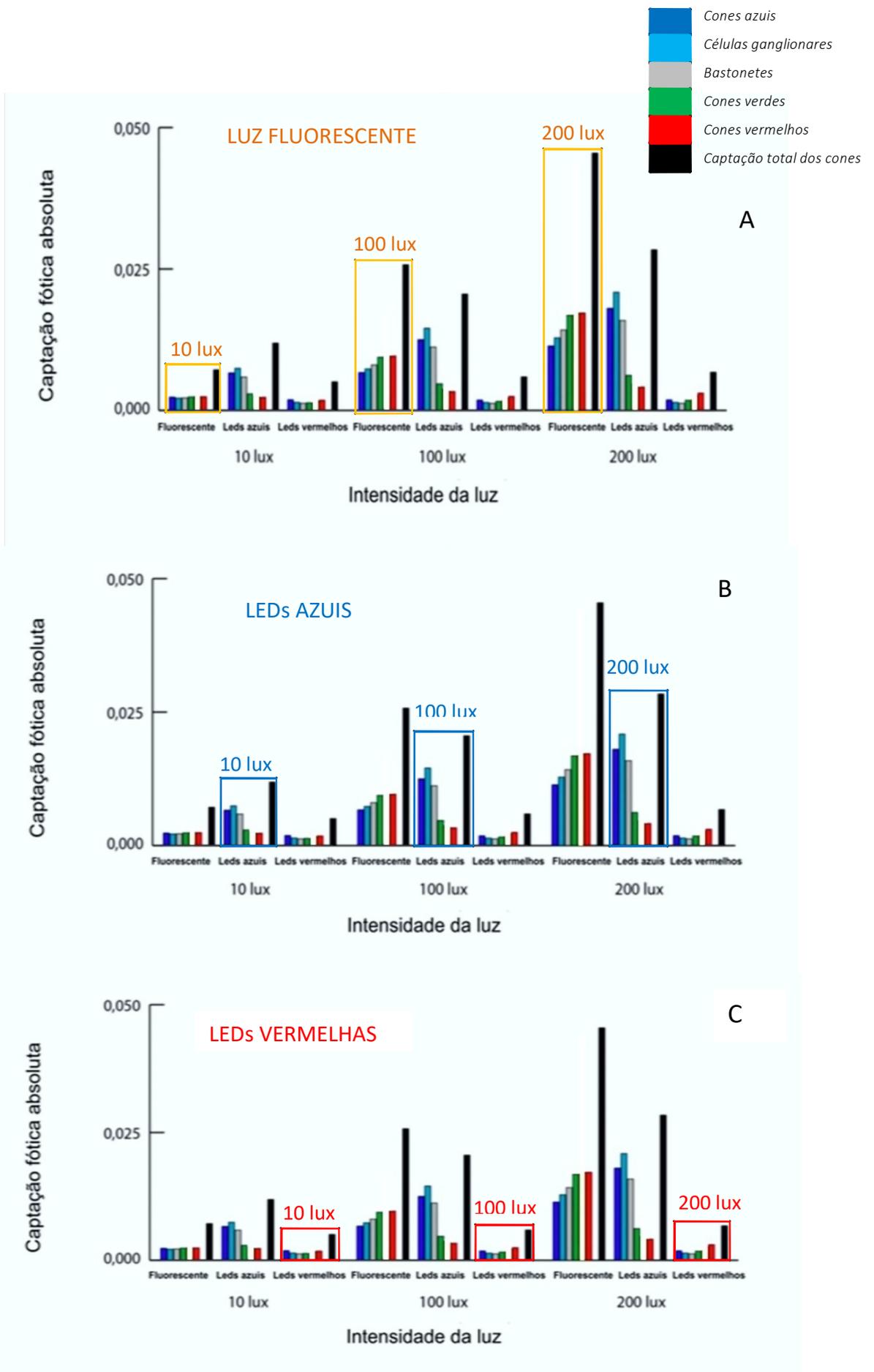
Antes do início da coleta de dados, em ambos os experimentos, houve uma fase de 10 dias de adaptação dos animais às condições da sala. Os dados coletados neste intervalo não foram utilizados. Além disso, nenhum animal foi reutilizado no decorrer dos experimentos.

O comprimento de onda emitido pelas lâmpadas utilizadas foi medido com um espectrômetro (*Fiber Optic Spectrometer USB4000 UV-VIS, Ocean Optics, Inc.- USA*) com o uso do programa Spectra Suite (*Ocean Optics, Inc.- USA*), e está representado na Figura 4.



**Figura 4:** Irradiância das lâmpadas utilizadas no experimento.

Além disso, estimamos também a captação fóptica (quantidade de luz absorvida por cada fotorreceptor) dos saguis. Para obtermos essa estimativa, utilizamos as medidas de irradiância de cada tipo de lâmpada (fluorescente, LED azul e LED vermelha), nas três intensidades utilizadas no experimento - medidas obtidas com o espectrômetro *Fiber Optic Spectrometer USB4000 UV-VIS, Ocean Optics, Inc.- USA* (ver Figura 4). Em seguida, com base nos picos de captação descritos na literatura para os três tipos de fotorreceptores, estimamos a captação fóptica dos animais, através do programa *Spectra Suite (Ocean Optics, Inc.- USA)*. A captação fóptica estimada para os saguis, a partir das lâmpadas e intensidades de iluminação utilizadas neste experimento está representada na Figura 5 (A, B e C). A barra preta após cada conjunto de fotorreceptores representa a luz percebida pelo sistema visual dos animais (somatório das captações fópticas dos cones S-azuis, M-verdes e L-vermelhos).



**Figura 5:** Captação fóica estimada conforme as lâmpadas e intensidades utilizadas no experimento. **A:** captação fóica com lâmpadas fluorescentes em 10, 100 e 200 lux; **B:** captação fóica com LEDs azuis em 10, 100 e 200 lux e **C:** captação fóica com LEDs vermelhas em 10, 100 e 200 lux.

A intensidade da iluminação incidente sobre os animais em cada etapa experimental (200, 100 e 10 lux), foi medida com um luxímetro digital (Modelo MLM 1011, *Minipa Eletronics USA Inc.*) em diferentes pontos da gaiola (entrada da caixa-ninho, piso da gaiola, centro e teto), e utilizou-se como valor de referência a média dessas medidas em cada gaiola. As lâmpadas utilizadas nesse estudo estão identificadas no Quadro 04.

**Quadro 04:** Caracterização do sistema de iluminação.

COR	BRANCA	AZUL	VERMELHA
TIPO DE LÂMPADA	Fluorescente	LED	LED
FABRICANTE	OSRAM	LLUM	LLUM
POTÊNCIA	10w	3 w	3 w
COMPRIMENTOS DE ONDA EMITIDOS	Banda larga	$\lambda_{max}$ 463 nm	$\lambda_{max}$ 631 nm

#### 4.5 - COLETA DOS DADOS

A coleta dos dados da atividade dos animais foi realizada através de sensores de movimento (Passivo por infravermelho, modelo residencial), instalados sobre as gaiolas. Esses sensores permitiam o registro contínuo da atividade motora dos animais. Os sensores foram conectados a uma placa de aquisição de dados (IUSBDAQ - U120816, *HYTEK Automation, Inc. – Ontario, Canada*) que transmitia continuamente os registros dos sensores a um computador.

Por meio do programa SAP – Sistema de Acionamento Programado, desenvolvido pelo professor Marconi Câmara Rodrigues no Laboratório de Neurobiologia e

Ritmicidade Biológica (LNRB/UFRN), para a plataforma Windows, os dados eram contabilizados a cada segundo e armazenados em intervalos de 5 minutos, gerando séries temporais que foram analisadas através do programa EL TEMPS (A. Díez-Noguera, Universitat de Barcelona, Barcelona, 1999). Os horários de acender e apagar as luzes também foram controlados pelo programa SAP.

#### 4.6 - ANÁLISE DOS DADOS

As séries temporais obtidas foram submetidas ao programa *El Temps*<sup>®</sup> (Antoni Díez-Noguera, Universitat de Barcelona, <http://www.el-temps.com> – Copyright<sup>®</sup>1999) para a construção de actogramas e para o cálculo do período endógeno, que foi realizado através do Periodograma Lomb-Scargle. Além de calcular os valores do período endógeno (“tau” ou  $\tau$ ), o periodograma fornece os dados da potência espectral do ritmo, que é um indicativo da robustez dos períodos expressos nas condições de CE (T) e CC ( $\tau$ ).

Foram avaliados os seguintes parâmetros do ritmo circadiano de atividade motora dos saguis: (a) início e (b) fim da fase ativa - os horários de início e fim da fase ativa foram obtidos através do *Two flanks* (*El temps*<sup>®</sup>), (c) duração da fase ativa ( $\alpha$ ), obtida pela diferença entre o fim e o início da fase ativa, (d) diferença do ângulo de fase ( $\psi$ ), calculado entre o acender das luzes e o início da fase ativa ( $\psi_i$ ) e entre o apagar das luzes e o fim da fase ativa ( $\psi_f$ ). Analisamos ainda o total diário da atividade, correspondente à totalização da atividade ao longo das 24h, em cada etapa.

Além disso, procuramos identificar os mecanismos de sincronização do ritmo de atividade motora utilizados pelos animais nos diferentes comprimentos de onda. Consideramos sincronização por arrastamento quando os animais iniciaram o livre-curso na

condição CC em fase determinada pelo ritmo sincronizado ao ciclo CE anterior, e consideramos sincronização por mascaramento, quando os animais entravam em livre-curso em fase diferente (Moore-Ede *et al.* 1982, Daan & Aschoff, 2001), apesar destes mecanismos não serem, necessariamente, exclusivos.

As análises foram feitas utilizando-se o programa STATISTICA 7 (*Statsoft, South America*) com nível de significância de 5%. Em todas as análises, os testes utilizados foram a ANOVA de medidas repetidas e, quando observada significância, o pós-teste de *Tukey*.

A seguir, descrevemos detalhadamente as análises realizadas:

#### 4.6.1 – ANÁLISE 1 – ANIMAIS EM CICLO CE

Inicialmente, comparamos os dados obtidos entre o Experimento 1 (n=4) e a Repetição do protocolo do experimento 1 (n=6). Como os resultados não diferiram entre os dois experimentos, os dados foram agrupados sob a denominação “Experimento 1” (n=10 animais). A seguir, avaliamos os parâmetros do RCA dos saguis para verificar os efeitos dos comprimentos de onda e das diferentes intensidades da luz em cada comprimento de onda em relação ao controle. Avaliamos: a diferença de ângulo de fase para o início da fase ativa em relação ao acender das luzes e a diferença de ângulo de fase para o fim da fase ativa em relação ao apagar das luzes, a duração da fase ativa e o total de atividade diária.

Posteriormente avaliamos também o efeito da duração dos experimentos, para determinar se essa variável afetaria os parâmetros do RCA nos saguis. Comparamos os resultados do Experimento 01 (protocolo mais longo) e do Experimento 02 (protocolo mais curto), utilizando um recorte de 10 dias em cada experimento. Os parâmetros avaliados foram: a diferença de ângulo de fase para o início e o final da fase ativa em relação ao acender e ao apagar das luzes, a duração da fase ativa e o total de atividade diária dos

animais, em ciclo CE 12:12 (200/ < 2 lux), com as luzes fluorescente (controle), azul e vermelho.

#### 4.6.2 – ANÁLISE 2 – ANIMAIS EM CE/CC

Utilizamos os dados dos Experimentos 1 e 2 (n=16), para avaliar o efeito dos comprimentos de onda sobre os parâmetros do RCA e sobre os mecanismos de sincronização dos saguis. No Experimento 2, os saguis foram mantidos em claro constante por 30 dias, mas devido a falhas no fornecimento de energia, somente os primeiros 10 dias nessa condição foram utilizados nas análises os dados.

Comparamos os dados de 10 dias em CE (luzes: controle, azul e vermelho) com duas intensidades de luz (200 e 10 lux) na fase de claro e em seguida analisamos os dados dos animais por 10 dias em CC, com as mesmas luzes e intensidades usadas no ciclo CE. Os parâmetros avaliados foram o período e a potência do ritmo durante as condições CE e CC.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 — ANÁLISE VISUAL DOS PERFIS CIRCADIANOS DE ATIVIDADE DO EXPERIMENTO 1 E DA REPETIÇÃO DO EXPERIMENTO 1

A análise visual dos perfis circadianos de atividade dos animais submetidos aos diferentes ciclos de iluminação do Experimento 1 e da Repetição do Experimento 1 (Figuras 6 a 10), evidenciam que os saguis sincronizaram ao CE com padrão de atividade principalmente diurno, mas não responderam igualmente aos diferentes esquemas de iluminação, apresentando variações na duração da fase ativa, na distribuição diária da atividade e nos mecanismos de sincronização e ressincronização durante as diferentes etapas experimentais.

Em relação aos mecanismos de sincronização do RCA, durante o Experimento 1, observamos que os saguis 1107 e 1159 estavam sincronizados por arrastamento ao ciclo CE fluorescente, pois iniciaram o livre-curso em fase determinada pelo ritmo sincronizado em CE. No entanto, percebemos a ocorrência de mascaramento também, pois os animais 1065 e 1087 apresentam uma mudança de fase abrupta, iniciando a atividade mais cedo e encerrando a atividade mais tarde no primeiro dia em CC. Entre os animais da Repetição, durante o CE controle, observamos sincronização por mascaramento (animais 1117 e 1113) e arrastamento (animais 1163, 1167, 1185 e 1157).

Durante o CC controle do Experimento 1, os saguis 1107, 1159 e 1065 entraram em livre-curso apresentando período menor do que 24h, mas o animal 1087 apresentou modificações na expressão do ritmo. Algumas destas modificações ocorreram após uma falha no fornecimento de energia elétrica ocorrida no laboratório durante esta etapa (dia 24/12/13, sinalizado com \* nos actogramas). No CC controle da Repetição, os seis animais

entraram em livre-curso com período menor que 24h. No último dia na condição CC do controle, houve uma falha no fornecimento de energia elétrica no Núcleo de Primatologia (dia 28/09/14 sinalizado com \* nos actogramas), afetando o final do livre-curso dos saguis.

Na ressincronização ao CE controle, verificamos a presença de transientes nos animais 1159 e 1065 no Experimento 1, e nos animais 1117, 1113 e 1185, na Repetição, enquanto os demais ressincronizaram abruptamente, caracterizando mascaramento do ritmo de atividade pela luz.

Durante o ciclo CE com a luz azul, na Repetição do Experimento 1, todos os animais apresentaram instabilidade no início da atividade, caracterizada por pequenos momentos de atividade anteriores ao início da fase ativa, e que pode indicar uma sincronização mais fraca dos animais nesta condição experimental (Figuras 8 a 10).

Durante o CC com a luz azul, no Experimento 1 (Figuras 6 e 7), apenas os animais 1159 e 1065 entraram em livre-curso, enquanto os animais 1107 e 1087 foram afetados pelas faltas de energia ocorridas no laboratório, interrompendo a expressão do ritmo em livre-curso (dias 14/03 e 31/03/14, sinalizados com \* nos actogramas).

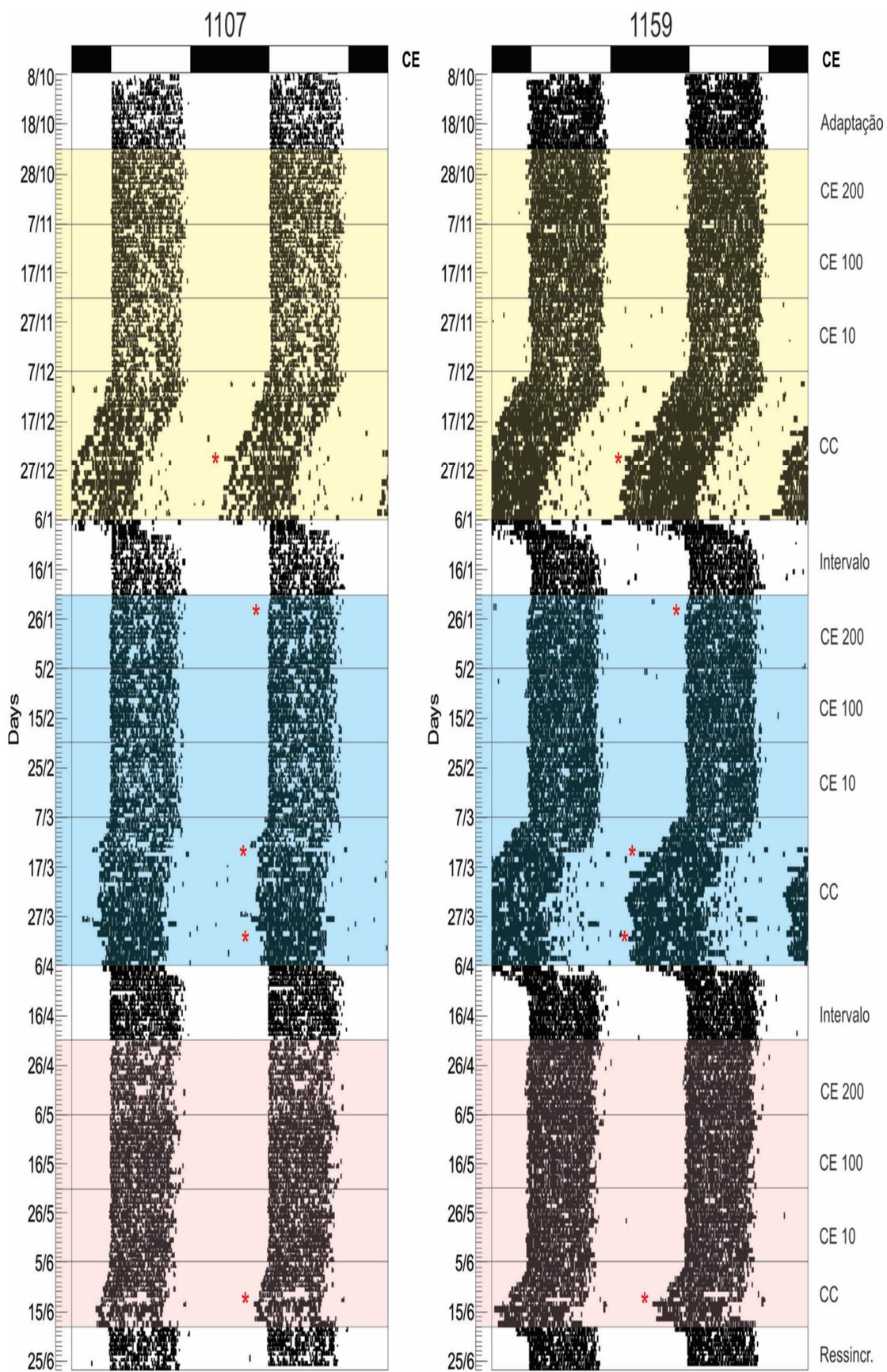
Na Repetição, durante o CC com luz azul, houve uma falha no fornecimento de energia elétrica no terceiro dia em CC (dia 1/12/14, sinalizado com \* nos actogramas), e os animais apresentaram uma interrupção na entrada do ritmo em livre-curso em resposta ao ocorrido. Em relação aos mecanismos de ressincronização do RCA ao ciclo CE, vimos que no final do CC com a luz azul, apenas os animais 1117 e 1163 não apresentaram transientes, evidenciando o forte mascaramento (Figuras 8 a 10).

Durante o CC com a luz vermelha, no Experimento 1 (Figuras 6 e 7), todos os animais exibiram a entrada do ritmo em livre-curso, caracterizado por um período menor

que 24h que, no entanto, foi prejudicado por falhas no fornecimento de energia elétrica no Núcleo de Primatologia (dia 12/06/14, sinalizado com \* nos actogramas).

Na Repetição, durante o CC com a luz vermelha a redução do período foi menos evidente que durante o CC com a luz controle e com a luz azul, e os animais responderam à falta de energia ocorrida dia 12/02/2015 (sinalizado com \* nos actogramas), interrompendo a entrada do ritmo em livre-curso (Figuras 8 a 10).

De um modo geral, o início da fase ativa foi mais estável ao longo das etapas experimentais, enquanto o final da fase ativa apresentou maior instabilidade, conforme as Figuras 6 e 7 (Actogramas dos animais do EXPERIMENTO O1) e as Figuras 8, 9 e 10 (Actogramas dos animais da REPETIÇÃO DO EXPERIMENTO O1).



**Figura 6:** Actogramas dos animais 1107 e 1159 durante o Experimento 1

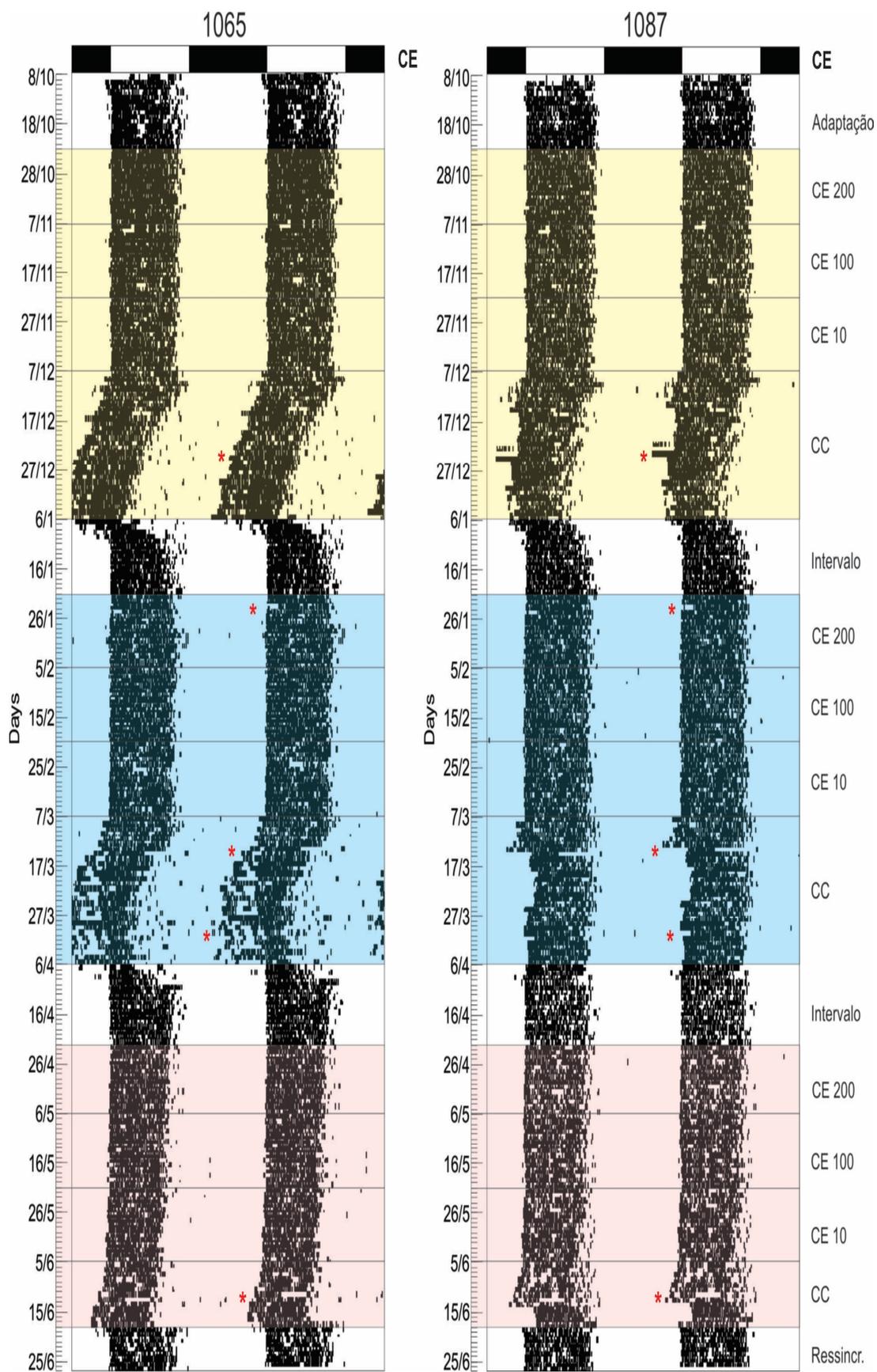


Figura 7: Actogramas dos animais 1065 e 1087 durante o Experimento 1.

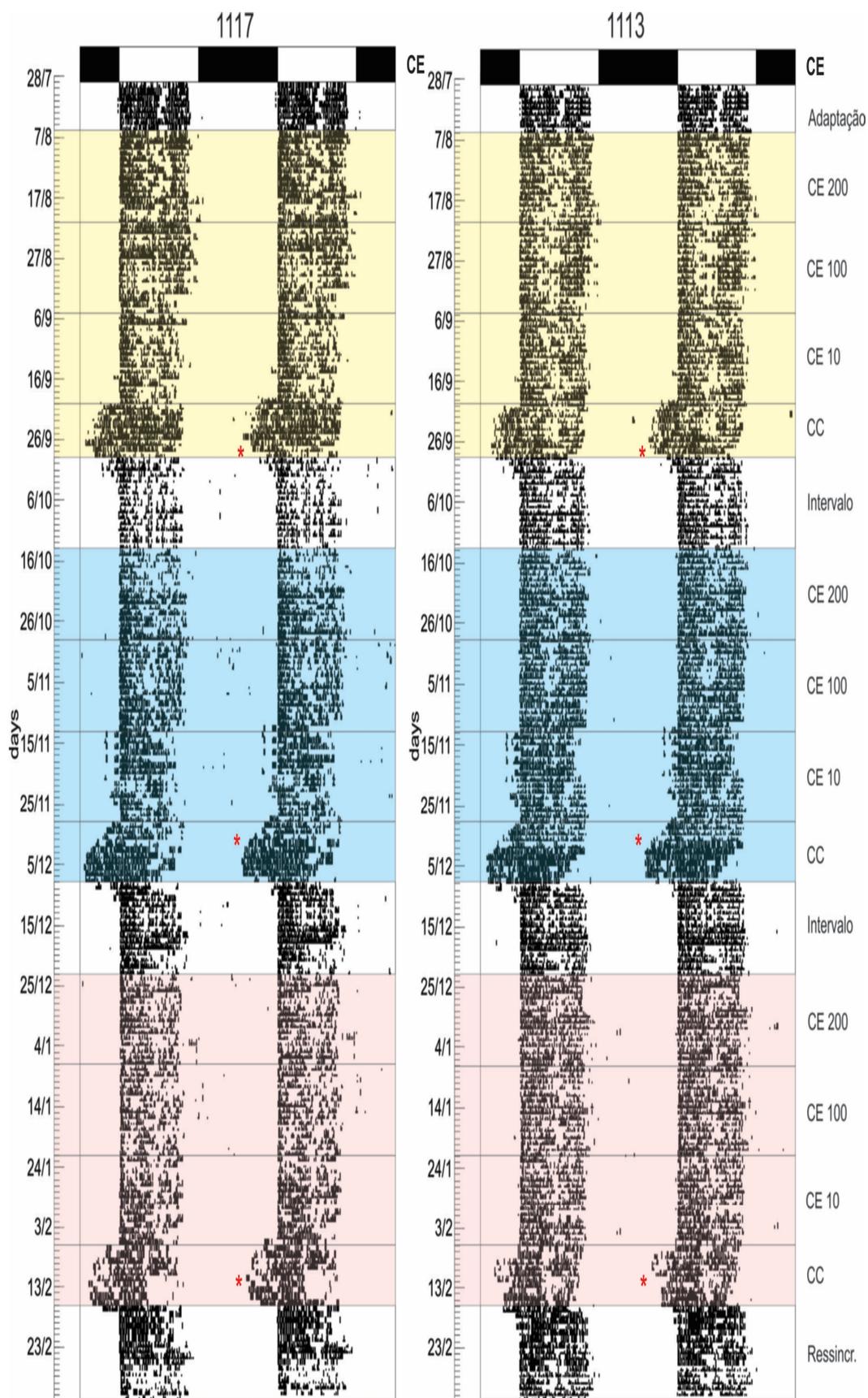


Figura 8: Actogramas dos animais 1117 e 1113 na Repetição do Experimento 1.

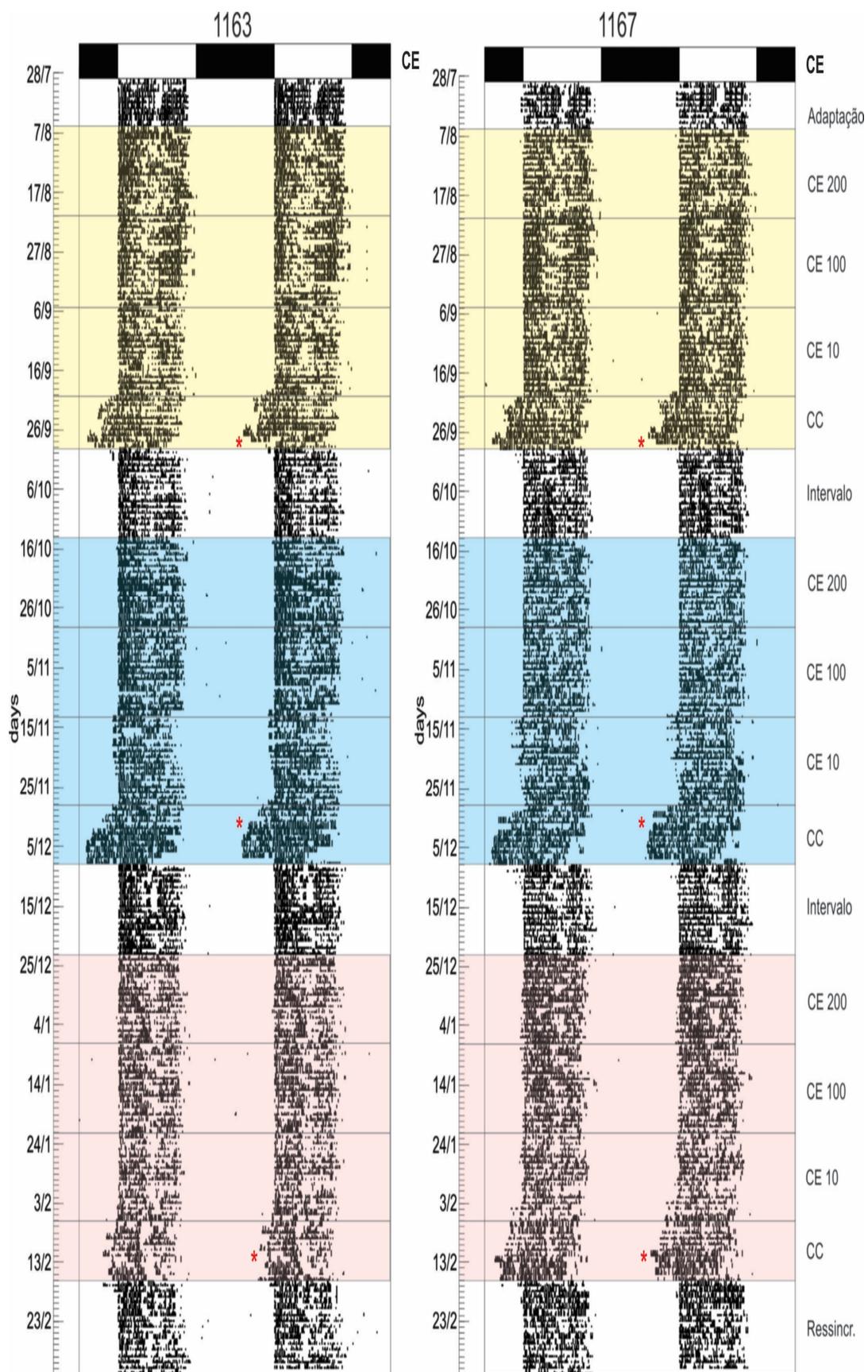


Figura 9: Actogramas dos animais 1163 e 1167 na Repetição do Experimento 1.

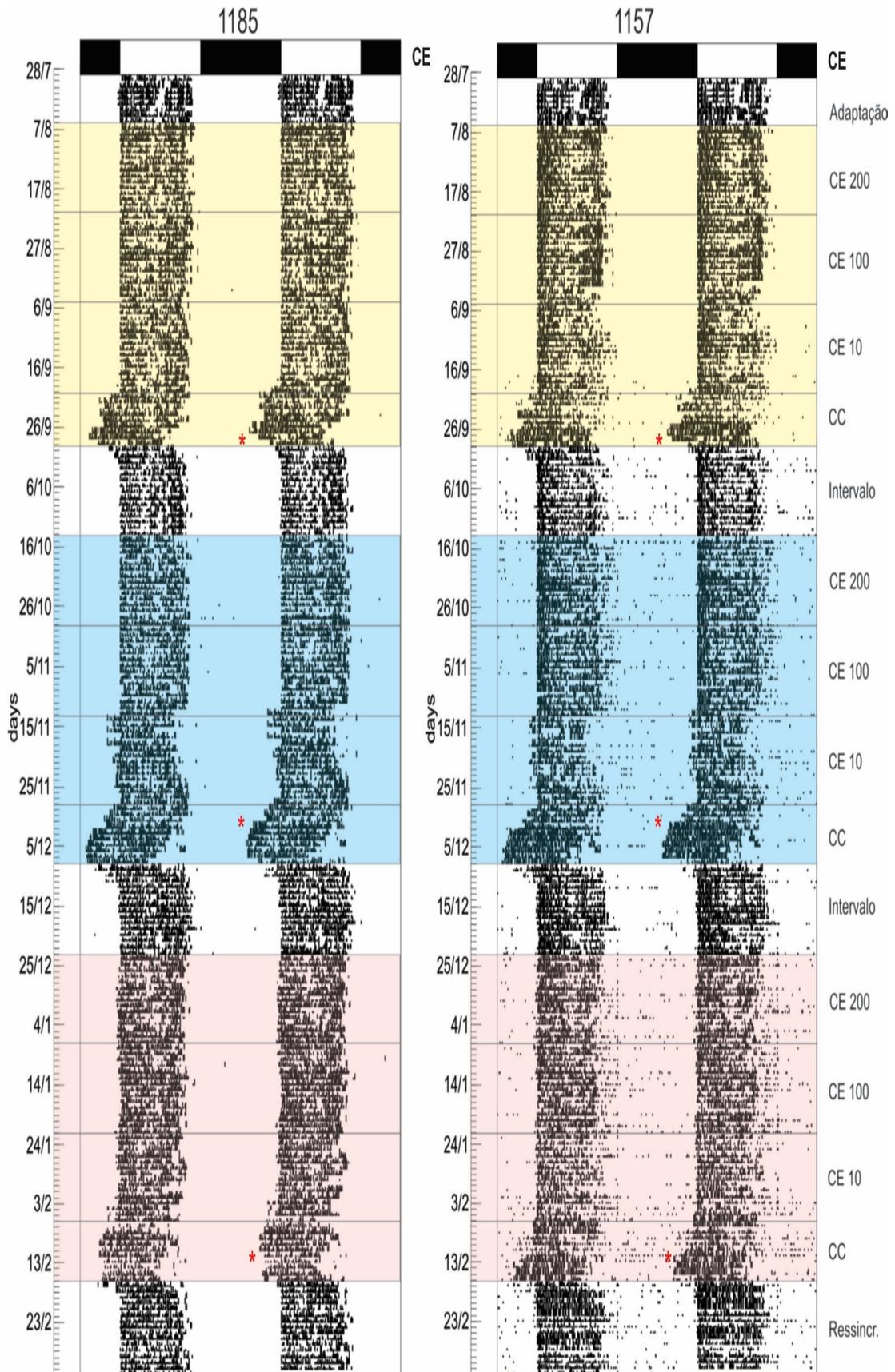


Figura 10: Actogramas dos animais 1185 e 1157 durante a Repetição do Experimento 1.

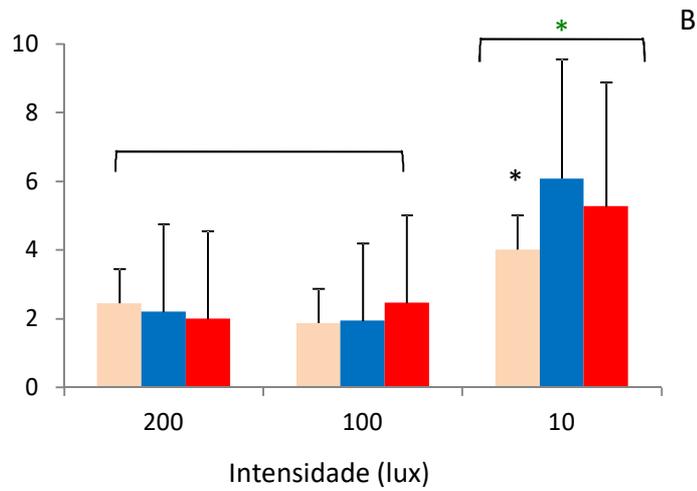
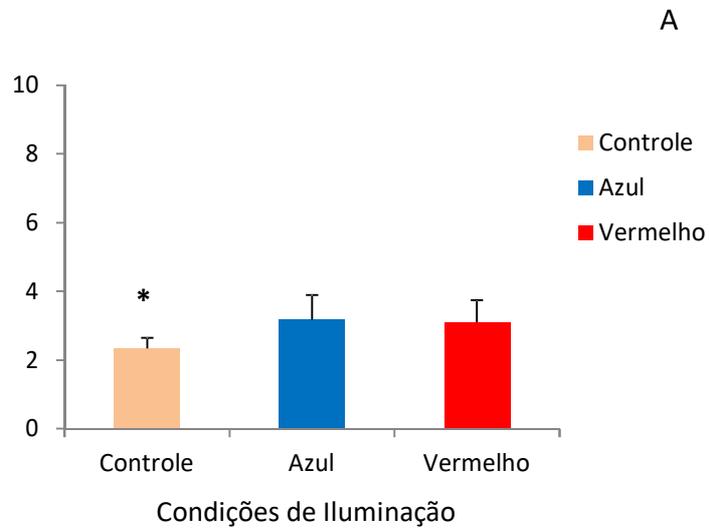
## 5.2 – PARÂMETROS DO RCA COM ILUMINAÇÃO CONTROLE, AZUL E VERMELHA EM CICLO CE (200 / 100/ 10 LUX)

### 5.2.1 - DIFERENÇA DE ÂNGULO DE FASE DO INÍCIO E FIM DA FASE ATIVA EM RELAÇÃO AO INÍCIO E FIM DA FASE DE CLARO ( $\Psi_i$ e $\Psi_f$ )

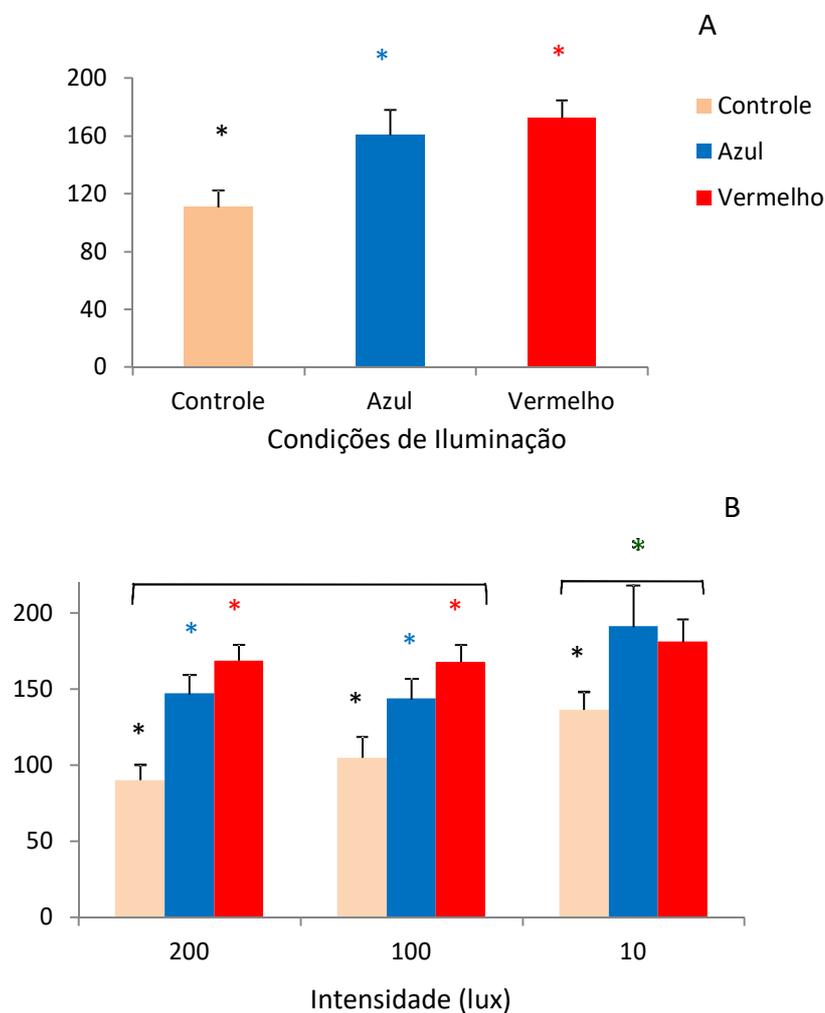
A diferença de ângulo de fase do início da fase ativa em relação ao início da fase de claro foi semelhante durante o uso das luzes azul e vermelha, e ambas diferiram em relação ao controle (ANOVA  $F_{(2,280)} = 8,16$ ,  $p < 0,01$ ; Tukey  $p < 0,05$ ), ou seja, os saguis anteciparam o início da atividade durante o uso das luzes azul e vermelha em relação ao controle (Figura 11 A). Na interação entre comprimentos de onda e intensidade da luz (Figura 11 B), observa-se que essa diferença ocorreu apenas em 10 lux (ANOVA  $F_{(4,560)} = 7,65$ ,  $p < 0,01$ ; Tukey  $p < 0,05$ ), ou seja, o início da fase ativa foi antecipado em relação ao controle nos dois comprimentos de onda apenas nessa intensidade.

A diferença de ângulo de fase do final da fase ativa em relação ao fim da fase de claro foi positiva nas três condições de iluminação, isto é, os animais anteciparam o final da atividade em relação ao apagar das luzes, e os valores diferiram entre o uso das luzes azul, vermelha e controle (ANOVA  $F_{(2,280)} = 22,13$ ,  $p < 0,01$ ; Tukey  $p < 0,01$  - Figura 12 A).

No pós-teste, verificou-se que a diferença de ângulo de fase para o final da fase ativa dos animais ocorreu entre o azul, o vermelho e o controle em 200 e 100 lux. Em 10 lux, azul e vermelho não diferiram entre si, apenas do controle ( $F_{(4,560)} = 9,32$ ,  $p < 0,01$ ; Tukey  $p < 0,01$ ). Além disso, os animais apresentaram uma antecipação para o final da atividade associada à redução na intensidade da luz nas três condições de iluminação (Figura 12 B).



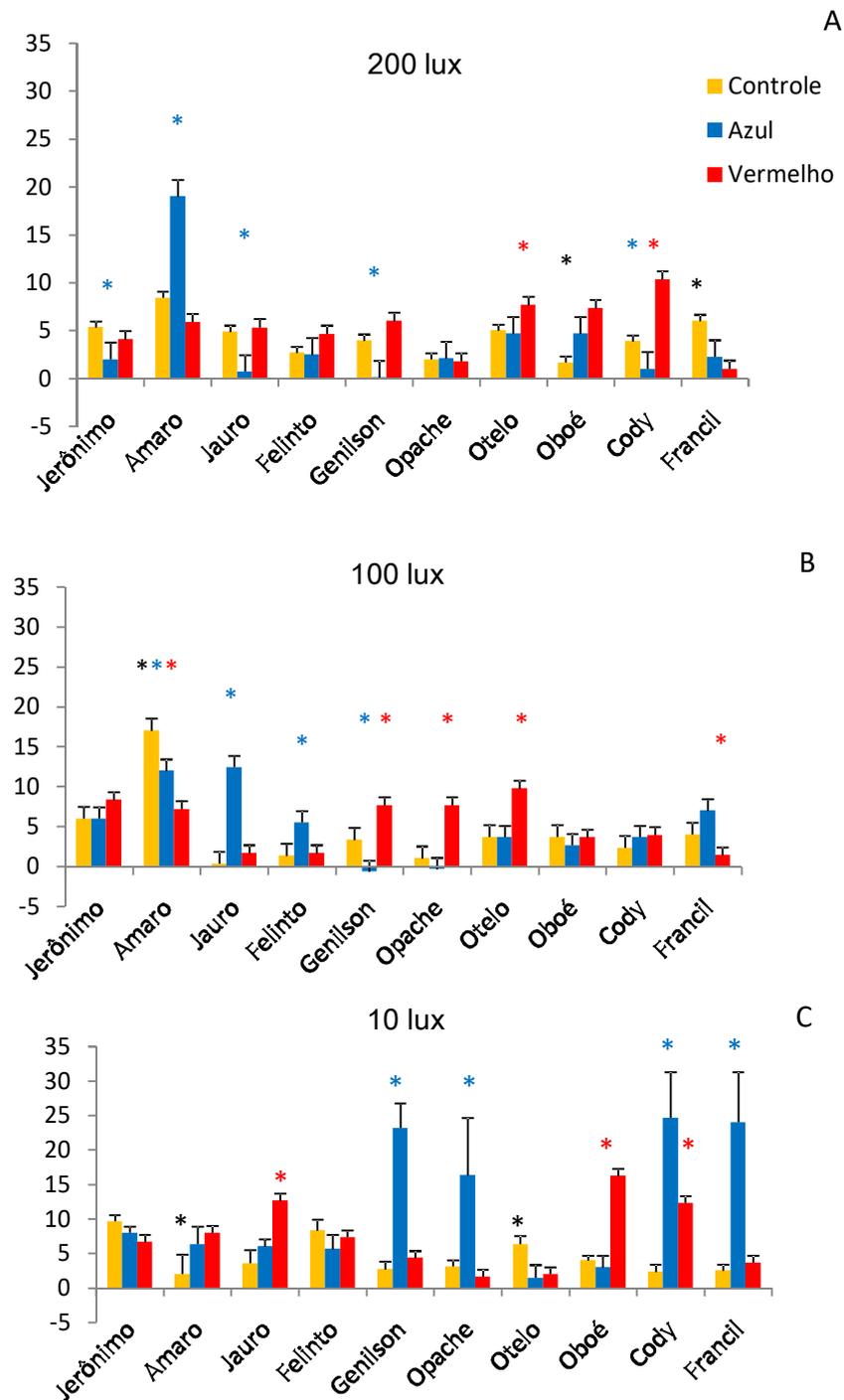
**Figuras 11 A e 11 B:** Diferenças de ângulo de fase entre o início da fase ativa e o início da fase de claro (média e erro padrão) nas diferentes condições experimentais. A linha horizontal indica o acender das luzes. Valores positivos correspondem ao início da atividade antes do início da fase de claro. O \* representa diferença do controle em relação ao azul e vermelho. O \* representa diferença entre a intensidade 10 lux e as demais (\*\*ANOVA  $p < 0,01$ ; Tukey  $p < 0,05$ ).



**Figuras 12 A e 12 B:** Diferenças de ângulo de fase entre o final da fase ativa e o final da fase de claro (média e erro padrão) nas diferentes condições experimentais. O zero indica o apagar das luzes. Quanto maior os valores no eixo Y, maior a antecipação do animal em relação ao apagar das luzes. O \* representa diferença do comprimento de onda azul em relação ao vermelho e ao controle, \* representa diferença do comprimento de onda vermelho em relação ao azul e ao controle e \* representa diferença do controle em relação ao azul e vermelho. O \* representa diferença entre a intensidade 10 lux e as demais (\*\*\*)ANOVA  $p < 0,01$ ; Tukey  $p < 0,01$ ).

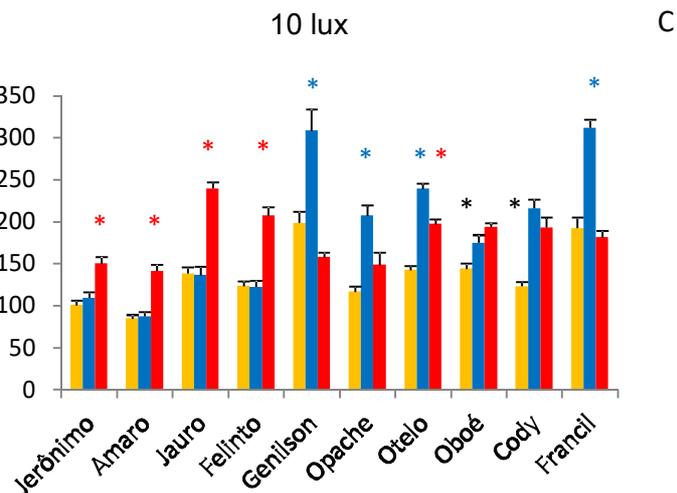
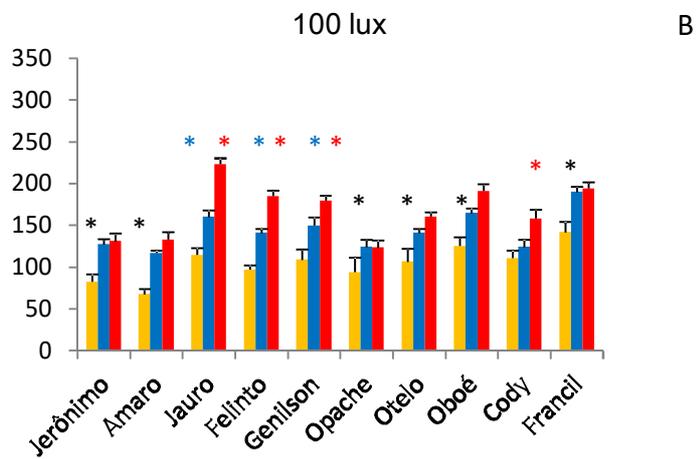
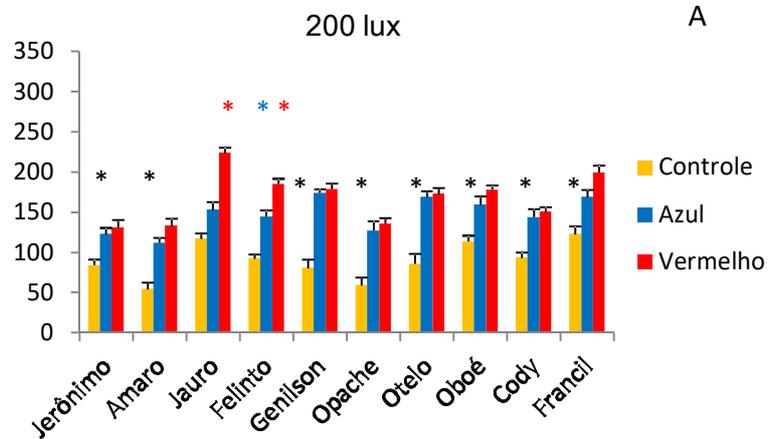
Na interação entre os comprimentos de onda e as intensidades de luz em cada animal, os saguis iniciam a atividade antes do acender das luzes, mas essa resposta varia entre os animais e entre as condições de iluminação em 200 ( $F_{(18,280)} = 3,8$ ,  $p < 0,01$ ; Tukey  $p < 0,05$ ), 100 ( $F_{(18,280)} = 3,4$ ,  $p < 0,01$ ; Tukey  $p < 0,05$ ) e 10 lux ( $F_{(18,280)} = 5,23$ ,  $p < 0,01$ ; Tukey  $p < 0,05$  - Figuras 13 A, B e C). Em 10 lux, ocorreu a maior diferença de ângulo de fase entre o início da fase ativa e o acender das luzes, e vários animais anteciparam o início da fase ativa em relação ao controle (4 animais com a luz azul e 3 animais com a luz vermelha). Os animais

que anteciparam o início da fase ativa em 10 lux na condição azul apresentaram alta instabilidade, o que foi evidenciado pelo erro-padrão (Figura 13 C).



**Figura 13:** Diferença de ângulo de fase entre o início da fase ativa e o início da fase de claro entre os animais em: **A)** 200 lux; **B)** 100 lux e **C)** 10 lux, com iluminação controle, azul e vermelha (média e erro padrão). O zero indica o acender das luzes. Valores positivos correspondem ao início da atividade antes do início da fase de claro. O \* representa diferença da luz azul em relação ao vermelho e ao controle, \* representa diferença da luz vermelha em relação ao azul e ao controle e \* representa diferença do controle em relação ao azul e vermelho (\*\* ANOVA  $p < 0,01$ ; Tukey  $p < 0,05$ ).

Em relação à diferença de ângulo de fase para o final da fase ativa em cada animal, todos os saguis anteciparam o final da fase ativa durante o uso das luzes azul e vermelha em relação ao controle (Figura 14 A, B e C), em 200 lux ( $F_{(18,280)} = 2,11$ ,  $p < 0,01$ ; Tukey  $p < 0,05$ ), 100 lux ( $F_{(18,280)} = 2,04$ ,  $p < 0,05$ ; Tukey  $p < 0,05$ ) e em 10 lux ( $F_{(18,280)} = 9,92$ ,  $p < 0,01$ ; Tukey  $p < 0,05$ ). Em 100 lux com a luz azul, somente Cody não diferiu do controle. Em 10 lux a resposta variou entre os animais: parte deles apresentou maior antecipação no azul e outros no vermelho. Em alguns, o azul não diferiu do vermelho, apenas do controle. Jerônimo, Amaro, Jauro e Felinto anteciparam o final da fase ativa em relação ao controle apenas com a luz vermelha - Figura 14 C (devido ao tamanho, a figura foi colocada na próxima página).

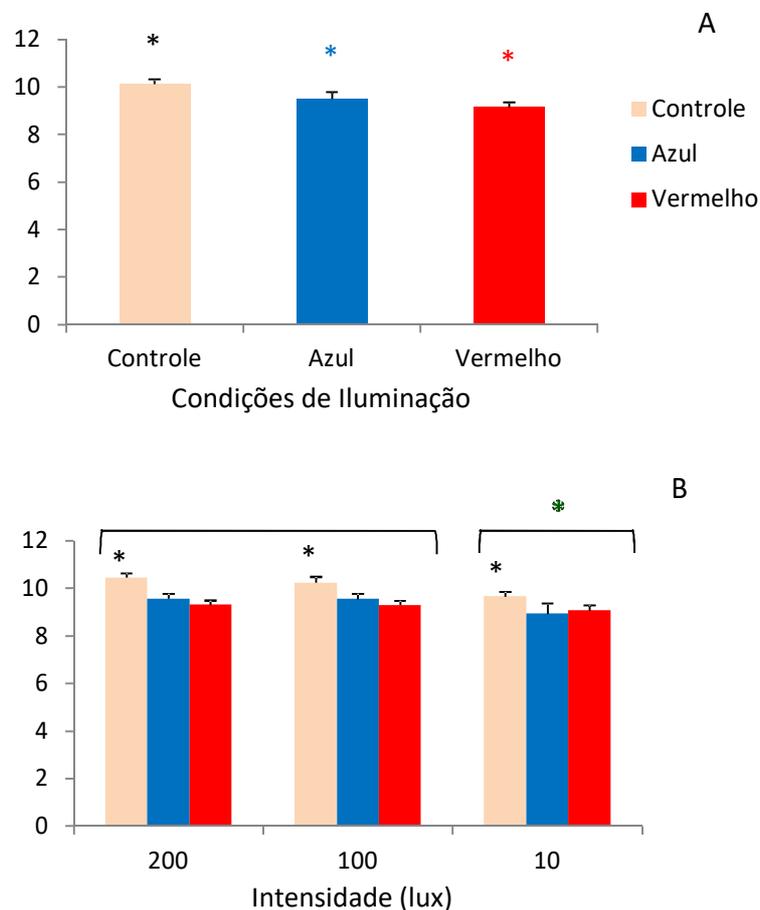


**Figura 14:** Diferenças de ângulo de fase entre o final da fase ativa e o final da fase de claro entre os animais em: A) 200 lux; B) 100 lux e C) 10 lux, com iluminação controle, azul e vermelha (média e erro padrão). O zero indica o apagar das luzes. Quanto maior os valores no eixo Y, maior a antecipação do animal em relação ao apagar das luzes. O \* representa diferença do comprimento de onda azul em relação ao vermelho e ao controle, \* representa diferença do comprimento de onda vermelho em relação ao azul e ao controle e \* representa diferença do controle em relação ao azul e vermelho (\*\*ANOVA,  $p < 0,01$ ; Tukey  $p < 0,05$ ).

### 5.2.3 – DURAÇÃO DA FASE ATIVA ( $\alpha$ )

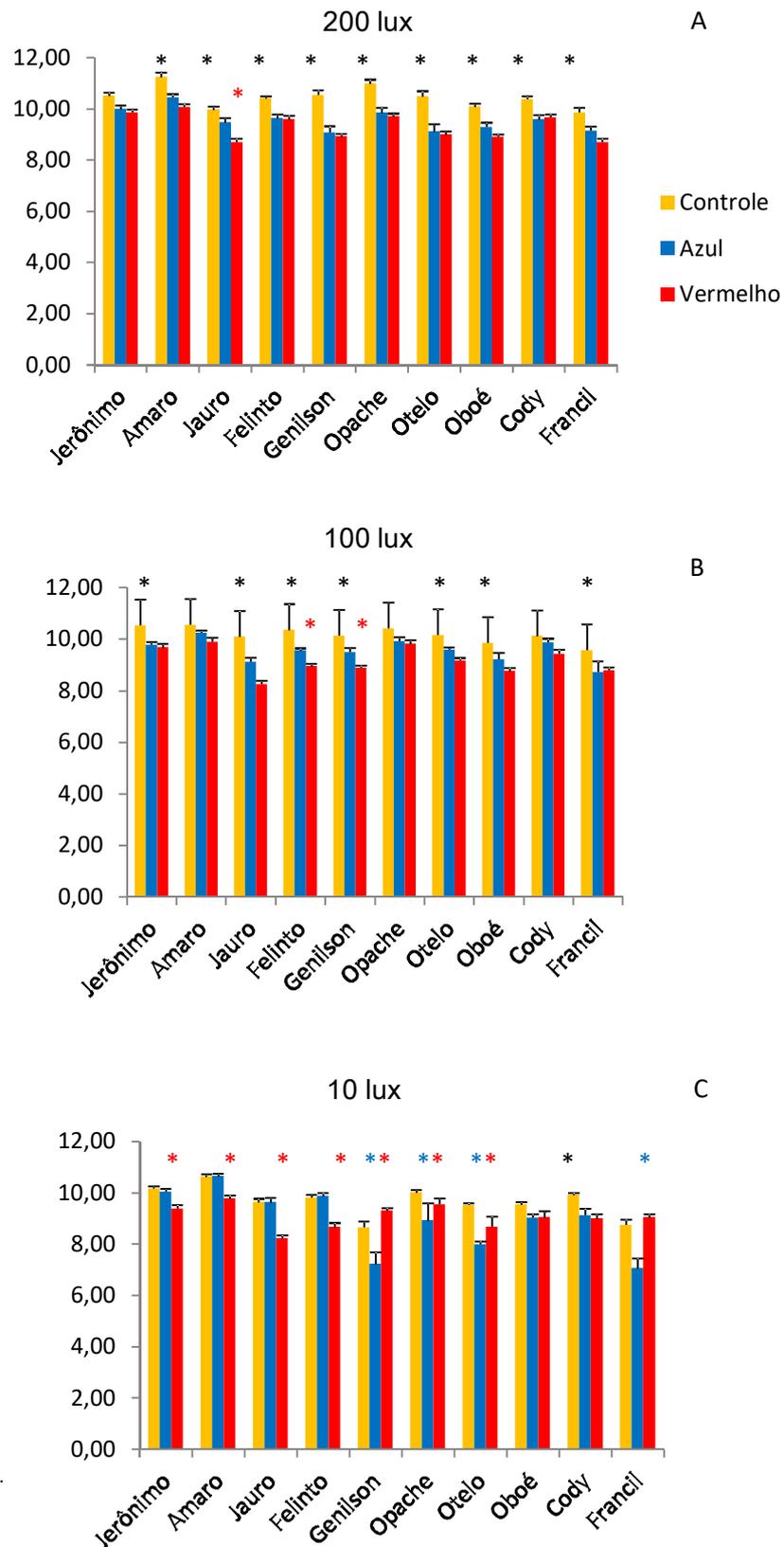
A duração da fase ativa foi menor durante o uso das luzes vermelha (9h15min  $\pm$  20 min) e azul (9h49min  $\pm$  30 min), diferindo entre si e do controle (10h11min  $\pm$  21 min) ( $F_{(2,280)} = 29,58$ ,  $p < 0,01$ ; Tukey  $p < 0,05$  - Figura 15A).

Na interação entre os comprimentos de onda e intensidades, houve uma redução na duração da fase ativa concomitante com a redução na intensidade da luz nas três condições de iluminação, e o controle diferiu do azul e vermelho nas três intensidades, enquanto o azul e o vermelho não diferiram entre si ( $F_{(4,560)} = 7,38$ ,  $p < 0,01$ ; Tukey  $p < 0,05$  - Figura 15 B).



**Figuras 15 A e 15 B:** Duração da fase ativa (média e erro padrão) nas diferentes condições experimentais. O \* representa diferença do comprimento de onda azul em relação ao vermelho e ao controle, \* representa diferença do comprimento de onda vermelho em relação ao azul e ao controle e \* representa diferença do controle em relação ao azul e vermelho. O \* representa diferença entre a intensidade 10 lux e as demais (\* \*\* \* ANOVA,  $p < 0,01$ ; Tukey  $p < 0,05$ ).

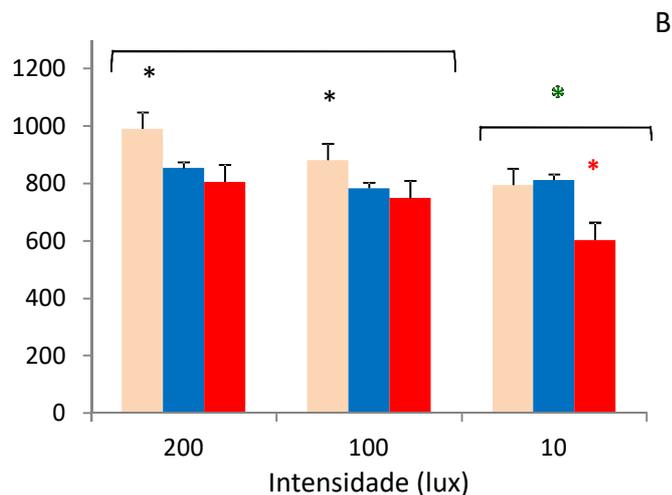
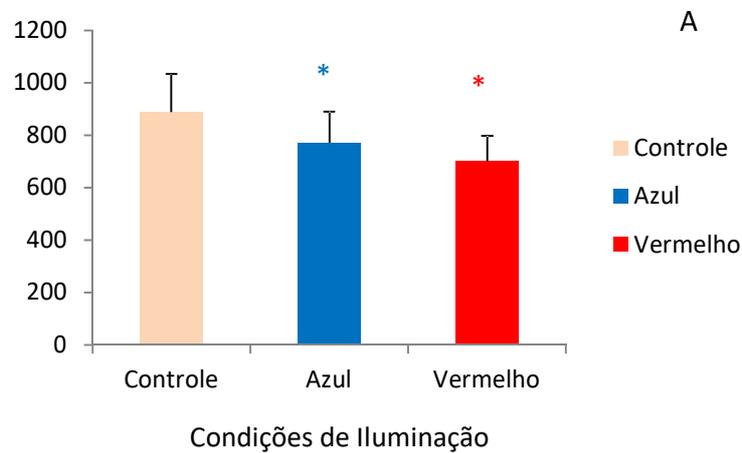
Na interação entre os comprimentos de onda e as intensidades da luz em cada animal, a duração da fase ativa em 200 lux foi menor no azul e vermelho em relação ao controle ( $F_{(18,280)} = 2,12$   $p < 0,05$ ; Tukey  $p < 0,05$ ), exceto em Jerônimo (Figura 16 A). Em 100 lux ( $F_{(18,280)} = 1,7$   $p < 0,05$ ; Tukey  $p < 0,05$ ), três animais não diferiram do controle (Amaro, Opache, e Cody - Figura 16 B). Em 10 lux, a duração da fase ativa foi reduzida no azul e vermelho em relação ao controle, com variações entre os animais ( $F_{(18,280)} = 7,70$   $p < 0,01$ ; Tukey  $p < 0,05$  - Figura 16 C). (Devido ao tamanho, a Figura 16 foi colocada na próxima página).



**Figura 16:** Duração da fase ativa entre os animais em: **A)** 200 lux; **B)** 100 lux e **C)** 10 lux (média e erro padrão), com iluminação controle, azul e vermelha. O \* representa diferença do comprimento de onda azul em relação ao vermelho e ao controle; \* representa diferença do comprimento de onda vermelho em relação ao azul e ao controle e \* representa diferença do controle em relação ao azul e vermelho (\*\* ANOVA,  $p < 0,01$ ; Tukey  $p < 0,05$ ).

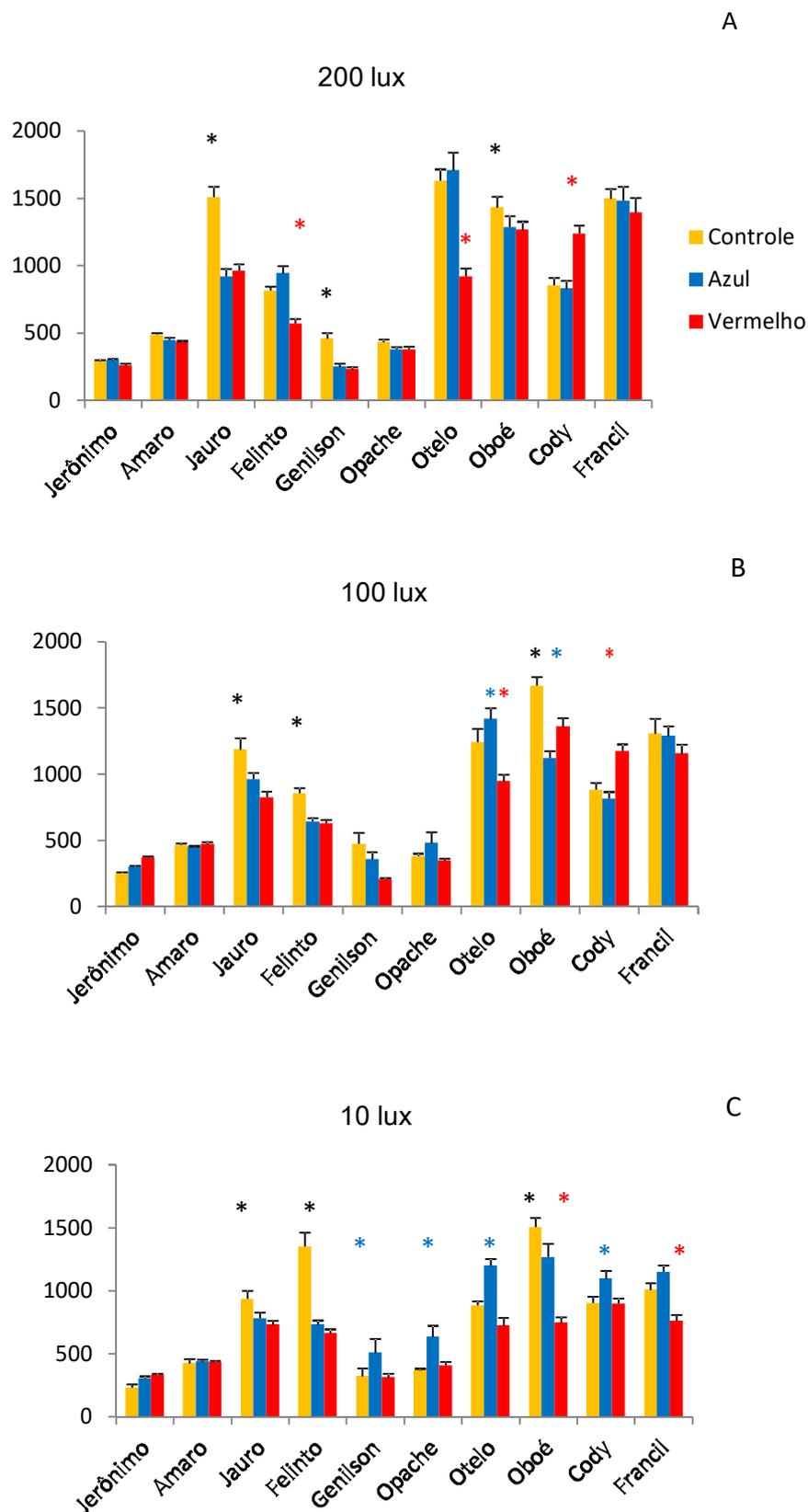
## 5.2.4 – TOTAL DE ATIVIDADE DIÁRIA

O total de atividade diária foi menor ( $F_{(2,280)} = 55,46$ ,  $p < 0,01$ ; Tukey  $p < 0,01$ ) durante o uso das luzes azul e vermelha em relação ao controle (Figura 17 A). Na interação entre comprimentos de onda e intensidade da luz (Figura 17 B), os menores totais de atividade diária ocorreram nas condições azul e vermelha, diferindo do controle em 200 e 100 lux. Em 10 lux, os menores totais de atividade ocorreram na condição com a luz vermelha ( $F_{(4,560)} = 8,57$ ,  $p < 0,01$ ; Tukey  $p < 0,05$ ).



**Figuras 17 A e 17 B:** Total de atividade diária (média e erro padrão) nas diferentes condições experimentais. O \* representa diferença do comprimento de onda azul em relação ao vermelho e ao controle; \* representa diferença do comprimento de onda vermelho em relação ao azul e ao controle e \* representa diferença do controle em relação ao azul e vermelho. O \* representa diferença entre a intensidade 10 lux e as demais (\* \*\* \* ANOVA  $p < 0,01$ ; Tukey  $p < 0,05$ ). Valores expressos em unidades arbitrárias (u.a.).

Na análise do total de atividade diária dos saguis, considerando o efeito dos comprimentos de onda e intensidade da luz em cada animal, verificamos que a redução do total de atividade diária durante o uso da luz e vermelha não ocorreu de modo uniforme entre os animais em 200 ( $F_{(18,280)} = 18,41$ ,  $p < 0,01$ ; Tukey  $p < 0,01$ ), 100 ( $F_{(18,280)} = 7,03$ ,  $p < 0,01$ ; Tukey  $p < 0,05$ ) e 10 lux ( $F_{(18,280)} = 10,52$ ,  $p < 0,01$ ; Tukey  $p < 0,01$  - Figura 18 A, B e C - devido ao tamanho, a figura foi colocada na próxima página).

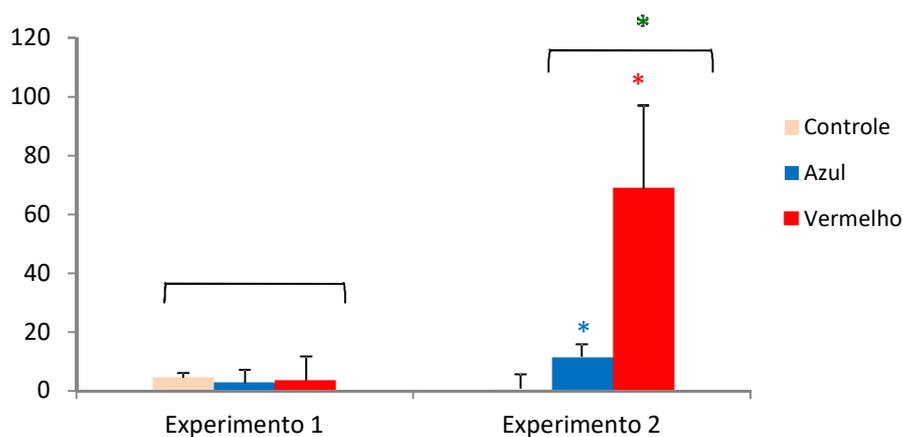


**Figura 18:** Total de atividade diária dos animais em: **A)** 200 lux; **B)** 100 lux e **C)** 10 lux (média e erro padrão), com iluminação controle, azul e vermelha. O \* representa diferença do comprimento de onda azul em relação ao vermelho e ao controle; \* representa diferença do comprimento de onda vermelho em relação ao azul e ao controle e \* representa diferença do controle em relação ao azul e vermelho (\*\*ANOVA  $p < 0,01$ ; Tukey  $p < 0,05$ ). Valores expressos em unidades arbitrárias (u.a).

### 5.3 – PARÂMETROS DO RCA (ILUMINAÇÃO CONTROLE, AZUL E VERMELHA/CE 200 LUX) EM RELAÇÃO À DURAÇÃO DO EXPERIMENTO

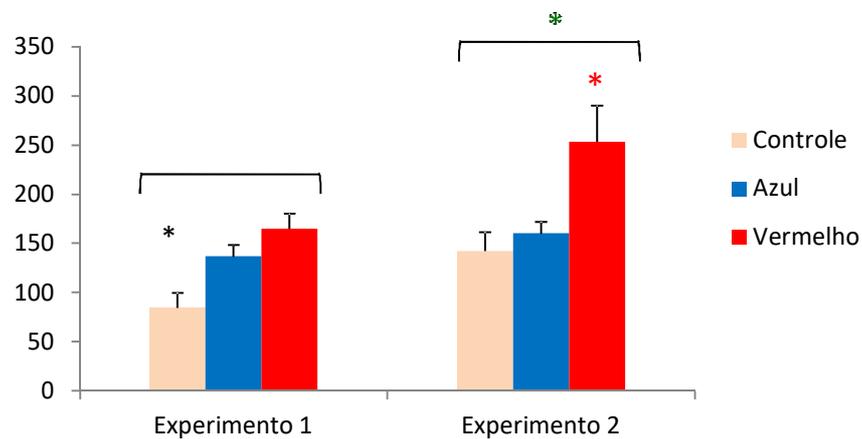
#### 5.3.1 - DIFERENÇA DE ÂNGULO DE FASE DO INÍCIO E FIM DA FASE ATIVA EM RELAÇÃO AO INÍCIO E FIM DA FASE DE CLARO ( $\Psi_i$ e $\Psi_f$ )

A maior variação na diferença de ângulo de fase do início da fase ativa em relação à duração dos experimentos ocorreu no protocolo mais curto (Experimento 2). Os animais exibiram antecipação para o ângulo de início da fase ativa nas condições com luz vermelha e azul, que diferiram entre si e também do controle ( $F_{(4,314)} = 22,82$ ,  $p < 0,01$ ; Tukey  $p < 0,01$ ). Na condição com luz vermelha, o início da fase ativa ocorreu mais de uma hora antes do acender das luzes, e também exibiu maior instabilidade entre os animais (Figura 19).



**Figura 19:** Diferenças de ângulo de fase entre o início da fase ativa e o início da fase de claro (média e erro padrão) nas duas etapas experimentais. O zero indica o acender das luzes. Valores positivos correspondem ao início da atividade antes do início da fase de claro. O \* representa diferença do comprimento de onda azul em relação ao vermelho e ao controle; \* representa diferença do comprimento de onda vermelho em relação ao azul e ao controle. O \* representa diferença entre os Experimentos 1 e 2 (\*\* ANOVA,  $p < 0,01$ ; Tukey  $p < 0,01$ ).

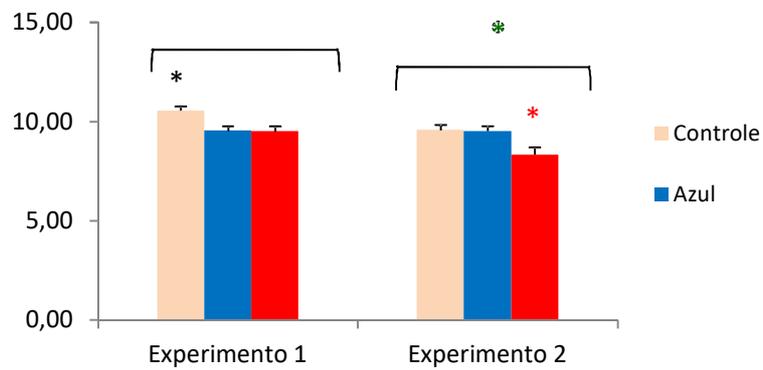
Quanto a diferença de ângulo de fase do final da fase ativa, também houve maior antecipação para o final da atividade em relação ao apagar das luzes no protocolo mais curto (Experimento 2), durante a exposição dos animais à luz vermelha ( $F_{(4,314)} = 11,55$ ,  $p < 0,01$ ; Tukey  $p < 0,05$ ). No experimento 1, os animais também anteciparam o final da fase ativa em relação ao apagar das luzes, diferindo do controle, mas não entre o azul e o vermelho (Figura 20).



**Figura 20:** Diferenças de ângulo de fase entre o final da fase ativa e o final da fase de claro (média e erro padrão) nas duas etapas experimentais. O zero indica o apagar das luzes. Quanto maior os valores no eixo Y, maior a antecipação do animal em relação ao apagar das luzes. O \* representa diferença do comprimento de onda vermelho em relação ao azul e ao controle e \* representa diferença do controle em relação ao azul e vermelho. O \*\* representa diferença entre os Experimentos 1 e 2 (\*\* ANOVA,  $p < 0,01$ ; Tukey  $p < 0,05$ ).

### 5.3.2 - DURAÇÃO DA FASE ATIVA ( $\alpha$ )

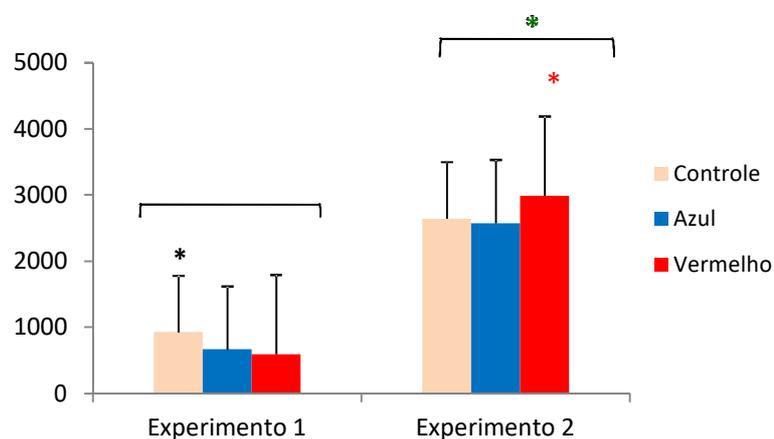
Levando-se em conta a duração dos experimentos, a duração da fase ativa foi menor durante o protocolo mais curto (Experimento 2), na condição com a luz vermelha ( $F_{(4,314)} = 11,54$ ,  $p < 0,01$ ; Tukey  $p < 0,05$ ). No experimento mais longo (Experimento 1) o alfa dos saguis foi reduzido em azul e vermelho, diferindo do controle (Figura 21).



**Figura 21:** Duração da fase ativa (média e erro padrão) nas diferentes condições experimentais. O \* representa diferença do comprimento de onda vermelho em relação ao azul e ao controle e \* representa diferença do controle em relação ao azul e vermelho. O \* representa diferença entre os Experimentos 1 e 2 (\*\*ANOVA,  $p < 0,01$ ; Tukey  $p < 0,01$ ).

### 5.3.3 – TOTAL DE ATIVIDADE DIÁRIA

O total de atividade diária dos saguis no protocolo experimental mais curto (Experimento 2) foi superior aos valores registrados no Experimento 1, e os animais foram mais ativos durante o uso da luz vermelha ( $F_{(4,314)} = 4,09$ ,  $p < 0,01$ ; Tukey  $p < 0,01$ ). Durante o protocolo mais longo (Experimento 1), o total de atividade diária dos animais na condição controle foi maior que os valores registrados durante uso da luz azul e da luz vermelha (Figura 22).



**Figura 22:** Total de atividade diária (média e erro padrão) nas diferentes condições experimentais. O \* representa diferença do comprimento de onda vermelho em relação ao azul e ao controle e \* representa diferença do controle em relação ao azul e vermelho. O \* representa diferença entre os Experimentos 1 e 2 (\*\*ANOVA,  $p < 0,01$ ; Tukey  $p < 0,01$ ). Valores expressos em unidades arbitrárias (u.a).

## 5.4 – ANÁLISE VISUAL DOS PERFIS CIRCADIANOS DE ATIVIDADE DOS SAGUIS NO EXPERIMENTO 2

A análise visual dos perfis circadianos de atividade dos seis animais durante o Experimento 2 (Figuras 23, 24 e 25) mostram a sincronização dos saguis ao ciclo CE, com padrão de atividade exclusivamente diurno. Durante o CC, os saguis não responderam igualmente aos diferentes esquemas de iluminação, apresentando variações na distribuição diária da atividade e nos parâmetros de sincronização durante as etapas experimentais.

Durante o ciclo CE controle, todos os animais mostraram-se sincronizados por arrastamento, e na mudança para o CC controle, todos entraram em livre-curso com período menor do que 24h, exceto o animal 1089, que apresentou um ritmo de atividade bastante fragmentado (Figura 25). Além disso, os animais mostraram ter o ritmo perturbado por duas falhas no fornecimento de energia elétrica ocorrida no Núcleo de Primatologia durante essa etapa (dias 14 e 26/12/14, sinalizados com \* nos actogramas). Os animais 1103 e 1105 (Figura 23) apresentaram o ritmo em livre curso com período um pouco maior que os demais animais durante o CC controle, e que se manteve relativamente estável durante toda a etapa. No final do CC controle, durante a ressinchronização ao CE fluorescente, com exceção do animal 1089, todos os saguis apresentaram transientes, indicando sincronização por arrastamento ao CE com luz fluorescente. No entanto, o intervalo de 10 dias foi insuficiente para a total sincronização dos animais ao CE controle (Intervalo 1).

Durante o CE com a luz azul, os animais não apresentaram uma relação de fase estável com o acender das luzes, e os saguis 1135, 1111, 1243 e 1089 apresentaram uma atividade mais fragmentada no final da fase ativa. Na entrada em CC com a luz azul, os animais 1111 e 1089 apresentaram um padrão mais estável que durante o CC controle e

entraram em livre curso, com período menor que 24h. Durante o CC azul, falhas no fornecimento de energia (dias 12 e 20/02/15, sinalizados com \* nos actogramas) causaram perturbações no ritmo em livre-curso dos saguis. O animal 1103 entrou em livre curso, com um período muito próximo à 24h. O sagui 1105 entrou em livre curso, com período menor que 24h, mas apresentou elevada instabilidade no final da fase ativa (Figura 23). Na mudança para o ciclo CE controle, após a etapa azul, os animais, com exceção do sagui 1111, exibiram transientes.

Durante o ciclo CE com a luz vermelha, os saguis 1111 e 1089 não estiveram sincronizados, e apresentaram um período menor que 24h. O sagui 1135 apresentou uma acentuada redução da fase ativa nessa condição e os demais animais apresentaram um ritmo de atividade um pouco instável. Na condição CC com a luz vermelha, os saguis 1135, 1243 e 1089 entraram em livre curso, com período menor do que 24h, enquanto o animal 1103 apresentou um ritmo de atividade irregular nos primeiros dias em CC vermelho, mas a partir do dia 30/03/15 expressou o ritmo em livre curso, porém, falhas no fornecimento de energia (dias 17 e 30/03 e 07/04/15, sinalizados com \* nos actogramas) afetaram esse processo (Figura 23). O animal 1111 exibiu elevada irregularidade no início do CC em vermelho, e somente nos últimos dias apresentou período menor do que 24h em livre curso. O sagui 1105 apresentou um padrão de atividade coeso, com ritmo em livre curso, com período menor do que 24h, mas ressinchronizou ao CE no final da etapa sem a presença de transientes, enquanto os saguis 1135 e 1243 apresentaram transientes na ressinchronização ao ciclo CE no final do CC com luz vermelha (Figuras 24 e 25).

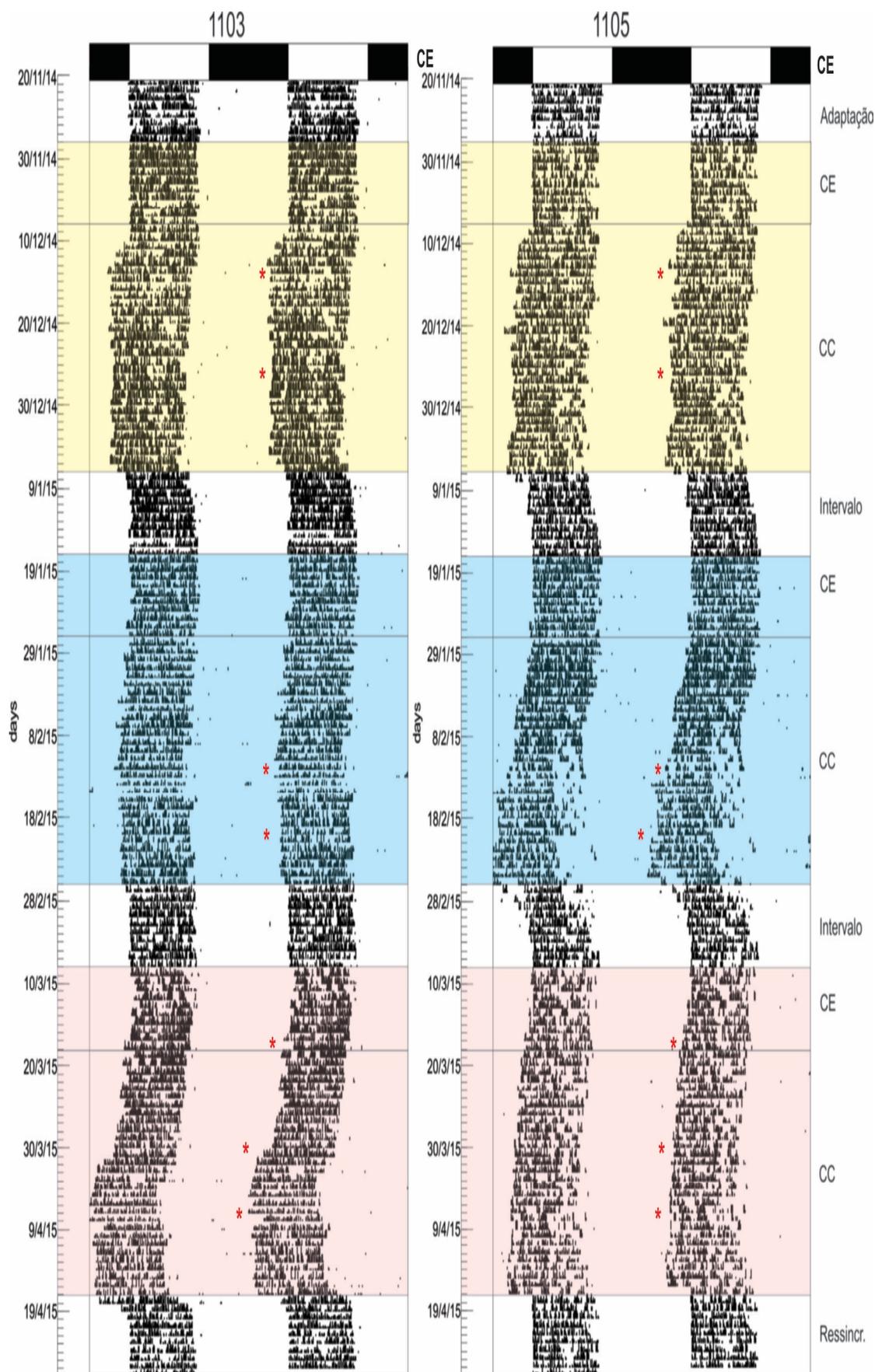


Figura 23: Actogramas dos animais 1103 e 1105 durante o Experimento 2.

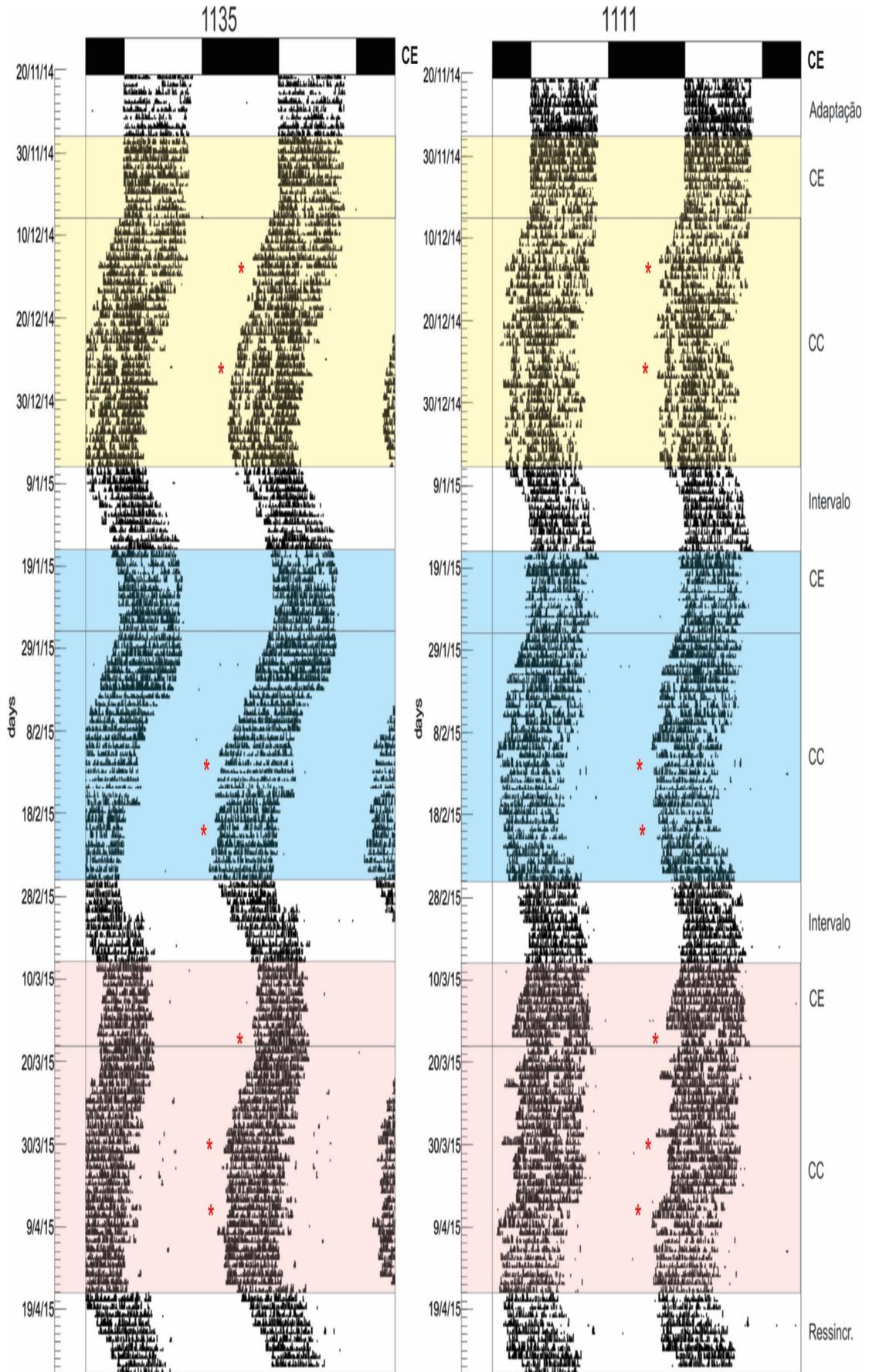


Figura 24: Actogramas dos animais 1135 e 1111 durante o Experimento 2.

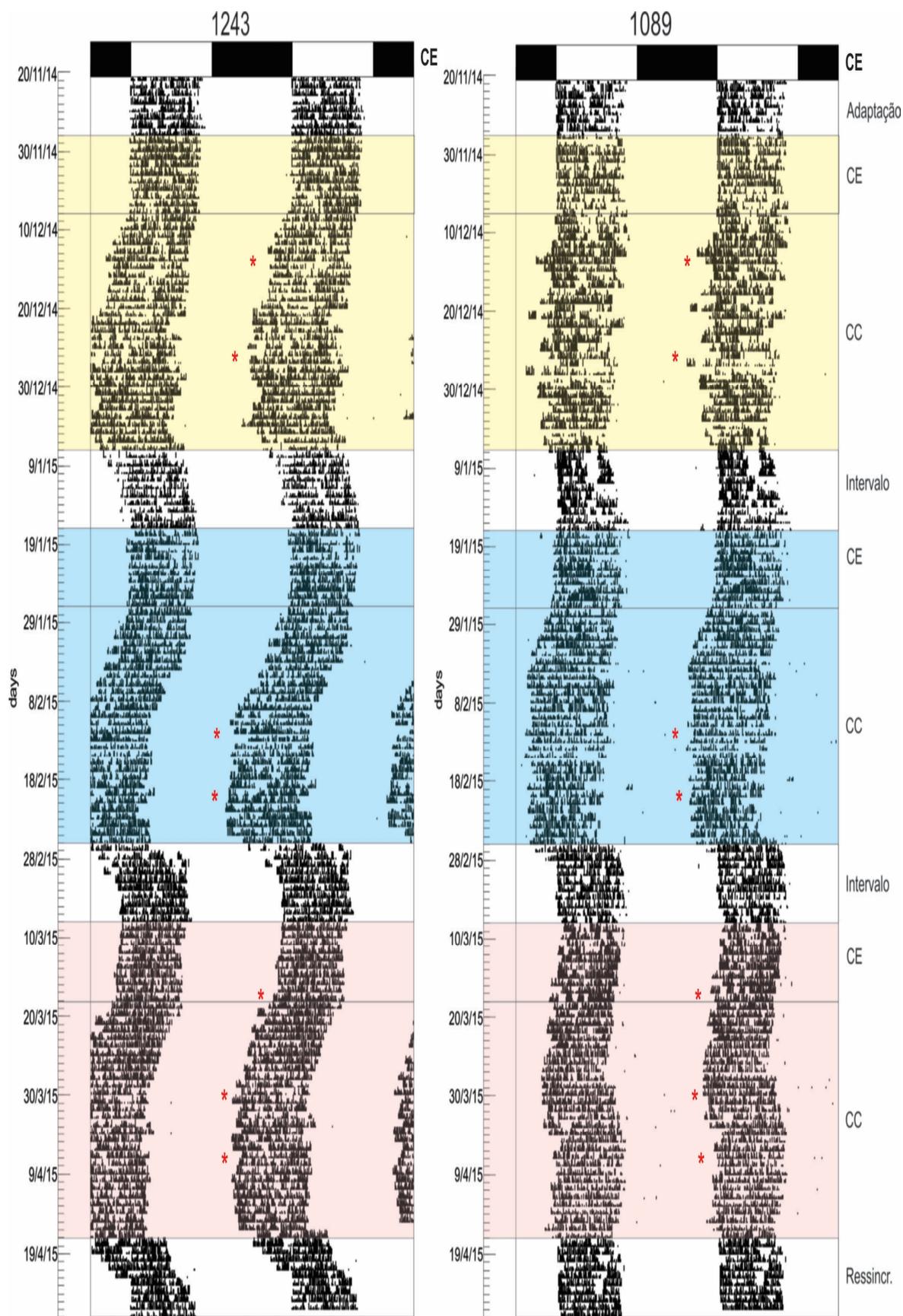
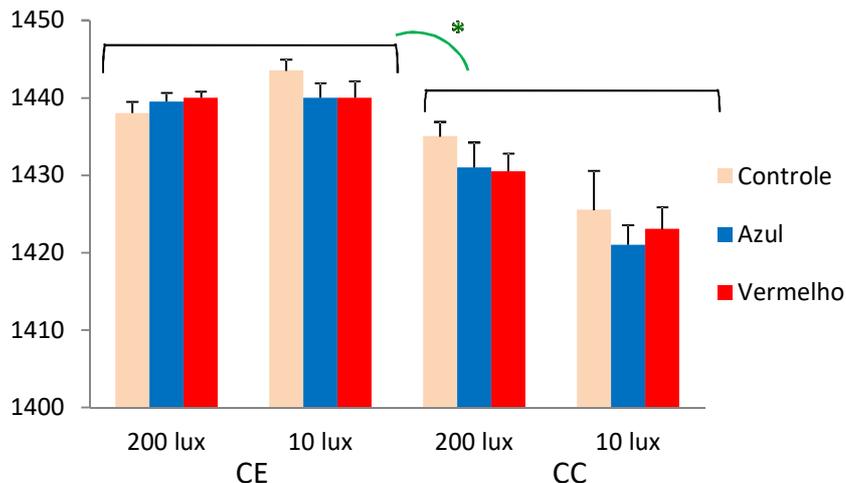


Figura 25: Actogramas dos animais 1243 e 1089 durante o Experimento 2.

## 5.5 – PERÍODO E POTÊNCIA DO PERÍODO DO RITMO CIRCADIANO DE ATIVIDADE COM ILUMINAÇÃO CONTROLE, AZUL E VERMELHA EM CE E CC/200 LUX E 10 LUX

### 5.5.1 – PERÍODO DO RITMO CIRCADIANO DE ATIVIDADE

O período do RCA não diferiu entre as intensidades ou comprimentos de onda da luz ( $F_{(2,28)} = 0,088$ ,  $p=0,92$ ) dentro da mesma condição (CE e CC). Ocorreram diferenças apenas entre as condições CE e CC ( $F_{(1,14)} = 48,17$ ,  $p<0,01$ ; Tukey  $p<0,01$ ), pois em CE o ritmo apresentou um  $T=24h$ , caracterizando a sincronização do ritmo de atividade ao CE, e durante o CC, os animais expressaram um  $\tau$  menor, ( $\tau=23,7h$ ), característico do ritmo em livre curso.

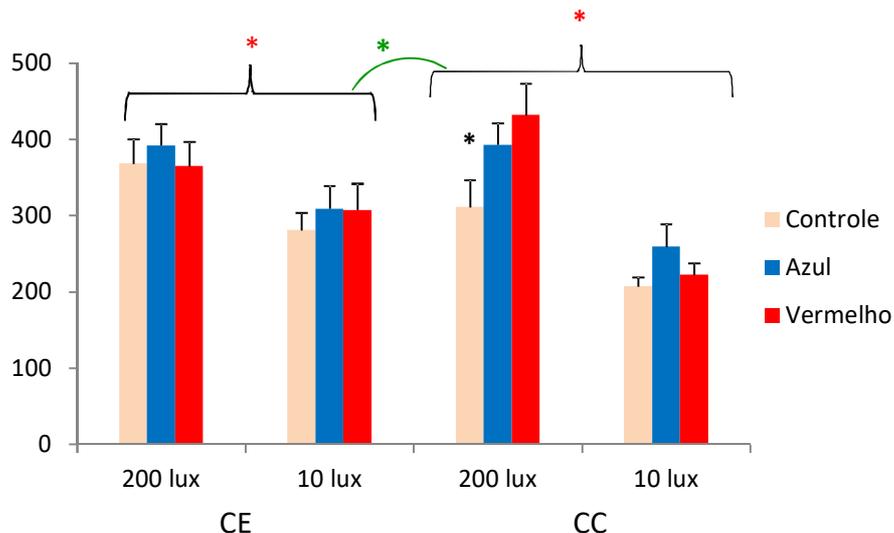


**Figura 26:** Período do ritmo circadiano de atividade (média e erro padrão) nas diferentes condições experimentais. O \* representa diferença entre as condições em CE e CC (\*ANOVA,  $p<0,01$ ; Tukey  $p<0,01$ ).

## 5.5.2 – POTÊNCIA DO PERÍODO DO RITMO CIRCADIANO DE ATIVIDADE

A potência espectral do período do RCA foi maior durante o uso do azul e vermelho, em relação ao controle, apenas na intensidade de 200 lux e na condição CC. Além disso, azul e vermelho não diferiram entre si, apenas do controle ( $F_{(2,28)} = 11,92$ ,  $p < 0,01$ ; Tukey  $p < 0,01$ ).

Na interação entre os comprimentos de onda, intensidades (200 lux e 10 lux) e condições de iluminação (CE e CC), verificou-se que ocorreu um aumento na potência do RCA em ambas as condições de iluminação (CE e CC), de forma associada a um aumento na intensidade de luz, tanto durante o controle, como também durante o uso das luzes azul e vermelha ( $F_{(2,28)} = 13,09$ ,  $p < 0,01$ ; Tukey  $p < 0,05$  - Figura 27).



**Figura 27:** Potência espectral do período do ritmo circadiano de atividade (média e erro padrão) nas diferentes condições experimentais. O \* representa diferença do controle em relação ao azul e vermelho. O \* representa diferença entre as intensidades dentro da mesma condição. O \* representa diferença entre as condições em CE e CC (\*\*ANOVA,  $p < 0,01$ ; Tukey  $p < 0,05$ ). Valores expressos em unidades arbitrárias (u.a.).

## 6. DISCUSSÃO

O estudo atual foi pioneiro em avaliar o efeito dos comprimentos de onda sobre o ritmo circadiano de atividade motora em saguis adultos, trazendo elementos para a compreensão dos mecanismos de fotorrecepção envolvidos nas respostas circadianas nesses animais.

A primeira hipótese lançada foi que os parâmetros de sincronização do ritmo de atividade motora dos saguis (diferença de ângulo de fase do início e fim da atividade em relação ao início e fim da fase de claro, e duração da fase ativa) modificavam-se em função dos diferentes comprimentos de onda utilizados na fase de claro de um ciclo CE 12:12. Contrariando a predição elaborada, as diferenças de ângulo de fase para o início e fim da fase ativa foram semelhantes durante o uso das luzes azul e vermelha, exibindo maior instabilidade em ambos em relação ao controle, como pode ser visualizado no desvio padrão da média desses valores. Verificamos ainda que os animais apresentaram uma diferença de ângulo de fase positiva em relação ao acender e apagar das luzes durante o azul, o vermelho e o controle, com maior antecipação nos ângulos de início e fim da fase ativa durante o azul e o vermelho.

Investigações anteriores com essa espécie corroboram a antecipação para o início e final da fase ativa em relação ao ciclo CE, exibidas neste experimento em todas as condições estudadas. Segundo Erkert (1989), em condições de CE 12:12, os saguis acordam antes do início da fase de claro e permanecem na caixa-ninho até a luz acender, para somente então iniciar sua atividade; enquanto o final da atividade ocorre geralmente 1 a 2 horas antes do apagar das luzes, caracterizando uma diferença de ângulo de fase positiva entre o final da atividade e final da fase de claro. Resultados semelhantes para as diferenças

de ângulo de fase do início e fim da atividade foram observados em estudos anteriores realizados em nosso laboratório com saguis adultos em ciclo CE 12:12 com iluminação fluorescente (Gonçalves *et al.* 2009; Lampert *et al.* 2011). Portanto, o uso da iluminação monocromática na faixa espectral dos comprimentos de onda curtos e longos da luz, não modificou as relações de fase positivas do início e fim da fase ativa observada nessa espécie em iluminação fluorescente.

Observamos ainda que a duração da fase ativa dos animais foi menor durante o uso das luzes azul ( $9,49h \pm 30$  min) e vermelha ( $9,15h \pm 20$  min) em relação ao controle ( $10,11h \pm 21$  min). Os valores para a duração média da fase ativa encontrados na condição controle estão de acordo com os descritos para essa espécie em ciclo CE 12:12, que pode variar entre aproximadamente 10 a 11h (Erkert 1989; Gonçalves *et al.* 2009; Lampert *et al.* 2011). Para saguis mantidos em cativeiro expostos ao ciclo CE natural e para animais de vida livre, a média registrada para a duração da fase ativa é mais longa, em torno de 11,6 h (Menezes *et al.* 1993; Castro *et al.* 2003).

A menor duração da fase ativa durante o uso das luzes azul e vermelha pode ser relacionada à maior antecipação no final da fase ativa, que ocorreu em todas as intensidades com o uso do azul e vermelho em relação ao controle (pois no início da fase ativa os animais mantidos sob luz azul e vermelha diferiram do controle apenas na intensidade de 10 lux). Isso sugere que os saguis respondem de modo distinto à incidência da luz no início e final da fase ativa. Essas respostas estão de acordo com a proposta de Pittendrigh & Daan (1976), para explicar o perfil de atividade em roedores noturnos, no qual a expressão do ritmo circadiano de atividade seria regulada por dois osciladores: um matutino (M), atrelado ao nascer do sol, e outro vespertino (V), vinculado ao pôr do sol, e ambos reagiriam de forma distinta aos estímulos fóticos. Gomez e colaboradores (2012) obtiveram resultados

semelhantes ao investigar a fotorrecepção e o efeito do envelhecimento sobre a sincronização do RCA no primata noturno *Microcebus murinus*. Esses autores testaram três comprimentos de onda em diferentes intensidades, e observaram que o envelhecimento reduziu a capacidade de resposta dos animais à luz, e que o comprimento de onda curto (430 nm) foi mais eficiente que comprimentos de onda mais longos (470-540 nm) em baixas intensidades ao amanhecer e em todas as intensidades ao anoitecer, sugerindo a participação dos cones curtos na regulação da ritmicidade circadiana nesta espécie durante o envelhecimento, com ação diferencial ao amanhecer e ao anoitecer. A ação diferenciada da luz ao amanhecer e ao anoitecer neste primata noturno é semelhante aos achados do presente estudo, onde também observamos respostas distintas aos estímulos fóticos apresentados no início e final da fase ativa.

Estudos anteriores realizados em nosso laboratório com animais em cativeiro (Menezes *et al.* 1993; 1998) e em campo (Castro *et al.* 2003) descreveram um perfil bimodal para o ritmo de atividade motora desta espécie, e sugeriram que esta distribuição bimodal seria uma evidência de que o RCA dos saguis seria regulado por dois osciladores, concordando com o modelo proposto por Pittendrigh & Daan (1976). Mais recentemente, outro estudo de nosso laboratório (Melo *et al.* 2016), sobre o ritmo de atividade de saguis púberes em grupos familiares, descreveu a presença de dois picos de atividade, um pela manhã e outro à tarde, e novamente relacionaram esta bimodalidade à proposta de Pittendrigh & Daan (1976).

Em um estudo promovendo a dessincronização forçada sob ciclo claro-escuro de 21h em saguis, Silva (2012) observou a ocorrência de dois componentes circadianos distintos para os ritmos de atividade motora e vocalização, relatando que um grupo de osciladores sincronizou ao ciclo CE, enquanto outro grupo de osciladores entrou em livre-curso, fato

provavelmente causado por uma sincronização parcial do NSQ. Mais recentemente, Silva e colaboradores (2015), descrevendo a organização funcional do sistema de temporização circadiana dos saguis, explicam que a presença de dois componentes circadianos distintos pode indicar que o sistema circadiano deste primata assemelha-se ao sistema circadiano dos roedores, consistindo de pelo menos dois grupos de osciladores acoplados.

Nesse ponto, cabe destacar que o fato das luzes azuis e vermelhas terem desencadeado respostas semelhantes foi surpreendente, pois esperávamos uma ação mais efetiva das células ganglionares da retina dos saguis, em virtude do uso da luz de comprimento de onda curto, na faixa visível da luz azul. Na literatura, vários trabalhos destacam que as respostas mediadas pelas células ganglionares intrinsecamente fotossensíveis são mais eficazes utilizando-se luz monocromática de ondas curtas nos protocolos experimentais. Berson e colaboradores (2002) comprovaram a capacidade de foto transdução intrínseca dessas células em roedores, utilizando luz na faixa entre 459 a 484 *nm*. Hattar e colaboradores (2003) obtiveram resultados mais expressivos ao utilizarem luz na faixa de 481 *nm*, para promover mudança de fase do ritmo circadiano da atividade locomotora em ratos com ausência dos cones e bastonetes. Dacey e colaboradores (2005), analisando as taxas de disparo das células ganglionares intrinsecamente fotossensíveis *Macaca nemestrina*, também obtiveram respostas mais evidentes com luz na faixa dos 482 *nm*. Enquanto em humanos, o pico de supressão de melatonina pela luz situa-se na faixa espectral dos 460 *nm* (Brainard *et al.* 2001; Thapan *et al.* 2001; Warman *et al.* 2003).

Contrapondo estas ideias, no presente estudo o ciclo de luz fluorescente parece ter sido o *zeitgeber* mais eficiente para os saguis, que exibiram a menor diferença de ângulo de fase para o início e fim da fase ativa em relação ao início e fim da fase de claro nessa condição. A análise da Figura 5 (página 44), que simula a captação fótica dos fotorreceptores

dos saguis no protocolo experimental utilizado, auxilia a compreensão dos resultados obtidos, possibilitando visualizar que a luz fluorescente atua de forma mais robusta em todos os fotorreceptores, desencadeando a participação das células ganglionares intrinsecamente fotossensíveis, e também dos cones e bastonetes no mecanismo de sincronização. Por outro lado, durante o uso da luz vermelha, a captação fóptica seria inferior, mas mesmo assim os animais exibiram a sincronização por arrastamento, indicando a participação dos cones longos nesse processo, um resultado até então inesperado. Ainda observando o modelo de captação fóptica sugerido pela Figura 5, em relação à luz azul, não se pode descartar a participação dos fotorreceptores convencionais, além das células ganglionares intrinsecamente fotossensíveis, pois a estimativa de captação fóptica aponta valores elevados para os cones S e os bastonetes, sugerindo que nesta condição de iluminação, a sincronização tenha resultado da ação conjunta dos três fotorreceptores. No entanto, a análise visual dos perfis circadianos de atividade permite verificar que durante a condição com luz azul, na intensidade de 10 lux, os saguis tornaram-se mais instáveis nos ângulos de início e final da fase ativa, e sugerimos que nesta intensidade, a luz azul tenha sido um zeitgeber menos eficaz, talvez devido a uma atenuação na ação da melanopsina, ocasionada pelo baixo nível de luz, o que concorreria para incluir os bastonetes como agentes das respostas observadas.

A colaboração dos cones e bastonetes no fotoarrastamento circadiano foi inicialmente observada em roedores, através dos trabalhos de Panda e colaboradores (2002) e Ruby e colaboradores (2002) com camundongos nocaute, que mesmo sem produzir melanopsina, apresentaram, ainda que atenuadas, respostas não visuais mediadas pela luz, como mudanças de fase após pulsos de luz e aumento no período do ritmo circadiano concomitante ao aumento da intensidade da luz. Assim, esses estudos comprovaram que os

fotorreceptores convencionais são suficientes para mediar o arrastamento fótico dos ritmos circadianos na ausência da melanopsina, e que, embora não seja essencial para absorver as informações fóticas que serão transmitidas ao sistema circadiano, esse fotopigmento contribui significativamente para a magnitude das respostas não visuais. Posteriormente, estudos adicionais (Hattar *et al.* 2003; Panda *et al.* 2003) mostraram que caso os três tipos de sistemas fotorreceptores (cones, bastonetes e células ganglionares intrinsicamente fotossensíveis) sejam retirados, tais respostas são perdidas.

Segundo Berson (2003), a contribuição dos cones e bastonetes ao sistema circadiano pode ser medida pelas sinapses existentes entre cones, bastonetes e células ganglionares intrinsicamente fotossensíveis. Alternativamente, cones e bastonetes também se comunicam com as células ganglionares que não expressam melanopsina, mas cujas fibras contribuem para compor o trato retino-hipotalâmico juntamente com as células intrinsicamente fotossensíveis (Gooley *et al.* 2001). Assim, conforme explicam Sollars e colaboradores (2003), as células ganglionares intrinsicamente fotossensíveis compõem a principal via de informações fóticas da retina ao sistema de temporização circadiano, mas sua ação pode ser modulada pelos sinais enviados dos cones e bastonetes através das demais células ganglionares, compondo uma rede de comunicação complexa, envolvendo respostas derivadas da melanopsina e modificadas pelos demais fotorreceptores.

A participação dos cones e bastonetes no fotoarrastamento circadiano também foi sugerida em mamíferos noturnos, conforme uma extensa revisão realizada por Erkert (2008), com vários ciclos e intensidades de iluminação ambiental em diferentes espécies de primatas não-humanos, diurnos e noturnos. Além disso, segundo um estudo anterior desse autor (Erkert 2004), geralmente há uma ação conjunta dos fotorreceptores visuais e não visuais na sincronização dos ritmos das espécies diurnas e noturnas, provavelmente para

fornecer ao sistema circadiano uma proteção redundante e adicional à ampla variação diária encontrada naturalmente na iluminação ambiental.

Mais recentemente, Perret e colaboradores (2010), também haviam sugerido a participação dos cones no fotoarrastamento de primatas não-humanos. Esses autores, investigando o mecanismo de sincronização em machos adultos de *Microcebus murinus*, com diferentes comprimentos de onda da luz (400 a 610 nm), verificaram que os comprimentos de onda médios são mais eficientes que os comprimentos de onda curtos e longos da luz em promover a sincronização, e propuseram a ação dos cones M/L no fotoarrastamento dos ritmos de temperatura e atividade desse primata noturno. Além disso, Perret e colaboradores observaram que *Microcebus murinus* respondem de modo distinto aos estímulos fóticos recebidos no início e final da fase ativa, e exibem respostas mais robustas no final da fase ativa, de modo semelhante ao encontrado em nosso estudo com saguis.

Neste estudo, verificamos que a luz fluorescente propiciou a sincronização mais eficaz, provavelmente ao estimular simultaneamente todos os sistemas fotorreceptores (cones longos e curtos, bastonetes e células ganglionares intrinsecamente fotossensíveis), enquanto a exposição ao azul e ao vermelho parecem ter promovido respostas menos robustas, pois os saguis sincronizaram, mas apresentaram uma pequena instabilidade em relação ao controle. Apesar das predições elaboradas não terem sido completamente satisfeitas, a primeira hipótese pode ser aceita, pois os parâmetros de sincronização do ritmo de atividade modificaram-se com o uso dos diferentes comprimentos de onda em relação ao controle, mas não do modo como havíamos predito.

Uma possível explicação para os resultados observados pode estar relacionada às intensidades de iluminação, talvez insuficientes para desencadear uma ação mais robusta

das células ganglionares intrinsecamente fotossensíveis. Segundo Do e Yau (2010) e Do e colaboradores (2009), estas células diferem dos bastonetes e cones na morfologia e no mecanismo de foto transdução, e requerem intensidades de luz mais elevadas que os fotorreceptores tradicionais. Paralelamente, os resultados de estudos desenvolvidos com roedores por Berson e colaboradores (2002), Panda e colaboradores (2002) e Ecker e colaboradores (2010) reforçam que as células ganglionares intrinsecamente fotossensíveis seriam menos sensíveis que os cones e bastonetes no mecanismo de fotorrecepção da luz. Assim, podemos sugerir que a maior antecipação para o início da fase ativa (em 10 lux) apresentada pelos animais durante o uso das luzes azuis e vermelhas estaria relacionada aos menores níveis de captação fóptica nestas condições. Como visto anteriormente, na análise da Figura 5, o aumento na intensidade da iluminação foi associado a um aumento nos níveis de captação da luz, e, conseqüentemente, a uma maior força de zeitgeber, gerando uma sincronização mais estável e um ritmo mais fortemente marcado. Essa ideia é reforçada pelos achados de Perret e colaboradores (2010). Esses autores, avaliando as interações entre comprimentos de onda e intensidade da luz sobre o ritmo de atividade e repouso em *Microcebus murinos*, evidenciaram que a sincronização dos animais aumentou concomitantemente com a intensidade da iluminação utilizada.

A segunda hipótese lançada foi que os parâmetros de sincronização do ritmo atividade motora dos animais (diferença de ângulo de fase do início e final da atividade e duração da fase ativa) modificam-se em função das diferentes intensidades da luz em cada comprimento de onda utilizado durante a fase de claro de um ciclo CE 12:12. Sobre esta hipótese, elaboramos três predições.

A primeira predição foi que as diferenças de ângulos de fases entre o início da fase ativa e o acender das luzes e entre o final da fase ativa e o apagar das luzes, e a duração

da fase ativa não apresentariam diferenças entre as intensidades de 200 e 100 lux, no mesmo comprimento de onda. Essa predição foi inteiramente contemplada, pois esses parâmetros não diferiram entre as intensidades de 200 e 100 lux dentro do mesmo comprimento de onda.

A segunda predição foi que as diferenças de ângulos de fases entre o início da fase ativa e o acender das luzes e entre o final da fase ativa e o apagar das luzes seriam mais instáveis em 10 lux, dentro do mesmo comprimento de onda. Essa predição foi comprovada em parte, pois ocorreu instabilidade para o ângulo de início da fase ativa em 10 lux dentro do mesmo comprimento de onda, como predito, mas no ângulo do final da fase ativa, houve, além da instabilidade em 10 lux, uma acentuada antecipação durante o uso das luzes azul e vermelha nas três intensidades utilizadas.

A terceira predição foi que haveria uma redução na duração da fase ativa em 10 lux, dentro do mesmo comprimento de onda. Essa predição foi inteiramente contemplada, pois a fase ativa dos animais foi menor em 10 lux, fato provavelmente ocasionado pela forte antecipação no final da fase ativa dos animais, decorrente de um efeito direto (mascaramento negativo) da baixa intensidade da luz.

Estudos anteriores já haviam evidenciado a influência direta da intensidade da luz sobre a expressão do ritmo de atividade em primatas não-humanos, através da ocorrência de mascaramento (positivo e negativo) promovido pelo aumento ou redução na intensidade da luz, de modo condizente aos resultados deste estudo (Albers et al. 1981; Erkert 2008; Lampert, Azevedo & Menezes 2011). Em nosso laboratório, um estudo realizado com saguis em cativeiro mantidos em ciclos CE (Gonçalves *et al.* 2009), na presença e ausência da caixa-ninho (acessório utilizado pelos animais para os episódios de sono), evidenciou efeitos distintos da luz sobre o ritmo de atividade locomotora, conforme a

incidência no início ou fim da fase ativa. Segundo os autores, na ausência da caixa ninho ocorreu um aumento significativo nos níveis de atividade dos saguis no final da fase ativa, em decorrência da maior exposição ao estímulo fótico neste horário, resultando em um mascaramento positivo induzido pela luz. No estudo atual, as gaiolas foram equipadas com caixa-ninho, e os saguis podiam se recolher quando desejado, evitando os estímulos fóticos no final da fase ativa, o que pode ter contribuído para a acentuada redução na duração da fase ativa observada durante o uso das luzes azul e vermelha em 10 lux.

A ocorrência de mascaramento pela ação da intensidade da luz também foi observada em macacos de cheiro, onde o ritmo de ingestão de água foi estudado durante a exposição dos animais a três ciclos CE 12:12 com diferentes intensidades de luz (60:0 lux; 66:6 lux e 76:16 lux). Albers e colaboradores (1981) perceberam que o aumento na intensidade de iluminação atrasou o ângulo do final do comportamento, sem afetar o ângulo de início ou sua frequência diária, e os autores concluíram que estavam envolvidos não apenas mecanismos de arrastamento ao ciclo claro-escuro, mas também de mascaramento da intensidade da luz da fase de claro sobre a expressão do ritmo.

Conforme Roenneberg & Merrow (2016), a sincronização está diretamente relacionada à força do zeitgeber utilizado, e o mecanismo da sincronização depende do acoplamento entre o zeitgeber e o oscilador circadiano. Desse modo, na sincronização ao ciclo claro-escuro, diferentes respostas podem ser observadas, dependendo das características da iluminação utilizada (intensidade, duração ou comprimento de onda da luz) e conforme a espécie considerada. Portanto, é esperado que o aumento na intensidade da luz exerça maior força sobre o sistema circadiano desse animal, semelhante ao observado em estudos anteriores com o prossímio noturno *Microcebus murinus* (Perret *et al.* 2010) e o sagui (Gonçalves, 2015).

Em nosso estudo, vimos que as diferenças de ângulos de fases entre o início da fase ativa e o acender das luzes e entre o final da fase ativa e o apagar das luzes, e a duração da fase ativa não diferiram entre as intensidades de 200 e 100 lux, mas observamos instabilidade nas diferenças de ângulos de fases para o início e fim da fase ativa e menor duração da fase ativa em 10 lux, fato provavelmente ocasionado pela baixa intensidade da luz.

Além disso, um efeito mascarador (negativo) da luz também foi observado sobre o total de atividade diária, que foi menor durante o uso das luzes azul e vermelha em relação ao controle, em 200 e 100 lux. Estudos realizados com macacos *Rhesus* (*Macaca mulata*), por exemplo, relatam níveis mais elevados de atividade motora concomitante ao aumento na intensidade de iluminação, caracterizando um mascaramento positivo da luz sobre o ritmo de atividade nesses primatas diurnos (Draper 1965; Isaac e DeVito 1958). Nossos resultados indicam a ocorrência de mascaramento negativo, diante da redução na intensidade da luz (200/100/10 lux, consecutivamente). Além disso, a Figura 5 permite observar que o aumento na intensidade da luz está associado a um aumento na captação fóptica, reforçando a ideia que intensidades mais elevadas desencadeiam as maiores respostas dos fotorreceptores dos saguis.

Em um experimento anterior com saguis adultos, realizado em nosso laboratório (Lampert, Azevedo & Menezes 2011), testamos o efeito de diferentes intensidades de luz fluorescente (10, 100, 200 e 500 lux) na fase de claro de um ciclo CE 12:12 sobre os ritmos de atividade motora e catação, e observamos a ocorrência de mascaramento paradoxal positivo, caracterizado pelo aumento na atividade motora dos animais em 10 lux. A diferença nas respostas promovidas pela redução na intensidade da luz entre este estudo e o anterior pode ser devido às diferenças metodológicas entre os dois estudos: no estudo

anterior (Lampert, Azevedo & Menezes 2011) os animais utilizados eram mais jovens (idade média de 2 anos  $\pm$  5 meses), e portanto, mais ativos, e foram mantidos em gaiolas sem caixa ninho, sem poder evitar a incidência da luz. No estudo atual, usamos machos mais velhos (idade média de 4 anos  $\pm$  7 meses) e as gaiolas possuíam caixa ninho, permitindo que os animais evitassem a exposição à luz quando desejável. Assim, não podemos descartar a hipótese que as diferenças entre os resultados dos dois estudos (mascaramento negativo e mascaramento paradoxal positivo em 10 lux), tenham sido promovidas, ao menos em parte, pelas diferenças entre os sujeitos e/ou entre os protocolos experimentais, pois segundo Gonçalves e colaboradores (2009), quando são mantidos em gaiolas sem caixa ninho, os saguis ficam mais expostos à ação direta da luz, exibindo um mascaramento positivo pelo aumento nos níveis de atividade em decorrência dessa maior exposição fótica, fato que poderia justificar as diferenças nos resultados entre os dois estudos.

Erkert (2008), em uma extensa revisão sobre estudos cronobiológicos realizados com primatas não-humanos, em laboratório e em campo, declarou que o efeito direto da alta ou baixa luminosidade ambiental (mascaramento) sobre o aumento (positivo) ou redução (negativo) dos ritmos circadianos de atividade parece ser muito mais pronunciado em primatas do que na maioria das outras espécies de mamíferos, e explica que este dado estaria relacionado ao fato de que os primatas em geral, são mais visualmente orientados que a maioria dos outros mamíferos. Os resultados encontrados em nosso estudo corroboram essa afirmação, pois verificamos que a diminuição na intensidade da luz provocou o mascaramento negativo do ritmo circadiano de atividade motora dos animais.

A terceira hipótese elaborada foi que a expressão da periodicidade circadiana do ritmo de atividade motora dos saguis iria variar entre os comprimentos de onda curto e longo da luz. A predição elaborada foi que haveria um aumento na potência espectral do

ritmo circadiano de atividade dos saguis em CC durante o uso da luz azul e redução da potência espectral durante o uso da luz vermelha em relação ao observado na condição controle. Tal predição não foi confirmada, pois apesar da potência espectral do ritmo ter aumentado durante o uso da luz azul na condição CC, ela não reduziu durante o uso da luz vermelha. Diferente do esperado, a potência foi maior em ambos os comprimentos de onda, que não diferiram entre si, apenas do controle. Na interação com a intensidade da luz, verificamos que a potência aumentou de forma associada ao aumento na intensidade. Por outro lado, o período do ritmo circadiano de atividade dos saguis não diferiu entre os comprimentos ou intensidades da luz durante as condições em CE e CC. Os resultados obtidos em nosso experimento são semelhantes aos achados de Erkert (1989), que, ao analisar o efeito de várias intensidades luminosas (0,1 a 500 lux) sobre o ritmo circadiano de saguis mantidos em CE e CC, não encontrou diferenças no período endógeno do ritmo dos animais durante o CC, mas constatou uma robusta sincronização por arrastamento fótico quando os animais estavam em ciclo CE.

Segundo Daan e colaboradores (2001), o ajuste de fases promovido pelo sistema de temporização circadiano decorre das atividades e interações dos neurônios do núcleo supraquiasmático, processo que é determinado pelo grau de acoplamento entre esses neurônios. Conforme explicam estes autores, a influência da luz sobre o sistema circadiano é evidente pelo forte impacto que a intensidade da luz provoca na manifestação rítmica, podendo modificar a força de acoplamento entre os neurônios do núcleo supraquiasmático. Adicionalmente, Cambras e Diez-Noguera (1991) argumentam que os osciladores podem apresentar diferentes graus de acoplamento, dependentes das condições de iluminação ambiental, e Golombek e colaboradores (2003), complementam que o perfeito funcionamento do sistema circadiano depende da integração das informações entre os

diferentes osciladores do sistema, e essa integração resulta do acoplamento ou capacidade de ajuste entre os diferentes períodos e fases dos osciladores que interagem.

Nossos resultados evidenciaram um aumento na potência do ritmo circadiano de atividade dos saguis durante o uso dos comprimentos de onda azul e vermelho na condição de claro constante, na intensidade de 200 lux, e sugerimos que esta intensidade de luz promoveu um acoplamento mais robusto entre os osciladores dos saguis.

Outro aspecto a ser abordado em relação aos resultados encontrados neste estudo, diz respeito às diferenças individuais observadas entre as respostas dos saguis aos protocolos experimentais utilizados. Como esperado em um estudo com esses primatas, que possuem um vasto repertório comportamental (Rylands *et al.* 1993), nossos resultados evidenciaram que os saguis não responderam igualmente às diferentes condições de iluminação, exibindo uma elevada variabilidade intraespecífica aos estímulos fóticos testados.

Tovée, Bowmaker e Mollon (1992), postularam que a origem das variações apresentadas na sensibilidade comportamental dos primatas reside nos tipos de ftopigmentos presentes em suas retinas. Assim, estenderemos nosso olhar para algumas especificidades do sistema visual dos saguis buscando compreender melhor os resultados obtidos.

Em primatas, as opsinas associadas à sensibilidade aos comprimentos de onda médios e longos são codificadas no cromossomo X. Segundo Jacobs (2008), o sagui, assim como várias outras espécies de macacos do Novo Mundo, apresenta um polimorfismo para os ftopigmentos dos cones sensíveis aos comprimentos de onda longos, e em um único *locus* gênico, podem ocorrer três variantes alélicas, codificando distintas opsinas, sensíveis a 543 (cones-M ou "verdes"), 556 ou 563 nm (cones-L ou "vermelhos"). Por outro lado, todos

os membros dessa espécie compartilham o mesmo tipo de opsina para os comprimentos de onda curtos (cones-S ou “azuis”). Como os machos possuem um único cromossomo X, são sempre dicromatas, possuindo um cone sensível aos comprimentos de onda curtos e um único tipo de opsina sensível aos maiores comprimentos de onda. O resultado é que saguis machos serão sempre dicromatas, ao passo que as fêmeas, por possuírem dois cromossomos X, podem ser dicromatas (se homozigotas) ou tricromatas (se heterozigotas), possuindo opsinas diferentes para os cones M e/ou L, além do cone S (Jacobs 2007; 2008; Mitchell & Leopold 2015). Com base nestes achados, sugerimos que as distintas respostas apresentadas pelos saguis durante o uso das luzes azul e vermelha podem estar relacionadas a uma provável variação fenotípica entre os machos com diferentes picos de sensibilidade espectral. Entretanto, devido às limitações metodológicas, a genotipagem dos animais não foi realizada. Portanto, sugerimos em estudos posteriores a realização da genotipagem dos animais de forma associada à avaliação rítmica, para que as sugestões aqui levantadas sejam verificadas.

Segundo Veilleux & Lewis (2011), a luz ambiental pode diferir substancialmente entre os habitats, e muitos aspectos da anatomia visual dos primatas refletem pressões seletivas impostas por ambientes com pouca ou muita luz. Sobre os calitriquídeos, Solomon e Rosa (2014) relatam que esses animais apresentam um sistema visual complexo, muito semelhante ao dos humanos e com alta densidade de cones na fóvea, num arranjo anatômico muito vantajoso em ambientes bem iluminados. Devido a limitações metodológicas, a intensidade máxima de luz utilizada em nosso estudo foi de 200 lux, um valor inferior ao encontrado em ambiente natural, e devemos considerar a possibilidade que a intensidade mais baixa (10 lux) tenha sido um fator limitante para o sistema visual dos saguis, interferindo nas respostas obtidas.

Outra possibilidade foi levantada por Caine, Osorio & Mundy (2010) ao considerar diferentes estratégias de forrageamento entre calitriquídeos dicromatas e tricromatas. Segundo esses autores, em intensidades menos elevadas de luz, saguis dicromatas forrageiam melhor, porque estas condições favorecem a ativação dos bastonetes. Esses achados foram corroborados por Freitag e Pessoa (2012), que explicaram que em condições mesópicas de iluminação, os bastonetes e cones dos saguis seriam ativados, proporcionando aos machos dicromatas um ganho adicional no mecanismo de fotorrecepção. Investigações complementares serão necessárias para esclarecer essas questões.

Estudos anteriores (Erkert 1989; Menezes *et al.* 1986) sugerem que as diferenças intraespecíficas exibidas no ritmo circadiano de atividade motora em saguis expressam a plasticidade do sistema temporizador circadiano, uma característica fundamental para a adaptação dos animais a ambientes naturais com frequentes modificações fotoperiódicas e sazonais. Adicionalmente, Gonçalves (2006) e Silva (2007) sugerem que as diferenças existentes na sensibilidade do sistema de temporização circadiana de cada animal também devem ser consideradas como possíveis causas para a gama de respostas obtidas dentro de um grupo de saguis expostos às mesmas condições experimentais. Assim, podemos sugerir que a variabilidade observada nas respostas dos animais em nosso estudo estaria relacionada às diferenças existentes entre os sistemas visuais dos mesmos, apresentando diferentes sensibilidades aos comprimentos de onda utilizados no experimento, e reforçamos a necessidade de, em estudos próximos, realizar a genotipagem dos animais utilizados.

Além dos comprimentos de onda e da intensidade de iluminação utilizada em cada comprimento de onda, percebemos, durante a análise dos dados, que o desenho

experimental também interferiu nos parâmetros do ritmo circadiano de atividade motora dos saguis, sinalizando a importância de observar-se a história fótica prévia, durante protocolos experimentais com essa espécie.

Segundo Chang e colaboradores (2011) a história fótica prévia modifica o ritmo de secreção da melatonina em humanos, promovendo maior amplitude na mudança de fase do pico de secreção e também a maior supressão aguda desse hormônio. Da mesma forma, Hérbert e colaboradores (2002), ao investigarem o impacto da história de exposição à luz sobre respostas de sensibilidade à luz, sugerem que a sensibilidade do sistema circadiano de luz pode ser afetada pelas condições fóticas precedentes.

Wong e colaboradores (2005) verificaram que as repostas das células ganglionares intrinsecamente fotossensíveis da retina de ratos também são influenciadas pela história fótica prévia, tornando-se insensíveis por um determinado intervalo de tempo após a exposição a um pulso de luz. Segundo os autores, essas células possuem plasticidade e exibem adaptações às modificações das condições de claro-escuro assim como os fotorreceptores convencionais.

Em nosso estudo, utilizamos dois desenhos metodológicos: o Experimento 1, com um protocolo mais longo (7 meses de duração), e o Experimento 2, que teve um protocolo mais curto (5 meses de duração), e vimos que os saguis responderam de modo distinto aos dois protocolos utilizados. Na avaliação da diferença de ângulo de fase para o início da atividade, os animais apresentaram maior diferença de ângulo para o início da atividade durante o Experimento 2, com as luzes azul e vermelha, notadamente com a luz vermelha, que desencadeou avanços de fase positivos superiores à uma hora antes do acender das luzes. Na diferença de ângulo de fase para o final da atividade, percebemos um avanço de fase positivo para o final da atividade dos animais, e que foi semelhante entre os

experimentos 1 e 2, e similar aos resultados já descritos para esse parâmetro na análise anterior. Provavelmente em decorrência dessa antecipação no final da fase ativa, os animais exibiram a menor duração do alfa durante o uso da luz vermelha no experimento 2. Curiosamente, nessa condição observamos também os maiores valores para o total de atividade diária, de modo oposto ao observado durante o experimento 1. Assim, nossos resultados revelaram diferentes respostas entre os efeitos dos comprimentos de onda durante os experimentos 1 e 2, evidenciando que o tempo de exposição dos animais à luz é um fator a ser considerado na construção de protocolos experimentais para essa espécie. Investigações complementares são necessárias para esclarecer os mecanismos envolvidos nas respostas encontradas.

Ao iniciarmos este experimento, consideramos estudar apenas os efeitos não visuais dos comprimentos de onda azul e vermelho sobre os parâmetros do RCA dessa espécie. No entanto, durante a execução do mesmo, percebemos que o efeito de um ambiente azul e vermelho sobre o comportamento dos saguis não poderia ser ignorado. Suspeitamos que as condições de iluminação utilizadas possam ter provocado um desconforto visual nos saguis, pois a sala na qual os animais foram mantidos ficava completamente azulada e avermelhada nestas etapas, e percebemos, a partir de observações ocasionais realizadas nas entradas para a colocação e retirada da alimentação, que os animais diminuíram a ingesta alimentar nas duas condições experimentais, pois a quantidade de alimento que permanecia nos vasilhames era maior do que a quantidade deixada na etapa com luz fluorescente (controle). Uma possível explicação para esta redução na alimentação é que tenha ocorrido devido a uma alteração na coloração dos alimentos, que ficaram azulados, acinzentados ou avermelhados, a partir de nossa percepção visual.

Desse modo, sugere-se que a coloração dos alimentos interferiu no padrão alimentar dos animais.

Comportamento semelhante foi verificado previamente em um estudo anterior com essa espécie em laboratório (Lacerda 2004), que investigou os fatores que influenciavam a escolha de alimentos em saguis machos e fêmeas. Neste estudo, os animais receberam porções de gelatina de variadas cores (branca, amarela, azul, verde e vermelha), adoçadas artificialmente, e percebeu-se que as gelatinas de cor vermelha foram as menos exploradas pelos animais, e também as menos lambidas. Apesar disso, o autor não considerou esse dado conclusivo para reportar a neofobia alimentar. Ahlborn e Roth (1999), que também estudaram os hábitos alimentares dessa espécie, explicam que a saúde e a sobrevivência dos animais são relacionadas à ingestão de alimentos saudáveis, e os saguis realizam escolhas adequadas e criteriosas sobre os alimentos que ingerem. Segundo eles, usando as habilidades sensoriais para a tomada de decisões, essa espécie aceita ou rejeita alimentos oferecidos conforme a coloração, odor e sabor. No entanto, o presente estudo não teve por objetivo avaliar a ingestão alimentar dos saguis cativos, e esses dados não foram analisados. As informações aqui fornecidas baseiam-se exclusivamente em impressões visuais dos autores e tratadores durante o curso desse experimento, e sugerimos que estudos futuros contemplem este aspecto.

Durante a realização desse estudo ocorreram alguns imprevistos que possivelmente interferiram nos resultados encontrados. Podemos citar como limitações, as interrupções no fornecimento de energia ocorridas durante as etapas experimentais. Além disso, apesar das precauções tomadas, não pudemos contar com o isolamento acústico ideal no laboratório, e as perturbações visualizadas nos actogramas dos animais durante a condição em CC podem estar relacionadas a uma possível influência das pistas sociais dos

saguis mantidos na parte externa da colônia. Tal efeito foi relatado em estudos realizados em nosso laboratório (Gonçalves 2006; Silva *et al.* 2014; Gonçalves *et al.* 2009), em que foi verificada a ocorrência de sincronização social e coordenação relativa do ritmo circadiano de atividade dos saguis mantidos em condições constantes pelas vocalizações de seus coespecíficos da colônia.

De forma geral, observamos que os parâmetros do ritmo circadiano de atividade motora dos saguis modificaram-se em função dos comprimentos de onda utilizados durante a fase de claro, apresentando maior antecipação para o ângulo do final da fase ativa; menor duração da fase ativa, menor total de atividade diária e maior potência durante o uso dos comprimentos de onda curtos e longos da luz.

A redução na intensidade da luz também afetou a sincronização do ritmo de atividade motora dos saguis durante o uso das luzes azul e vermelha, provavelmente devido ao mascaramento do ritmo pelas condições de iluminação utilizadas, resultando em maior antecipação para os ângulos de início e fim da fase ativa, menor duração da fase ativa e menor total de atividade diária. Observamos ainda que a potência do ritmo foi menor em 10 lux durante o controle, o azul e o vermelho, sugerindo um menor efeito acoplador da luz em baixas intensidades. Além disso, as respostas obtidas durante o uso do comprimento de ondas longo sugerem a participação dos cones L nos mecanismos de sincronização fótica nesta espécie.

Tomados em conjunto, estes resultados trazem novas informações sobre os efeitos dos comprimentos de onda curto e longo da luz sobre o ritmo de atividade motora em saguis, fornecendo novos subsídios para a compreensão da ação da luz sobre a expressão da ritmicidade circadiana nos primatas diurnos.

## 7. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo evidenciaram, pela primeira vez, o efeito dos comprimentos de onda curtos e longos da luz sobre a expressão endógena e a sincronização fótica do ritmo circadiano de atividade motora de um primata diurno (*Callithrix jacchus*). A partir dos resultados apresentados, sugere-se que:

- ✓ Os comprimentos de onda azul e vermelho da luz modificam a expressão endógena e a sincronização fótica do RCA em saguis;
- ✓ Os animais respondem de modo distinto à luz de comprimentos de onda azul e vermelho no início e final da fase ativa;
- ✓ Os comprimentos de onda azul e vermelho da luz geram maior antecipação no final da fase ativa, reduzindo a duração do alfa e o total de atividade diária, provavelmente por um efeito de mascaramento do ritmo circadiano de atividade;
- ✓ Os efeitos dos comprimentos de onda da luz variam em função da intensidade da luz; sem diferenças entre as intensidades de 200 e 100 lux e com maior instabilidade em 10 lux;
- ✓ A potência do período do RCA aumentou de forma associada ao comprimento de onda e ao aumento na intensidade da luz;
- ✓ A duração da exposição dos animais aos comprimentos de onda azul e vermelho da luz é um fator a ser considerado na construção de protocolos experimentais com essa espécie.

## REFERÊNCIAS

- ABBOTT DH, BARNETT DK, COLMAN RJ, YAMAMOTO ME, SCHULTZ-DARKEN NJ. Aspects of common marmoset basic biology and life history important for biomedical research. *Comparative Medicine*, 53: 339-50, 2003.
- AGGELOPOULOS NC & MEISSL H. Responses of neurones of the rat suprachiasmatic nucleus to retinal illumination under photopic and scotopic conditions. *J. Physiol.* 523: 211-22, 2000.
- AHLBORN S & ROTHE H. Food selection of semifree common marmosets (*Callithrix jacchus*): indications for optimal foraging. *Primates* 40 (3): 479-86, 1999.
- ALBERS HE, LYDIC R & MOORE-EDE MC. Entrainment and masking of circadian drinking rhythms in primates: influence of light intensity. *Physiology & Behavior*, 28: 205-211, 1982.
- ALTIMUS C, GÜLLER AD, ALAM NM, ARMAN AC, PRUSKY G, SAMPATH AP & HATTAR S. Rod photoreceptors drive circadian photoentrainment across a wide range of light intensities. *Nature Neuroscience*, 13: 1107-13, 2010.
- ASCHOFF J. Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 25: 11-28, 1960.
- ASCHOFF J. Masking and parametric effects of high-frequency light-dark cycles. *Japanese Journal of Physiology*, 49: 11-18, 1999.
- BAILES HJ & LUCAS RJ. Melanopsin and inner retinal photoreception. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67: 99-111, 2010.
- BARBOSA MN, MOTA MTS. A influência da rotina de manejo na interação social entre pares heterossexuais do sagui, *Callithrix jacchus* (Linnaeus, 1758). *Revista Brasileira de Zociências*, 6: 29-43, 2004.
- BARBOSA MN, MOTA MTS. Behavioral and hormonal response of common marmosets, *Callithrix jacchus*, to two environmental conditions. *Primates*, 50: 253-60, 2009.
- BELENKY MA, SMERASKI CA, PROVENCIO I, SOLLARS PJ & PICKARD GE. Melanopsin retinal ganglion cells receive bipolar and amacrine synapses. *J. Comp. Neur.*, 460: 380-93, 2003.
- BERSON DM, DUNN FA & TAKAO M. Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science*, 295: 1070-3, 2002.
- BRAINARD GC, HAFININ JP, GREESON JM, BYRNE B, GLICKMAN G, GERNER E, et al. Action spectrum for melatonin regulation in humans: evidence for a novel circadian photoreceptor. *Journal of Neuroscience*, 21: 6405-12, 2001.

- BRAINARD GC, HAFININ JP, ROLLAG MD et al. Human melatonin regulation is not mediated by the three cone photopic visual system. *Journal of Clin. Endocrinol. & Metabol.*, 86: 433-6, 2001.
- BRAINARD GC, SLINEY D, HANIFIN JP, GLICKMAN G, BYRNE B, GREESON JM, JASSER S, GERNER & ROLLAG MD. Sensitivity of the human circadian system to short-wavelength (420-nm) light. *Journal of Biological Rhythms*, 23: 379-386, 2008.
- BRANDSTAETTER R. Circadian lessons from peripheral clocks: is the time of the mammalian pacemaker up? *The National Academy of Sciences of the USA*, 101, 2004.
- BROOM DM. Animal welfare: concepts and measurement. *J. Anim. Sci.*, 69: 4167-75, 1991.
- BURGESS HJ, SHARKEY KM, EASTMAN CL. Bright light, dark and melatonin can promote circadian adaptation in night shift workers. *Sleep Medicine Review*, 6: 407-20, 2002.
- CAINE NG, OSORIO D & MUNDY NI. A foraging advantage for dichromatic marmosets (*Callithrix geoffroyi*) at low light intensity. *Biol. Lett.* 6: 36-38, 2010.
- CAJOCHEN C. Alerting effects of light. *Sleep Medicine Reviews*, 11: 453-64, 2007.
- CAJOCHEN C, ZEITZER JM, CZEISLER CA, DIJK DJ. Dose-response relationship for light intensity and ocular and electroencephalographic correlates of human alertness. *Behavior Brain Research*, 115: 75-83, 2000.
- CAJOCHEN C, MÜNCH M, KOBIALKA S, KRÄUCHI K, STEINER R, OELHAFEN P, ORGÜL S & WIRZ-JUSTICE A. High sensitivity of human melatonin, alertness, thermoregulation, and heart rate to short wavelength light. *J. Clin. Endocrinol. Metabol*, 90: 1311-16, 2005.
- CAMBRAS T & DÍEZ NOGUERA A. Evolution of rat motor activity circadian rhythm under three different light patterns. *Physiology and Behaviour*, 49:63-68, 1991.
- CAVALCANTE JS, NASCIMENTO JÚNIOR ES & COSTA MSMO. Componentes centrais do sistema de temporização circadiana: o núcleo supraquiasmático e o folheto intergeniculado. *Neurociências*, 3: 273-282, 2006.
- CASTRO CSS, MENEZES AL & MOREIRA LFS. Locomotor activity rhythm in free-ranging common marmosets (*Callithrix jacchus*). *Biological Rhythm Research*, 34: 23-30, 2003.
- CHALLET E & PÉVET P. Interactions between photic and nonphotic stimuli to synchronize the master circadian clock in mammals. *Frontiers in Bioscience* 8: 246-57, 2003.
- CHANG AM, SCHEER FAJL & CZEISLER CA. The human circadian system adapts to prior photic history. *J. Physiol.* 589.5: 1095–1102, 2011.

- CROWLEY SJ *et al.* Sleep, circadian rhythms, and delayed phase in adolescence. *Sleep Medicine*, 8: 602-12, 2007.
- CUNHA MS, FERNANDES LC, VIVACQUA C, SOUSA MBC. Annual variation in plasma cortisol levels in common marmosets. *Biological Rhythm Research 00*: 1-9, 2006.
- DAAN S & ASCHOFF J. The entrainment of circadian systems. *In: Takahashi, Turek & Moore (Eds) Handbook of Behav. Neurobiology*. NY, Academic Plenum Publishers. pp. 7-43, 2001.
- DAAN S. Tonic and phasic effects of light in the entrainment of circadian rhythms. *Ann New York Academic Science*, 290: 51–9, 1977.
- DACEY DM *et al.* Melanopsin expressing ganglion cells in primate retina signal color and irradiance and project to the LGN. *Nature*, 433: 749–54, 2005.
- DARTNALL HJA, BOWMAKER JK & MOLLON JD. Human visual pigments: micro spectrophotometric results from the eyes of seven persons. *Proceedings of the Royal Society*: London. pp. 115–30, 1983.
- DAURAT A, AGUIRRE A, FORET J, GONNET P, KEROMES A, BENNOIT O. Bright light affects alertness and performance rhythms during a 24-h constant routine. *Physiol. and Behavior*, 53: 929-36, 1993.
- DOLLET A, ALBRECHT U, COOPER H & DKHISSI-BENYAHYA O. Cones are required for normal temporal responses to light of phase shifts and clock gene expression. *Chronobiology International*, 27: 768–81, 2010.
- DOWLING JE & BOYCOTT BB. Organization of the primate retina: electron microscopy. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* Nov 15, 166 (1002): 80-111, 1966.
- DUFFY JF & WRIGHT KP JR. Entrainment of the human circadian system by light. *J. Biol. Rhythms*, 20: 326-338, 2005. DOI: 10.1177/0748730405277983
- ECKER JL *et al.* Melanopsin-expressing retinal ganglion-cell photoreceptors: cellular diversity and role in pattern vision. *Neuron.*, 67, 49–60, 2010.
- ERKERT HG. Characteristics of the circadian activity rhythm in common marmosets (*Callithrix j. jacchus*). *American Journal of Primatology*, 17: 271-86, 1989.
- ERKERT HG, GBUREK V & SCHEIDELER A. Photic entrainment and masking of prosimian circadian rhythms (*Otolemur garnettii*, Primates). *Physiology & Behavior*, 88: 39–46, 2006.
- FITZGIBBON T, ERIKÖZ B, GRÜNERT U & MARTIN PR. Analysis of the lateral geniculate nucleus in dichromatic and trichromatic marmosets. *The Journal of Comparative Neurology* 523: 1948-66, 2015.

- FOSTER RG & HELFRICH-FORSTER C. The regulation of circadian clocks by light in fruit flies and mice. *Philos. Trans. R. Soc. Lon. B.* 356: 1779-89, 2001.
- FREITAG FB & PESSOA DMA. Effect of luminosity on color discrimination of dichromatic marmosets (*Callithrix jacchus*). *J. Opt. Soc. Am. A.* 29, A216-A222, 2012.
- GALVÃO-COELHO NL, SILVA HPA, LEÃO AC & SOUSA MBC. Common marmosets (*Callithrix jacchus*) as a potential animal model for studying psychological disorders associated with high and low responsiveness of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Reviews in the Neurosciences*, 19: 187-201, 2008.
- GHOSH KK, GOODCHILD AK, SEFTON AE & MARTIN PR. Morphology of Retinal Ganglion Cells in a New World Monkey, the Marmoset *Callithrix jacchus*. *The Journal of Comparative Neurology* 366: 76-92, 1996.
- GHOSH KK, MARTIN PR & GRÜNERT U. Morphological Analysis of the Blue Cone Pathway in the Retina of a New World Monkey, the Marmoset *Callithrix jacchus*. *The Journal of Comparative Neurology* 379: 211-25, 1997.
- GOLOMBECK DA, CARDINALI D & AGUILAR-ROBLERO R. Mecanismos de temporização em vertebrados. In MARQUES N & MENNA-BARRETO L (Orgs.), *Cronobiologia: Princípios e Aplicações* 3 ed. São Paulo: Ed. Universidade de São Paulo, pp. 137-161, 2003.
- GOLOMBEK DA & ROSENSTEIN RE. Physiology of circadian entrainment. *Physiol. Rev.* 90: 1063-1102, 2010.
- GOMEZ D, BARBOSA A, THÉRY M, AUJARD F & PERRET M. Age affects photoentrainment in a nocturnal primate. *J. Biol. Rhythms*, 27: 164-71, 2012.
- GONÇALVES FB. *Influência da auto-seleção à luz no ritmo circadiano de atividade motora em Callithrix jacchus*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2006.
- GONÇALVES FB, BELÍSIO AS & AZEVEDO CVM. Effect of nest box availability on the activity rhythm of common marmosets (*Callithrix jacchus*). *Folia Primatol.* 80: 175-88, 2009.
- GONÇALVES FB. Caracterização do ritmo circadiano de atividade e repouso em saguis idosos (*Callithrix jacchus*). Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2015.
- GOOLEY JJ. Treatment of Circadian Rhythm Sleep Disorders with Light. *Ann. Acad. Med. Singapore*, 37: 669-76, 2008.
- GOOLEY JJ et al. Spectral responses of the human circadian system depend on the irradiance and duration of exposure to light. *Sci. Transl. Med.*, 2: 1-9, 2010.

- GÜLER AD et al. Melanopsin cells are the principal conduits for rod/cone input to non-image forming vision. *Nature*, 453: 102–5, 2008.
- HATORI M & PANDA S. The emerging roles of melanopsin in behavioral adaptation to light. *Trends Mol Med.*, 10: 435-46, 2010. doi:10.1016/j.molmed.2010.07.005.
- HATTAR S, LUCAS RJ, MROSOVSKY N, THOMPSON S, DOUGLAS RH, HANKINS MW et al. Melanopsin and rod-cone photoreceptive systems account for all major accessory visual functions in mice. *Nature*, 424: 75–81, 2003.
- HATTAR S, KUMAR M, PARK A, TONG P, TUNG J et al. Central projections of melanopsin-expressing retinal ganglion cells in the mouse. *J. Comp. Neurol.* 497: 326-49, 2006.
- HÉBERT M, DUMONT M, & PAQUET J. Seasonal and diurnal patterns of human illumination under natural conditions. *Chronobiol. Int.*, 15: 59-70, 1998.
- HÉBERT M, MARTIN SK, LEE C & EASTMAN CI. The effects of prior light history on the suppression of melatonin by light in humans. *J. Pineal Res.*, 33: 198–203, 2002.
- HOANG MT & YAU K-W. Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *Physiol. Rev.* 90: 1547-81, 2010.
- HOLICK MF. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *American Journal of Clinical Nutrition*, 80 (6), 2004.
- HOLICK MF. Vitamin D: a lightful health perspective. *Nutr. Rev.* 66, Suppl. 2: 182–94, 2008.
- JACOBS GH. A perspective on color vision in monkeys. *Vision Res.*, 38: 3307-13, 1998.
- JACOBS GH. New World monkeys and color. *Int. J. Primatol.*, 28: 729-759. 2007.
- JACOBS GH. Primate color vision: a comparative perspective. *Vis. Neurosci.*, 25: 619–33. 2008.
- KAIDA K. et al. Indoor exposure to natural bright light prevents afternoon sleepiness. *Sleep* 29: 462-9, 2006.
- KNEZ I, KERS C. Effects of indoor lighting, gender, and age on mood and cognitive performance. *Environment and Behavior* 32: 817-31, 2000.
- KURTENBACH A, SABINE MEIERKORD S & KREMERS J. Spectral sensitivities in dichromats and trichromats at mesopic retinal illuminances. *J. Opt. Soc. Am. A.* 16, (7):1541-48, 1999.
- LACERDA DF. Fatores que influenciam a escolha alimentar em saguis comuns (*Callithrix jacchus*) cativos. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2004.

- LAMPERT RMS, AZEVEDO CVM, MENEZES AAL. Influence of different light intensities on the daily grooming distribution of common marmosets (*Callithrix jacchus*). *Folia Primatol.*, 82: 131–142, 2011.
- LeGATES TA, FERNANDEZ DC, HATTAR S. Light as a central modulator of circadian rhythms, sleep and affect. *Nature Rev. Neurosci.* 1-12, 2014. doi:10.1038/nrn3743.
- LI YC. Molecular mechanism of vitamin D in the cardiovascular system. *Journal of Investigative Medicine*, 2011.
- LOCKLEY SW, BRAINARD GC, CZEISLER CA. High sensitivity of the human circadian melatonin rhythm to resetting by short wavelength light. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 88: 4502-05, 2003.
- LOCKLEY SW & GOOLEY JJ. Circadian photoreception: spotlight on the brain. *Curr. Biol.*, 16: 795-7, 2006.
- LOCKLEY SW, EVANS EE, SCHEER FAJL, BRAINARD GC, CZEISLER CA & AESCHBACH D. Short-wavelength sensitivity for the direct effects of light on alertness, vigilance and the waking EEG in humans. *Sleep*, 29: 161-8, 2006.
- LUCAS RJ, LALL GS, ALLEN AE & BROWN TM. How rod, cone and melanopsina photoreceptors come together to enlighten the mammalian circadian clock. In Andries Kalsbeek, Martha Merrow, Till Roenneberg and Russell G. Foster (Editors). Amsterdam: The Netherlands. *Progress in Brain Research*, 199: 1-18, 2012.
- MARQUES MD, GOLOMBECK D & MORENO C. Adaptação temporal. In MARQUES N & MENNA-BARRETO L (Orgs.), *Cronobiologia: Princípios e Aplicações* 3 ed. São Paulo: Ed. Universidade de São Paulo, pp. 55-98, 2003.
- MELO PR, GONÇALVES BSB, MENEZES AAL & AZEVEDO CVM. Circadian activity rhythm in pre-pubertal and pubertal marmosets (*Callithrix jacchus*) living in family groups. *Physiology & Behavior* 155: 242–249, 2016.
- MENEZES AAL, MOREIRA LFS, AZEVEDO CVM, COSTA SF, CASTRO CSS. Behavioral rhythms in the captive common marmoset (*Callithrix jacchus*) under natural environmental conditions. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 26: 741-45, 1993.
- MENEZES AAL, MOREIRA LFS, QUEIROZ JW, MENNA-BARRETO LS, BENEDITO-SILVA AA. Diurnal variation and distribution of grooming behavior in captive common marmoset families (*Callithrix jacchus*). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 27: 61-65, 1994.
- MITCHELL JF & LEOPOLD DA. The marmoset monkey as a model for visual neuroscience. *Neuroscience Research*, 93: 20–46, 2015.

- MOLLON JD & BOWMAKER JK. The spatial arrangement of cones in the primate fovea. *Nature*, 360: 677–9, 1992.
- MOORE RY. Circadian timing. In: Zigmond MJ, Bloom FE, Landis SC, Roberts JL & Squire LR (Eds.). *Fundamental Neuroscience*: 1189-1206, San Diego, Academic Press, 1999.
- MOORE-EDE MC, SULZMAN FM & FULLER CA. Characteristics of circadian clocks. In: *The clocks that time us. Physiology of the circadian timing system*. pp. 30-112. Harvard University Press, 1982.
- MOORE RY. Circadian timing. In: Zigmond MJ, Bloom FE, Landis SC, Roberts JL & Squire LR (Eds.). *Fundamental Neuroscience*: 1189-1206, San Diego, Academic Press, 1999.
- MOREIRA LFS, SOUSA MBC, MENEZES AAL, AZEVEDO CV, MOTA MT, COSTA FS, CASTRO CSS. Ritmo circadiano da atividade motora do sagui comum (*Callithrix jacchus*). *A Primatologia no Brasil* 3: 25-33, 1991.
- MORGAN KN, TROMBORG CT. Sources of stress in captivity. *Applied Animal Behaviour Science*, 102: 262-302, 2007.
- MOTA MTS, FRANCI CR, SOUSA MBC. Hormonal changes related to alloparental care in common marmosets (*Callithrix jacchus*). *Hormones and Behavior*, 49: 293-302, 2006.
- MROSOVSKY M. Masking: history, definitions and measurement. *Chronobiology International*, 16: 415-29, 1999.
- MROSOVSKY N., FOSTER RG & SALMON PA. Thresholds for masking responses to light in three strains of retinally degenerate mice. *J. Comp. Physiol. A*. 184: 423–8, 1999.
- MROSOVSKY N & HATTAR S. Impaired masking responses to light in melanopsin knockout mice. *Chronobiology International*, 20: 989–99, 2003.
- MUNRO C, STANBENFELDT G. Development of a microtitre plate enzyme immunoassay for the determination of progesterone. *J. Endocrinol.*, 101: 41-9, 1984.
- NELSON W, TONG YL, LEE JK & HALBERG F. Methods for cosinor rhythmometry. *Chronobiologia*, 6: 149-61, 1979.
- NOGUEIRA SL, SOUSA MBC, NETO CFM, COSTA, MPO. Diurnal variation in scent marking behavior in captive male and female common marmoset, *Callithrix jacchus*, *Biological Rhythms Research*, 32: 169-177, 2001.
- PANDA S, SATO TK, CASTRUCCI AM, ROLLAG MD, DEGRIP WJ, HOGENSCH JB, PROVENCIO I, & KAY SA. Melanopsin (Opn4) requirement for normal light-induced circadian phase-shifting. *Science* 298: 2213-16, 2002.

- PANDA S *et al.* Melanopsin is required for non-image-forming photic responses in blind mice. *Science*, 301: 525–27, 2003.
- PAUL KN, SAAFIR TB & TOSINI G. The role of retinal photoreceptors in the regulation of circadian rhythms. *Rev. Endocr. Metab. Disord.*, 10: 271–8, 2009.
- PERRET M, GOMEZ D, BARBOSA A, AUJARD F & THÉRY M. Increased late night response to light controls the circadian pacemaker in a nocturnal primate. *J. Biol. Rhythms*, 25: 186–96, 2010.
- PITTENDRIGH CS & DAAN S. A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. *Comp. Physiol.*, 106 (3): 291–331, 1976.
- PROVENCIO I, RODRIGUEZ IR, JIANG G, HAYES WP, MOREIRA EF & ROLLAG MD. A novel human opsin in the inner retina. *J. of Neurosci.*, 20: 600-5, 2000.
- PROVIS JM, DUBIS AM, MADDESS T & CARROLL J. Adaptation of the central retina for high acuity vision: cones, the fovea and the avascular zone. *Prog. Retin. Eye Res.*, 35: 63–81, 2013.
- REA MS, editor. IESNA lighting handbook: reference and application. New York: *Illuminating Engineering Society of North America*, 2000.
- REDLIN U. & MROSOVSKY N. Masking of locomotor activity in hamsters. *J. Comp. Physiol. A*. 184: 429–37, 1999.
- REVELL VL, ARENDT J, FOGG LF & SKENE DJ. Alerting effects of light are sensitive to very short wavelengths. *Neuroscience Letters*, 399: 96-100, 2006.
- ROENNEBERG T. & MERROW, M. Discovering the clock-eye in mammals. *Current Biology*, 12: 163-5, 2002.
- ROENNEBERG, DAAN & MERROW. The art of entrainment. *J. Biol. Rhythms*, 18: 183–94, 2003.
- ROENNEBERG, DAAN & MERROW. The circadian clock and human health. *Current Biology*, 26: 432-43, 2016.
- RUBY NF, BRENNAN TJ, XIE X *et al.* Role of melanopsin in circadian responses to light. *Science*: 298: 2211-13, 2002.
- RUKSTALIS M, FRENCH JA. Vocal buffering of the stress response: exposure to conspecific vocalizations moderates urinary cortisol excretion in isolated marmosets. *Hormones and Behavior*, 47: 1-7, 2005.
- SASAKI E, SUEMIZU H, SHIMADA A, HANAZAWA K *et al.* Generation of transgenic non-human primates with germline transmission. *Nature* 459: 523-28, 2009.

- SCHMIDT TM & KOFUJI P. Functional and morphological differences among intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *J. Neurosci.* 29: 476-82, 2009.
- SCHMIDT TM *et al.* Melanopsin-Positive Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cells: From Form to Function. *J. Neurosci.* 31: 16094 –16101, 2011.
- SCHMIDT TM, CHEN SK & HATTAR S. Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells: many subtypes, diverse functions. *Trends Neurosci.* 34: 572–80, 2011.
- SILVA CA, CARRIJO C, SANTANA K & ARAUJO, JF. *Functional organization of circadian time system of a diurnal primate (marmoset)*. R. Aguilar-Roblero *et al.* (eds.). Mechanisms of circadian systems in animals and their clinical relevance. Springer International Publishing Switzerland, 2015.
- SILVA CA. *Efeitos de vocalizações de co-específicos e do escuro sobre o ritmo circadiano de atividade motora em saguis (Callithrix jacchus)*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2007.
- SILVA CA. *Saguis (Callithrix jacchus) sob ciclo claro-escuro de 21h: um modelo de dessincronização forçada em primata diurno*. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2012.
- SILVA CA, PONTES ALB, CAVALCANTE JDS, AZEVEDO CVM. Conspecific vocalisations modulate the circadian activity rhythm of marmosets. *Biological Rhythm Research*, 45(6): 941-954, 2014.
- SILVA MMA, ALBUQUERQUE AM & ARAÚJO JF. Light-dark cycle synchronization of circadian rhythm in blind primates. *Journal of Circadian Rhythms*, 3: 10, 2005.
- SILVEIRA LCL *et al.* Ganglion cells of a short-wavelength-sensitive cone pathway in New World monkeys: morphology and physiology. *Visual Neuroscience*, 16: 333–43, 1999.
- SIMONNEAUX V & RIBELAYGA C. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol. Rev.*, 55: 325-95, 2003.
- SKENE DJ & ARENDT J. Human circadian rhythms: physiological and therapeutic relevance of light and melatonin. *Ann. Clin. Biochem.*, 43, 2006.
- SOKOLOVE PG, BUSHELL WN. The chisquare periodogram: it's utility for analysis of circadian rhythms. *Journal of Theoretical Biology*, 72: 131-70, 1978.
- SOLOMON SG & ROSA MGP. A simpler primate brain: the visual system of the marmoset monkey. *Frontiers in Neural Circuits*, 8: 1-24, 2014.

- SOLLARS PJ, SMERASKI CA, KAUFMAN JD et al. Melanopsin and non-melanopsin expressing retinal ganglion cells innervate the hypothalamic suprachiasmatic nucleus. *Visual Neuroscience*, 20:601-10, 2003.
- SOUSA MBC & ZIEGLER TE. Diurnal variation on the excretion patterns of fecal steroids in common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Amer. J. of Primatol.*, 46: 105-17, 1998.
- SOUSA MBC, GALVÃO-COELHO NL, RIBEIRO RRC & GOMES SL. Effect of relatedness on the behavioral and endocrine components of stress response in common marmosets (*Callithrix jacchus*) males. *Front. Neuroendocrinol.*, 27: 56-63, 2006.
- SOUSA MBC & PONTES MC. Variação temporal diurna de comportamentos afiliativos de sagui comum (*Callithrix jacchus*) vivendo em ambiente natural. *Rev. Bras. Zootecnia* 10: 07-12, abr. 2008.
- SPOELSTRA K, van GRUNSVEN RHA, DONNERS M et al. Experimental illumination of natural habitat- an experimental set-up to access the direct and indirect ecological consequences of artificial light of different spectral composition. *Phil.Trans. R. Soc. B* 370:20140129, 2016.
- TERMAN M. Evolving applications of light therapy. *Sleep Medicine Rev.*, 11: 497–507, 2007.
- THAPAN K, ARENDT J & SKENE DJ. An action spectrum for melatonin suppression: evidence for a novel non-rod, non-cone photoreceptor system in humans. *J. Physiol.* 535: 261-67, 2001.
- TOVÉE MJ. An Introduction to the Visual System. Second edition. In: \_\_. cap. 2, The eye and forming the image. p. 18-43, Cambridge University Press: New York, 2008.
- TOVÉE MJ, BOWMAKER JK & MOLLON JD. The relationship between cone pigments and behavioral sensitivity in a New World Monkey (*Callithrix jacchus jacchus*). *Vision Res.* 32 (5): 867-78, 1992.
- VEILLEUX CC & LEWIS RJ. Effects of habitat light intensity on mammalian eye shape. *The anatomical record* 294: 905–914, 2011.
- ZIEGLER TE, SCHEFFLER G, WITTEWERT DJ, SCHULTZ-DARKEN NJ, SNOWDON CT, ABBOTT DH. Metabolism of reproductive steroids during the ovarian cycle in two species of callithrichids, *Saguinus oedipus* and *Callithrix jacchus*, and estimation of the ovulatory period from fecal steroids. *Biology Reproductive*, 54: 91-9, 1996.
- ZIEGLER TE, SCHULTZ-DARKEN NJ, SCOTT JJ, SNOWDON CT, FERRIS CF. Neuroendocrine response to female ovulatory odors depends upon social condition in male common marmosets, *Callithrix jacchus*. *Hormones and Behavior*, 47: 56-64, 2005.
- WARMAN VL, DIJK D-J, WARMAN GR, ARENDT J, SKENE DJ. Phase advancing human circadian rhythms with short wavelength light. *Neuroscience Letters*, 342: 37-40, 2003.

- WEBB AR. Considerations for lighting in the built environment: non-visual effects of light. *Energy and Buildings*: 38, 721–27, 2006.
- WECHSELBERGER E & ERKERT HG. Characteristics of the light-induced phase response of circadian activity rhythms in common marmosets, *Callithrix j. jacchus* [Primates-Cebidae]. *Chronobiology International*, 11: 275-284, 1994.
- WEINERT D. The temporal order of mammals. Evidence for multiple central and peripheral control mechanisms and for endogenous and exogenous components: some implications for research on aging. *Biological Rhythm Research* 36: 4, 293-308, 2005.
- WEST KE *et al.* Blue light from light-emitting diodes elicits a dose-dependent suppression of melatonin in humans. *J. Appl. Physiol.* 110: 619-26, 2010.
- WONG KY, DUNN FA & BERSON DM. Photoreceptor adaptation in intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *Neuron*, 48: 1001–1010, 2005.
- WRIGHT HR, LACK LC, & KENNAWAY DJ. Differential effects of light wavelength in phase advancing the melatonin rhythm. *J. Pineal Res.*, 36: 140-144, 2004.

## ANEXO



Universidade Federal do Rio Grande do Norte  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

## PROTOCOLO N.º 052/2012

Professor/Pesquisador: *CAROLINA VIRGÍNIA MACEDO DE AZEVEDO*

Natal (RN), 19 de setembro de 2012.

Prezado Professor/Pesquisador,

Vimos, através deste documento, informar que se encontra em anexo o parecer emitido pela CEUA a respeito do projeto "EFEITO DA INTENSIDADE E COMPRIMENTO DE ONDA DA LUZ SOBRE O RITMO CIRCADIANO DE ATIVIDADE MOTORA EM SAGÜIS", protocolo n.º 052/2012.

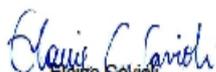
O referido protocolo foi considerado **APROVADO** por esta Comissão.

Informamos que, segundo o Regimento Interno da CEUA (Cap. 2, Art. 13), é função do professor/pesquisador responsável pelo projeto a elaboração de relatório(s) de acompanhamento que deverá(ão) ser entregue(s) dentro do(s) prazo(s) estabelecido(s) abaixo:

- Relatório Final: SETEMBRO 2014 (30 dias após a conclusão do projeto).

Agradecemos a sua atenção e nos colocamos a disposição para eventuais esclarecimentos.

Cordialmente,

  
Elaine Gavioli  
Coordenadora da CEUA