

O valor biológico do período circadiano

The biological value of the circadian period

Bruno Jacson Martynhak¹, Flávio Augustino Back², Fernando Louzada²

¹Departamento de Farmacologia, Universidade Federal do Paraná

²Departamento de Fisiologia, Universidade Federal do Paraná

¹Contato do autor: brunojm@gmail.com

Resumo. Protocolos experimentais que visam mensurar o período do ritmo circadiano em seres humanos e outras espécies envolvem condições artificiais dos esquemas de iluminação. Desta forma, uma vez que condições ambientais constantes não existem naturalmente, questionamos o significado de se medir o período circadiano. O fato de essa medida ser avaliada de forma descontextualizada socialmente leva a uma compreensão mais estática dos processos biológicos. Finalmente, a visão tradicional do período circadiano é contrastada neste ensaio com a sua possível relação com o estado atual do sistema de temporização.

Palavras-chave. Período circadiano endógeno, plasticidade, tau.

Abstract. Experimental protocols that aim to measure the circadian period in humans and other species usually imply the use of artificial, constant conditions of illumination. Since these conditions do not occur naturally, we argue the meaning of measuring the circadian period. Its determination in a situation out of the social context may lead to a more static understanding of biological processes. Finally, the traditional view of the intrinsic circadian period is contrasted in this essay with its possible relation with the current status of the temporization system.

Keywords. Circadian period, plasticity, tau.

Recebido 15out10

Aceito 21ago12

Publicado 27dez12

Definindo um conceito cronobiológico: período endógeno

O período circadiano (τ) tem sido definido como a duração do ciclo de um ritmo circadiano quando o organismo encontra-se isolado de pistas ambientais temporais, ou seja, quando se encontra em condições de livre-curso. A expressão de um ritmo de 24h ocorre através do processo de sincronização.

Em 1729, o astrônomo francês De Mairan apresentou o primeiro relato científico da ritmicidade endógena. De Mairan observou que o movimento de abrir e fechar das folhas sensitivas de *Mimosa* continuava a apresentar um ritmo próximo de 24h mesmo em condições de escuro constante (De Mairan, 1729). A existência de outros fatores que poderiam estar fornecendo pistas ambientais cíclicas, mesmo em escuro constante, colocou em questão se de fato o ritmo era endógeno ou gerado pela oscilação de outras variáveis ambientais, como por exemplo, o geomagnetismo. O debate sobre o fato de a ritmicidade ser ou não endógena se prolongou por décadas, até os estudos de Hamner e colaboradores (1962) no pólo sul. Estes pesquisadores estudaram diferentes organismos em condições de iluminação constante, mantidos sobre aparatos que giravam em sentido oposto ao da rotação da Terra. Um padrão rítmico tanto da atividade locomotora de *hamsters*,

da eclosão dos ovos de *Drosophila*, quanto da conidiação do fungo *Neurospora* persistiram nestas condições. Os resultados obtidos nestes experimentos tornaram-se um marco para a aceitação do caráter endógeno da ritmicidade biológica pelo cronobiologistas.

O estudo da endogenidade no plano molecular também passou a ser alvo de investigações. A primeira relação entre genes e o período circadiano foi proposta por Konopka e Benzer (1971) em *Drosophila*. Os pesquisadores observaram que algumas moscas mutantes apresentavam alterações no ritmo de eclosão dos ovos. O ritmo endógeno dos mutantes poderia ser muito curto, muito longo ou poderia não haver ritmo. O gene responsável por essa alteração de período recebeu o nome de *Period*.

Ralph e Menaker (1998) descreveram uma mutação associada à drástica redução do período circadiano em *hamsters* da Síria. Enquanto os *hamsters* selvagens apresentavam o τ próximo de 24h, os mutantes heterozigotos expressavam um τ de 22h e os homozigotos de apenas 20h. O padrão de herança desta mutação levou os autores à conclusão de que se tratava de uma mutação em um único gene. Devido ao fenótipo expresso pelos animais, ela ficou conhecida como mutação tau (τ). Além disso, os animais homozigotos para a mutação apresentavam dificuldades de sincronização a um ciclo claro/escuro de 24h, e alguns indivíduos até mesmo não eram capazes de se sincroni-

zarem. Atualmente várias mutações dos chamados “genes relógio” ou relacionadas ao sistema de temporização são associadas à alteração do tau em roedores. Por exemplo, se contrapondo ao efeito da mutação tau, a mutação *after hour*, no gene *Fbxl3* em camundongos, aumenta o período circadiano endógeno para aproximadamente 27h (Godinho *et al.*, 2007).

A construção do conceito do período circadiano em humanos

Os primeiros estudos de isolamento temporal em humanos foram conduzidos em cavernas, onde a temperatura ambiental é constante e os sujeitos podem ser isolados do ambiente externo. Nathaniel Kleitman e Bruce Richardson permaneceram 32 dias isolados em uma caverna em Kentucky, Estados Unidos (Kleitman, 1939). Durante os 32 dias foram avaliados os ritmos de atividade, de temperatura corporal e de sonolência. O período do ritmo de atividade de ambos passou das 24h habituais para 28h. Em 1962, o pesquisador francês Michel Siffre, então com 23 anos, permaneceu dois meses no subsolo de uma cordilheira na França. Em seu terceiro experimento de isolamento temporal, em 2000, já com 61 anos de idade, Siffre permaneceu por 73 dias no subsolo. Nestes experimentos, o período circadiano foi estimado como sendo maior que 25h.

Entretanto, medidas do período do ritmo endógeno de atividade em humanos mostram uma grande variação, de 13 a 65h (Wever, 1979). Para estes valores, diferentes metodologias foram utilizadas, como condições constantes iluminação e o controle do voluntário de acender e apagar as luzes. O período endógeno também já foi medido em indivíduos cegos, quando foi detectada a duração de 25h (Sack *et al.*, 2000).

Atualmente, o método que vem sendo mais utilizado para se avaliar o período circadiano endógeno humano é o protocolo da dessincronização forçada. Neste método, os indivíduos são expostos artificialmente a ciclos claro/escuro de 20 ou 28h. Este ciclo muito diferente das 24h está além de nossa capacidade de sincronização. Com isto, ocorre um desacoplamento dos ritmos de atividade, de temperatura interna e de melatonina, que entram em livre curso, possibilitando assim a medida de tau.

Valor biológico do período endógeno

Em condições naturais, o ambiente ocupado pela imensa maioria dos organismos é cíclico e os ciclos naturais sincronizam os ritmos biológicos. Para os mamíferos, o ciclo claro/escuro natural, dia/noite, parece ser o mais importante sincronizador. A criação de métodos e protocolos para se avaliar a representação do sistema de temporização, o tempo interno, em um ambiente laboratorial artificial é que permitiu a criação do construto teórico “período endógeno”. Esta forma de mensuração nos faz refletir até que ponto o significado deste conceito, atrelado a sua discutível forma de mensuração, aplica-se à compreensão de processos vivos.

Entretanto, apesar deste questionamento, o conceito vigente do período endógeno tem demonstrado relações com outros processos biológicos. Por exemplo, a maior proximidade do tau com relação ao ciclo ambiental exposto favorece a sobrevivência em cianobactérias do gênero *Synechococcus* (Ouyang *et al.*, 1998). De forma similar, a maior proximidade do tau com 24h se relaciona com maior expectativa de vida, tanto em roedores como em primatas não humanos (Wyse *et al.*, 2010).

Já em humanos, a duração do período endógeno tem sido relacionada com a capacidade de sincronização a um ciclo artificial diferente de 24h em exposição a sincronizadores fracos (Wright *et al.*, 2001). Voluntários submetidos a um ciclo claro/escuro uma hora maior que seu período endógeno não eram capazes de se sincronizar quando a intensidade luminosa da fase de claro era 25 lux (Gronfier *et al.*, 2007).

Também, se tem encontrado uma relação entre a duração do período endógeno e a preferência por horários de sono. Indivíduos que apresentam período circadiano mais curto tendem a adiantar os horários de dormir e acordar, enquanto que indivíduos com período endógeno maior tendem a ser mais vespertinos (Duffy *et al.*, 2001). Também já foi levantada a hipótese de que a diminuição do período endógeno pode ser responsável pelo adiantamento de fase que ocorre no envelhecimento (Pittendrigh e Daan, 1974). O ritmo endógeno de indivíduos completamente cegos foi estudado duas vezes, com um intervalo de 10 anos entre as medidas. Os autores observaram que o período endógeno expresso era ligeiramente maior na segunda avaliação, resultados que iria contra a hipótese inicial (Kendall *et al.*, 2001). Entretanto, Carskadon e colaboradores (1998) avaliaram o período endógeno do ritmo de atividade de adolescentes e obtiveram o valor de tau maior que 24h em todos os 10 participantes do estudo. Os valores foram maiores do que os encontrados em estudos com adultos, reforçando a ideia de que o período circadiano endógeno diminui com a idade.

Entretanto, pode-se perguntar se o período circadiano endógeno reflete de fato um atributo fundamental de cada indivíduo ou, ao invés, reflete o estado momentâneo do sistema de temporização do indivíduo. Existem evidências sugerindo a plasticidade do período endógeno. Por exemplo, o consumo forçado de álcool reduz o período endógeno de camundongos C57BL/6, animais com alta preferência por etanol (Seggio *et al.*, 2009).

Camundongos *knockout* para o gene *Clock* apresentam redução do tau (Debruyne *et al.*, 2006), enquanto que os mutantes *Clock* Δ 9 apresentam o período endógeno longo. Além disso, os mutantes *Clock* Δ 9 possuem comportamentos similares à mania, que são revertidos pelo tratamento com lítio (Roybal *et al.*, 2006). Tanto em *Drosophila* como em roedores, o período endógeno aumenta com a administração de lítio e diminui com a administração de inibidores da enzima GSK3-B (Hirota *et al.*, 2008).

Em roedores, é conhecido que o acesso à roda de atividade promove aumento do tau, possivelmente devido à atividade física (Mrosovsky, 1993). Em humanos, por outro lado, pelo menos da forma como foi avaliado, a prática

de atividades físicas parece não alterar o período circadiano (Beersma e Hiddinga, 1998; Cain *et al.*, 2007). Ainda assim, existem evidências da plasticidade do tau também em humanos. Scheer *et al.* (2007) observaram que o período do ritmo circadiano de atividade dos participantes era maior após a sincronização a um ciclo de 24,65h do que após a sincronização a um ciclo de 23,5h. Importante ressaltar que o tempo em que os sujeitos permaneciam nos ciclos diferentes de 24h era de apenas 14 dias. Assim, percebemos que mesmo um tratamento relativamente curto pode alterar a expressão circadiana.

Assim, pode-se perguntar se os indivíduos matutinos dormem cedo por apresentarem o tau menor em relação a outras pessoas, ou, se devido ao histórico de hábitos antecipados de sono e do padrão de exposição à luz natural, o tau torna-se menor. Por exemplo, existem relatos da associação entre a data de nascimento com a preferência por horários de sono (Natale *et al.*, 2002; Mongrain *et al.*, 2006), embora outros pesquisadores não tenham encontrado os mesmos resultados (Takao *et al.*, 2009). Esta questão foi discutida por um dos autores (FAB) em sua dissertação de mestrado. Foram estudados dois grupos de trabalhadores de uma região rural com 2000 habitantes, um que atuava em ambiente aberto e outro em ambiente fechado. Foi avaliado o padrão de exposição ao ciclo claro/escuro natural e a preferência por horários de sono e atividade, cronotipo. O grupo de trabalhadores da lavoura demonstrou ser mais matutino do que o grupo de trabalhadores de ambiente fechado. Foi discutida a relação que os horários e o ambiente de trabalho têm com o estabelecimento do arrastamento pelo ciclo claro/escuro e algumas das possíveis implicações (Back, 2008).

Podemos concluir que o valor biológico do período circadiano endógeno é inegável. Entretanto, também podemos concluir que condições externas ao indivíduo podem alterar seu valor. Assim, quando medimos a sua duração talvez estejamos, na realidade, avaliando o resultado do histórico das situações de claro/escuro a que o indivíduo foi submetido. Ao invés do período endógeno ser o determinante de variáveis como o cronotipo, por exemplo, talvez o próprio histórico do indivíduo modifique o período endógeno.

“O mundo não é assim, ele está sendo assim” (Paulo Freire).

Bibliografia

Aschoff J, Gerecke U, Wever R. 1967. Desynchronization of human circadian rhythms. *The Japanese journal of physiology* 17:450-457.

Back FA. 2008. Padrão temporal de exposição ao ciclo claro/escuro natural e expressão dos cronotipos em uma região rural. Dissertação de mestrado. 73 p.

Beersma DG e Hiddinga AE. 1998. No impact of physical activity on the period of the circadian pacemaker in humans. *Chronobiology International* 15:49-57.

Cain SW, Rimmer DW, Duffy JF, Czeisler CA. 2007. Exercise distributed across day and night does not alter circadian period in humans. *Journal of Biological Rhythms* 22:534-541.

De Mairan JJD. 1729. *Observation Botanique. Histoire de l'Academie Royale des Sciences*, 35-36.

Dijk DJ e Czeisler CA. 1995. Contribution of the circadian pacemaker and the sleep homeostatic to sleep propensity, sleep structure, electroencephalographic slow waves, and sleep spindle activity in humans. *The Journal of Neuroscience* 15:3526-3538.

Duffy JF, Rimmer DW, Czeisler CA. 2001. Association of intrinsic circadian period with morningness-eveningness, usual wake time and circadian phase. *Behavioral Neuroscience*. 115:895-899.

Godinho SI, Maywood ES, Shaw L, Tucci V, Barnard AR, Busino L, Pagano M. 2007. The after-hours mutant reveals a role for Fbxl3 in determining mammalian circadian period. *Science* 316:897-900.

Golombek DA, Rosenstein RE. 2010. Physiology of circadian entrainment. *Physiological Reviews* 90:1063-1102.

Gronfier C, Wright KP, Kronauer RE, Czeisler CA. 2007. Entrainment of the human circadian pacemaker to longer-than-24-h days. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:9081-9086.

Kendall AR, Lewy AJ, Sack RL. 2001. Effects of aging on the intrinsic circadian period of totally blind humans. *Journal of Biological Rhythms* 16:87-95.

Kleitman N. 1939. *Sleep and Wakefulness*. Chicago: University of Chicago.

Konopka R e Benzer S. 1971. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 68:2112-2116.

Hamner KC, Finn Jun JC, Siroshi, GS, Hoshizaki T, Carpenter BH. 1962. The Biological Clock at the South Pole. *Nature* 195:476-480.

Hirota T, Lewis WG, Liu AC, Lee JW, Schultz PG, Kay, SA. A chemical biology approach reveals period shortening of the mammalian circadian clock by specific inhibitor of GSK3-beta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:20746-20751.

Mongrain V, Paquet J, Dumont M. 2006. Contribution of the photoperiod at birth to the association between season of birth and diurnal preference. *Neuroscience Letters* 406: 113-116.

Mrosovsky N. 1993. Tau changes after single nonphotic events. *Chronobiology International* 10:271-276.

Natale V, Adan A, Chotai J. 2002. Further results on the association between morningness-eveningness preference and the season of birth in human adults. *Neuropsychobiology* 46:209-214.

Pittendrigh CS e Daan S. 1974. Circadian oscillations in rodents: a systematic increase of their frequency with age. *Science* 198:548-550.

Ouyang Y, Andersson CR, Kondo T, Golden S, Johnson CH. 1998. Resonating circadian clocks enhance fitness in cyanobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:8660-8664.

Ralph MR e Menaker MA. 1998. A mutation of the circadian system in golden hamsters. *Science* 241:1225-1227.

Roybal K, Theobald D, Graham A, DiNieri JA, Russo SJ, Krishnan V, Chakravarty S, Peevey J, Oehrlein N, Birnbaum S, Vitaterna MH, Orsulak P, Takahashi JS, Nestler EJ, Carlezon WA, McClung CA. 2007. Mania-like behavior induced by disruption of CLOCK. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 15:6406-6411.

Sack RL, Brandes RW, Kendall, AR, Lewy AJ. 2000. Entrainment of free-running circadian rhythms by melatonin in blind people. *New England Journal of Medicine* 343:1070-1077.

- Scheer FA, Wright KP, Kronauer RE, Czeisler CA. 2007. Plasticity of the intrinsic period of the human circadian timing system. *PLoS One* 2:e721.
- Seggio JS, MC, Reed, J.D., Logan, R.W., Rosenwasser AM. 2009. Chronic Ethanol Intake Alters Circadian Phase Shifting and Free-Running Period in Mice. *Journal of Biological Rhythms* 24:304-312.
- Takao M, Kurachi T, Kato H. 2009. Photoperiod at birth does not modulate the diurnal preference in asian population. *Chronobiology International* 26:1470-1477.
- Wever R. The circadian multi-oscillator system of man. 1975. *International Journal of Chronobiology* 3:19-55.
- Wever R. 1979. The circadian system of man: results of experiments under temporal isolation. Springer-Verlag: New York.
- Wright KP, Hughes RJ, Kronauer RE, Dijk DJ, Czeisler CA. 2010. Intrinsic near-24-h pacemaker period determines limits of circadian entrainment to a weak synchronizer in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:14027-14032.
- Wyse CA, Coogan AN, Selman C, Hazlerigg DG, Speakman JR. 2010. Association between mammalian lifespan and circadian free-running period: the circadian resonance hypothesis revisited. *Biology Letters* 6:696-698.