

EFEITOS DA ILUMINAÇÃO ARTIFICIAL NOS RITMOS BIOLÓGICOS E METABOLISMO EM RATOS WISTAR

Caroline L. Quiles^{1,2}, Melissa A. B. de Oliveira^{1,2}, Juliana C. Beauvalet^{1,2},
André C. Tonon¹, Maria Paz L. Hidalgo^{1,2,3#}

1. Laboratório de Cronobiologia e Sono do Hospital de Clínicas de Porto Alegre/UFRGS;
2. PPG Psiquiatria e Ciências do Comportamento, Faculdade de Medicina, UFRGS;
3. Faculdade de Medicina, Departamento de Psiquiatria e Medicina Legal, UFRGS. # Orientadora

Resumo:

Os seres humanos tem passado maior parte do dia em ambientes fechados, expostos à luz artificial. A baixa exposição à luz natural representa um problema de saúde ambiental urgente.

Comparamos a influência de dois regimes de luz artificial sobre o metabolismo e ritmos biológicos de ratos Wistar; que foram expostos 108 dias a um ciclo claro-escuro de 16:8h e divididos em dois grupos: Luz Padrão (SL), mantida sob luz constante; e Luz Circadiana (CL), mantidos sob variações ao longo do dia. Atividade e temperatura foram medidas, além de peso corporal e gordura visceral.

CL apresentou menor variabilidade intraciclo, maior amplitude e quantidade de atividade. SL apresentou peso de gordura visceral elevado; que correlacionou negativamente com a estabilidade do ritmo de atividade e correlacionou positivamente com a soma da atividade durante o período de repouso no grupo SL.

Nosso estudo apóia que o regime de luz sem variação circadiana é um fator forte para o aumento da gordura visceral.

Autorização legal: Aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), nº15-0059 GPPG/HCPA.

Palavras-chave: Cronobiologia; LED; Ritmo Circadiano.

Apoio financeiro: FIPE-HCPA; CNPq-UFRGS; CAPES; Luxion Iluminações; SEBRAE.

Introdução:

Com o advento da eletricidade, as sociedades vêm abandonando a organização de suas rotinas para transições claro-escuro. Nas últimas décadas, os seres humanos têm estendido progressivamente a fase de luz durante as horas da noite.^{1, 2} Além disso, uma quantidade substancial de pessoas passam a maior parte do dia em ambientes fechados. Estes ambientes têm baixa exposição à luz natural e pouca variabilidade de intensidade e temperatura de cor da luz durante o dia. Do ponto de vista da saúde ambiental, essa mudança no padrão de exposição à luz é recente no curso da evolução humana, e seus efeitos começam a ser percebidos e medidos.

Os ritmos biológicos são regulados por um sistema circadiano que coordena os osciladores internos em diferentes órgãos e que também é responsável pela adaptação dos ritmos a estímulos externos.³ Nos mamíferos, o núcleo supraquiasmático hipotalâmico (SCN) é considerado o marcapasso neuroendócrino central.⁴ Ele arrasta os ritmos internos de acordo com a luz através de células ganglionares da retina que contêm o fotopigmento melanopsina. As informações fóticas chegam ao SCN, que se conecta a várias estruturas corporais que regulam o metabolismo e os ritmos biológicos, incluindo temperatura e atividade.⁵ Áreas que regulam o sono e a ingestão de alimentos recebem informações do SCN e a exposição prolongada à luz constante demonstrou desorganizar o comportamento rítmico circadiano,⁶ levando à obesidade e diabetes tipo 2 em roedores.

A capacidade que a luz tem para sincroniar o relógio biológico depende do seu comprimento de onda, também descrito como temperatura de cor. Os comprimentos de onda mais curtos (temperaturas de cor mais altas) denotam luzes de cor azul. Quando os seres humanos são expostos a esse tipo de luz à noite, o SCN é estimulado de forma inesperada, afetando indiretamente regiões cerebrais importantes^{1,7,8} e vias metabólicas.⁹ Por outro lado, a exposição a luzes com

comprimentos de onda mais longos (temperaturas mais baixas) perto da hora de dormir deprime a atividade do sistema nervoso central, preparando-a para o período de descanso.

Frente a este panorama, nosso objetivo foi avaliar os efeitos de um regime de exposição à luz sem variações ao longo do dia em comparação a um regime dinâmico (com variações de temperatura de cor) sobre os ritmos biológicos e metabolismo de ratos wistar.

Metodologia:

36 ratos wistar machos foram mantidos desde o primeiro dia até o dia 108 de vida em ciclo Claro/Escuro (LD) de 16:8h, de acordo com protocolos já estabelecidos^{10,11} para reproduzir a exposição diária de luz de indivíduos em áreas urbanas. Posteriormente, os animais foram divididos em 2 grupos: Luz Padrão (SL; n = 18), e Luz Circadiana (CL; n = 18). O grupo SL foi exposto à luz LED com temperatura de cor constante (4000K), enquanto o grupo CL foi exposto à luminárias LED desenvolvidas para simular mudanças diárias de luz natural. A temperatura da cor do grupo CL mudou de 2700K para 6500K ao longo das primeiras 6 horas da fase clara, e retornou gradualmente a 2700K ao longo das 10 horas restantes. Ambas as lâmpadas foram projetadas e fornecidas pela Luxion Iluminação™ (Caxias do Sul, Brasil), e emitiam 1500 lumens, sendo alimentadas com 10W.

Considerando os diferentes estágios de desenvolvimento previamente estabelecidos,¹² o estudo foi dividido em quatro períodos: fase 1 (*postnatal day* - PND 24-42), fase 2 (PND 43-56), fase 3 (PND 57-84) e fase 4 (PND 85-108). Os ritmos de atividade-reposo e temperatura foram caracterizados como previamente descrito.¹³ Gaiolas individuais foram equipadas com actígrafos (Actigraph, ADNpln, ©Antoni Díez Noguera, Barcelona, CA, Espanha) que detectaram o movimento dos animais com feixes de laser e registraram o número de unidades de locomoção a cada 10 minutos. Os dados de atividade e repouso foram colhidos a partir do PND 24 até a eutanásia, compreendendo um total de aproximadamente 84 dias. A temperatura foi registrada utilizando ThermoChron iButtons (Dallas, TX) implantado na cavidade abdominal. Os iButtons registaram dados a cada 50 minutos desde PND 56 até à eutanásia, compreendendo aproximadamente 52 dias.

Semanalmente, o consumo de água e comida foram aferidos, além do peso corporal dos animais. Ao final do estudo (PND 108), os

animais foram eutanasiados e a gordura visceral foi pesada. Durante todo estudo, os animais foram mantidos em estante de fotoperíodo com temperatura e umidade controladas, além de comida e água *ad libitum*.

A avaliação dos ritmos de atividade e temperatura foi realizada utilizando o programa *El Temps* (A. Díez-Noguera, Universitat de Barcelona, 1999.). A análise de Waveform forneceu a *Intracycle Variability* (IV) e a *Interdaily Stability* (IS) dos dados, que são análises seriadas não paramétricas (uma vez que não são baseadas em uma curva sinusoidal). Estas análises quantificam a fragmentação do ritmo e a sincronização com o ciclo claro-escuro de 24h, respectivamente.

A correlação entre os ritmos de atividade e temperatura foi calculada com Microsoft Office Excel 2010. A correlação entre os ritmos de atividade (IS, IV e soma de atividade) e gordura visceral foi calculada em SPSS para Windows (versão 17, SPSS Inc., Chicago, IL).

Resultados e Discussão:

Nossos resultados demonstram que a luz artificial comumente utilizada para ambientes internos afeta negativamente a ritmicidade circadiana e o metabolismo de ratos em comparação com uma luz circadiana, que simula as variações da temperatura natural da luz do dia.

Em ambos os grupos, o início da atividade e a temperatura registrada ocorreram no início da fase escura e fim da atividade ocorreu no início da fase clara. A atividade do CL durante o período escuro (fase de atividade) foi maior que a do grupo SL nas fases 3 ($U=68.000$, $p<0.005$) e 4 ($U=79.000$, $p<0.05$). Durante o período de claro, não foram encontradas diferenças entre os grupos na quantidade de atividade, sugerindo que o grupo CL apresentou um ritmo mais adequado ao esperado para espécies noturnas.

CL apresentou amplitude de atividade significativamente maior do que o grupo SL nas fases 3 ($t=2.29$, $p<0.05$) e 4 ($t=2.18$, $p<0.05$). O aumento de amplitude de atividade foi provavelmente resultado das mudanças graduais de luz, uma vez que o grupo CL foi exposto a transições graduais de temperatura de cor. Os comprimentos de onda azul e verde foram alocados no meio do período de claro, enquanto o espectro de luz avermelhada ocorreu no seu início e no seu fim, distinguindo o início e o final do período de claro. Em estudos com camundongos, as respostas de indução de sono e de aversão são afetadas diferencialmente pelo comprimento de onda;¹⁴ as luzes verdes estão associadas à indução

rápida do sono, enquanto as luzes azuis resultam em uma resposta de excitação. Este fenômeno é mediado pela melanopsina retiniana, um fotopigmento que é mais sensível a luzes azuladas (~460 nm, ou ~6300K).¹⁵ Estes estudos demonstram a distinta influência de diferentes comprimentos de onda de luz nos ritmos de atividade e repouso. Portanto, um sistema de iluminação que transita através de uma série de comprimentos de onda durante seu período de iluminação pode afetar esses ritmos diferencialmente em cada ponto de tempo.

Durante as fases 3 e 4, a análise do IV da atividade apresentou valores mais elevados para o grupo SL em comparação com o grupo CL (fase 3: $t = -2.62$, $p < 0.05$; fase 4: $t = -2.42$, $p < 0.05$). As correlações entre atividade e temperatura foram maiores no grupo CL da semana 9 a 14. Na semana 11, essa diferença foi estatisticamente significativa ($t = 2.12$, $p < 0.05$). Por exemplo, a diferença (ou delta) entre acrofases de atividade e temperatura do grupo SL foi consideravelmente maior do que a do grupo CL ($t = -3.98$, $p < 0.001$). Esses achados sugerem uma frágil sincronia entre os ritmos do grupo SL, uma vez que a relação entre temperatura e ritmo de atividade está fundamentalmente ligada à adequada sincronização entre o sistema circadiano e o ambiente. Em humanos, uma ruptura relevante da sincronia dos ritmos é indicador de uma perturbação que pode levar à cronodisrupção, se essa perturbação for crônica.¹⁶ Por sua vez, a cronodisrupção é considerada um fator crucial na etiologia dos transtornos do humor,^{17,18} distúrbios metabólicos e ganho de peso,¹⁹ representando um alvo interessante para a prevenção e tratamento de resultados adversos para a saúde.

O peso corporal dos grupos foi diferente nas semanas 6, 8, 13 e 14. O grupo SL apresentou menor peso corporal em relação ao grupo CL nas semanas 6 ($t = 2.13$, $p < 0.05$) e 8 ($t = 3.12$, $p < 0.01$), e maior peso corporal na semana 13 ($t = -3.17$, $p < 0.01$) e 14 ($t = -2.05$, $p < 0.05$). Na semana 6, o grupo CL teve uma ingestão alimentar mais elevada em comparação com o grupo SL ($t = 2.11$, $p < 0.05$), mas nas semanas 9, 12 e 13, o grupo SL apresentou maior ingestão alimentar que o grupo CL (semana 9: $t = -2.13$, $p < 0.05$; semana 12: $t = -2.145$, $p < 0.05$; semana 13: $t = -4.06$, $p < 0.001$). Além disso, o grupo SL apresentou peso de gordura visceral significativamente maior do que o grupo CL ($U = 75.000$, $p < 0.01$). Ainda, o grupo SL apresentou correlação entre o peso de gordura visceral e a soma total da atividade durante a fase clara (correlação de Spearman; $r = 0.556$,

$p < 0.05$). A partir de nossos achados, nossa hipótese é que a alternativa mais provável para a redução da gordura visceral no grupo CL seria o deslocamento do aporte de energia para o gasto com a produção de tecido muscular ao invés do armazenamento de gordura visceral, em resposta ao aumento da atividade na fase escura. Além disso, uma correlação positiva entre a soma total da atividade na fase clara e a gordura visceral ocorreu apenas no grupo SL. Isto significa que quanto mais ativos os animais estiverem na fase de repouso, mais elevada quantidade de gordura visceral. Assim, nossos resultados indicam que estar ativo em momentos em que o corpo necessita de repouso pode ser deletério para a saúde.

O IS da atividade foi negativamente correlacionado com a gordura visceral do grupo SL nas fases 1, 3 e 4 ($p < 0.05$), e do grupo CL na fase 2 ($p < 0.05$). Além disso, o grupo SL apresentou correlação positiva significativa entre o IV da atividade e a gordura visceral nas fases 1 e 4 ($p < 0.05$), e o CL nas fases 1 e 2 ($p < 0.05$). Os resultados dessas correlações sugerem que a baixa sincronização da atividade com o ciclo de claro-escuro de 24 horas está relacionada ao peso de gordura visceral elevada. Destaca-se que as análises rítmicas de atividade como IS e IV são importantes temas de estudo na pesquisa do metabolismo, já que podem prever níveis de gordura visceral, especialmente na fase adulta (fases 3 e 4 neste estudo). Nosso estudo aponta que essas variáveis rítmicas também podem ser úteis para investigar a relação entre o peso corporal e os padrões de acúmulo de gordura.

Conclusões:

Nossos resultados reforçam a importância da luz como um ponto essencial para a regulação da fisiologia e comportamento. As diferenças encontradas entre os grupos de estudo indicam que os sistemas de iluminação atualmente utilizados em habitação de animais de experimentação podem não ser tão neutros como se supunha até o momento. Nosso estudo sugere que o uso de uma luz circadiana poderia aumentar a confiabilidade de modelos animais.

Esperamos que a tecnologia projetada para este estudo possa ser aprimorada para permitir seu uso em hospitais e escritórios, onde a luz natural muitas vezes não está disponível. Assim será possível além de promover a saúde, auxiliar na economia de energia e melhora no desempenho das atividades laborais e educacionais.

Referências bibliográficas

1. Bedrosian, T.A.; Vaughn, C.A.; Galan, A.; Daye, G.; Weil, Z.M.; Nelson, R.J. **Nocturnal light exposure impairs affective responses in a wavelength-dependent manner.** *J Neurosci.* 2013, 7 (32), 13081–13087.
2. Stevens, R.G.; Brainard, G.C.; Blask, D.E.; Lockley, S.W.; Motta, M.E. **Breast cancer and circadian disruption from electric lighting in the modern world.** *CA Cancer J Clin.* 2014, 64 (3), 207–218.
3. Bechtold, D.A.; Gibbs, J.E.; Loudon, A.S.. **Circadian dysfunction in disease.** *Trends Pharmacol Sci.* 2010, 31, 191-198.
4. Roenneberg, T.; Mrosovsky, M. **The Circadian Clock and Human Health.** *Curr Biol.* 2016, 23 (10), 432-443.
5. Buijs, R.M.; van Eden, C.G.; Goncharuk, V.D.; Kalsbeek, A. **The biological clock tunes the organs of the body: timing by hormones and the autonomic nervous system.** *J Endocrinol.* 2003, 177 (1), 17–26.
6. Albers, H.E.; Gerall, A.A.; Axelsson, J.F. **Circadian rhythm dissociation in the rat: effects of long-term constant illumination.** *Neurosci Lett.* 1981, 7 (1), 89–94.
7. Holzman, D.C. What's in a color? **The unique human health effect of blue light.** *Environ Health Perspect.* 2010, 118 (1), 22-27.
8. Vandewalle, G.; Maquet, P.; Dijk, D-J. **Light as a modulator of cognitive brain function.** *Trends Cogn Sci (Regul Ed).* 2009, 13 (10), 429–438.
9. Fonken, L.K.; Workman, J.L.; Walton, J.C.; Weil, Z.M.; Morris, J.S.; Haim, A.; Nelson, R.J. **Light at night increases body mass by shifting the time of food intake.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010, 107 (43), 18664–18669.
10. Otsuka, T.; Kawai, M.; Togo, Y.; Goda, R.; Kawase, T.; Matsuo, H.; Iwamoto, A.; Nagasawa, M.; Furuse, M.; Yasuo, S. **Photoperiodic responses of depression-like behavior, the brain serotonergic system, and peripheral metabolism in laboratory mice.** *Psychoneuroendocrinology.* 2014, 40, 37–47.
11. Workman, J.L.; Manny, N.; Walton, J.C.; Nelson, R.J. **Short day lengths alter stress and depressive-like responses, and hippocampal morphology in Siberian hamsters.** *Horm Behav.* 2011, 60 (5), 520–528.
12. Sengupta, P. **The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's.** *Int J Prev Med.* 2013, 4 (6), 624–630.
13. Quiles, C.L.; de Oliveira, M.A.B.; Tonon, A.C.; Hidalgo, M.P.L. **Biological adaptability under seasonal variation of light/dark cycles.** *Chronobiol Int.* 2016, 33 (8), 964–971.
14. Piorz, V.; Tam, S.K.E.; Hughes, S.; Potthecary, C.A.; Jagannath, A.; Hankins, M.W.; Bannerman, D.M.; Lightman, S.L.; Vyazovskiy, V.V.; Nolan, P.M.; Foster, R.G.; Peirson, S.N. **Melanopsin Regulates Both Sleep-Promoting and Arousal-Promoting Responses to Light.** *PLoS Biol.* 2016, 14 (6), 1002482.
15. Lockley, S.W.; Brainard, G.C.; Czeisler, C.A. **High sensitivity of the human circadian melatonin rhythm to resetting by short wavelength light.** *J Clin Endocrinol Metab.* 2003, 88 (9), 4502–4505.
16. Erren, T.C.; Reiter, R.J. **Defining chronodisruption.** *J Pineal Res.* 2009, 46 (3), 245–247.
17. Scott, J. **Clinical parameters of circadian rhythms in affective disorders.** *Eur Neuropsychopharmacol.* 2011, 21 (4), 671-675.
18. Bechtel, W. **Circadian Rhythms and Mood Disorders: Are the Phenomena and Mechanisms Causally Related?** *Front Psychiatry.* 2015, 6,118.
19. Turek, F.W.; Joshu, C.; Kohsaka, A.; Lin, E.; Ivanova, G.; McDearmon, E.; Laposky, A.; Losee-Olson, S.; Easton, A.; Jensen, D.R.; Eckel, R.H.; Takahashi, J.S.; Bass, J. **Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice.** *Science.* 2005, 13 (5724), 1043–1045.