

Milene Gomes Jannetti

Sazonalidade dos padrões diários de atividade
de superfície em um roedor subterrâneo, o tuco-
tucu

Seasonality of daily surface activity patterns in
a subterranean rodent, the tuco-tuco

São Paulo

2018

Milene Gomes Jannetti

Sazonalidade dos padrões diários de atividade
de superfície em um roedor subterrâneo, o tuco-
tucu

Seasonality of daily surface activity patterns in
a subterranean rodent, the tuco-tuco

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo,
para a obtenção de Título de Mestre em
Ciências, na Área de Fisiologia Geral.

Orientadora: Gisele Akemi Oda

Co-Orientadora: Verónica Sandra Valentinuzzi

São Paulo

2018

Gomes Jannetti, Milene
Sazonalidade dos padrões diários de atividade de
superfície em um roedor subterrâneo, o tuco-tuco / Milene
Gomes Jannetti; orientadora Gisele Akemi Oda. -- São
Paulo, 2018.

82 f.

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo, Departamento de Fisiologia.

1. Sazonalidade e Fotoperiodismo. 2. Roedor
subterrâneo. 3. Bio-logging. 4. Ritmos biológicos. I.
Akemi Oda, Gisele, orient. II. Título.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dra. Gisele Akemi Oda
Orientadora

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, Márcia e Francisco, por terem me dado todas as condições e o apoio necessários para conseguir fazer mestrado. Também à minha tia, Mirany, por me inspirar a estudar e seguir fazendo o que gosto.

Às minhas orientadoras, Gisele Akemi Oda e Verónica Sandra Valentinuzzi, pela oportunidade de ter feito esse projeto, que foi uma experiência muito enriquecedora, e pela enorme dedicação e paciência em me ensinar não só habilidades profissionais, como também valores morais que vou levar para a vida.

A Charles Loren Buck pelos conselhos durante a elaboração, execução do projeto e interpretação dos resultados, além do apoio com os equipamentos utilizados.

À Johana Barros, pela grande contribuição em todas as coletas de dados desse projeto.

A todo o pessoal do CRILAR, por nos receber sempre muito bem nas nossas viagens para realização dos experimentos.

Aos meus colegas de laboratório, Tamiris Yassumoto, Giovane Improta, Patrícia Tachinardi, Danilo Flôres e Jefferson Silva, pelas ótimas conversas, aventuras argentinas, pelo espírito de colaboração que sempre tiveram e por terem me ajudado em várias etapas, desde a coleta dos dados até as discussões.

Às minhas amigas Andreza Caiero, Giulia Ribeiro, Bruna Fonseca, Pâmela Aranda, Nayara Testae e Amanda Macito. Agradeço especialmente à Lariza Arévalo, por ter acompanhado de perto os meus dramas e por ter me feito aprender a falar espanhol.

Ao apoio financeiro da CAPES e da FAPESP (2016/25058-0).

SUMÁRIO

Resumo	1
Abstract	2
Introdução geral	3
Capítulo 1. Ritmos biológicos de atividade/repouso	7
1.1. Padrões diários de atividade dos animais na natureza	7
1.2. Características dos ritmos	7
1.3. Mecanismos de sincronização	9
1.3.1. Arrastamento	10
1.3.2. Mascaramento.....	10
Capítulo 2. Laboratório e campo	11
2.1. Experimentos cronobiológicos em campo.....	11
2.2. Experimentos cronobiológicos em laboratório.....	13
2.3. Estudo da ritmicidade em tuco-tucos, em campo e laboratório.....	13
2.3.1. Caracterização da atividade em campo	14
2.3.2. Ritmos diários e sazonais em campo e laboratório.....	15
2.4. Caracterização de variáveis ambientais em laboratório e campo	17
2.5. Objetivos deste projeto	19
Capítulo 3. Experimentos.....	20
3.1. População de estudo, capturas e manutenção dos animais.....	20
3.2. Arenas: Ritmo de atividade em ambiente semi-natural.....	21
3.2.1. Arenas semi-naturais	21
3.2.2. Variáveis ambientais.....	22
3.2.3. Medições do ritmo de atividade dos animais.....	22
3.2.4. Protocolo inicial.....	23
3.3. Laboratório: medida do ritmo diário de atividade em roda	26
3.4. Análises Gerais	26

3.5. Análise da influência da temperatura ambiental sobre o ritmo de atividade de superfície nas arenas semi-naturais	28
Capítulo 4. Resultados e análises.....	30
4.1. Recapturas	30
4.2. Dados ambientais coletados.....	32
4.3. Caracterização do ritmo de atividade nas arenas semi-naturais	34
4.4. Influência da temperatura ambiental sobre o ritmo de atividade de superfície nas arenas semi-naturais	42
4.5. Resultados e análises dos registros de laboratório.....	49
Discussão e conclusões.....	53
5.1. Os componentes da atividade diária dos tuco-tucos nas arenas semi-naturais....	53
5.2. Verificação de sazonalidade nos padrões diários de atividade.....	55
5.3. Modulação da atividade de superfície pelas variações ambientais.....	56
5.4. Perspectivas para a investigação dos fatores endógenos associados à atividade de superfície	58
5.5. Considerações finais sobre estudos cronobiológicos em campo e laboratório....	59
Referências Bibliográficas	61
Suplementos	68
S.1. Cálculo do onset de atividade.....	68
S.2. Considerações sobre a análise de regressão múltipla.....	74

RESUMO

Ritmos biológicos e sua sincronização por ciclos ambientais geralmente são estudados em roedores, mantidos em laboratório. Nosso grupo vem estudando ritmos de atividade/repouso de roedores subterrâneos sul-americanos conhecidos como tuco-tucos (*Ctenomys* aff. *knighti*) em laboratório e campo. Na natureza, sabemos que os tuco-tucos emergem à superfície diariamente em episódios de até uma hora. Registros curtos da atividade de superfície dos tuco-tucos, anteriormente obtidos pelo grupo, haviam sugerido que o padrão diário das saídas variava sazonalmente, sendo crepusculares durante o verão e concentrados no meio do dia, durante o inverno. Esse mesmo padrão sazonal já foi observado em populações de outros roedores de deserto e foi atribuído a reações dos roedores às variações diárias de temperatura, no verão e inverno. Por outro lado, a sazonalidade dos padrões de atividade de várias espécies de mamíferos e aves também pode ser explicada pela sincronização diária do ritmo de atividade a diferentes fotoperíodos. O objetivo desse trabalho é caracterizar a variação sazonal dos ritmos diários de atividade dos tuco-tucos, com uso de *bio-logging*, e verificar a contribuição dos fatores ambientais para a sazonalidade desses padrões. Ao longo do ano, acelerômetros e luxímetros foram presos a 29 animais recentemente capturados (15 fêmeas e 14 machos). Cada animal foi mantido individualmente em arenas semi-naturais por um mês. Variáveis ambientais foram registradas simultaneamente. Outros 18 animais (9 fêmeas e 9 machos) foram mantidos em laboratório, expostos ao fotoperíodo natural e em ambiente com temperatura constante. Os resultados confirmaram a sazonalidade do padrão temporal de atividade de superfície dos tuco-tucos. Os acelerômetros se mostraram mais precisos e sensíveis a pequenos movimentos corporais do que os registros de telemetria encontrados na literatura. Esses sensores também revelaram padrões de atividade subterrânea e noturna, em ambiente semi-natural. Durante o verão, a atividade de superfície diária dos tuco-tucos foi melhor prevista pelo horário do dia (fator endógeno) do que pelas variações de temperatura ambiental (fator exógeno). Durante o inverno, entretanto, a temperatura ambiental teve maior contribuição no padrão de saídas dos tuco-tucos, indicando complexas contribuições dos fatores endógenos e exógenos no delineamento dos padrões de atividade.

ABSTRACT

Biological rhythms and their synchronization by environmental cycles are generally studied in rodents, inside laboratory. Our group studies activity/rest rhythms of South American subterranean rodents known as tuco-tucos (*Ctenomys* aff. *knighti*), in laboratory and field. In nature, it is known that tuco-tucos emerge daily to the surface, in brief episodes. Short records of tuco-tucos' individual surface activity, previously collected by our group, had suggested that daily temporal pattern of emergence varied seasonally, being crepuscular in summer and concentrated around midday in winter. The same seasonal pattern was observed in populations of other desert rodents and was attributed to daily variations of environmental temperature, in summer and winter. At the same time, seasonality of activity patterns of various species of mammals and birds can be explained by daily synchronization of the activity rhythm by different photoperiods. Our aim is to characterize seasonal variation of daily activity rhythms of tuco-tucos, using bio-logging, and to verify the contribution of environmental factors in the seasonality of these patterns. Throughout the year, accelerometers and luximeters were tied to 29 freshly caught animals (15 females and 14 males). Each animal was kept inside semi natural enclosures for one month. Environmental variables were recorded simultaneously. Other 18 animals (9 females and 9 males) were kept inside laboratory, exposed to natural photoperiod, in a room with constant temperature. We confirmed the seasonality of temporal pattern of surface activity of tuco-tucos. The accelerometers resulted to be more precise and sensitive to small body movements than telemetry records found in literature. They also revealed nocturnal and subterranean activity patterns inside the enclosures. During summer, daily surface activity of tuco-tucos was better predicted by time of day (endogenous factor) than by environmental temperature (exogenous factor). During winter season, however, environmental temperature has a stronger contribution on the emergence pattern in tuco-tucos, indicating complex contributions of endogenous and exogenous factors that outline activity patterns.

INTRODUÇÃO GERAL

Devido ao movimento de rotação da Terra, os fatores ambientais apresentam variação cíclica, com período de 24 horas. Paralelamente, os organismos também apresentam mudanças fisiológicas e comportamentais que se repetem com período de 24 horas e, por isso, são denominadas ritmos biológicos **diários** (Moore-Ede et al., 1982).

Quando os organismos são mantidos em condições artificiais constantes em laboratório e, portanto, sem percepção dos ciclos ambientais, a ritmicidade das variáveis biológicas persiste, com período próximo de 24 horas (Moore-Ede et al., 1982; Bartness & Albers, 2000). Nesse caso, os ritmos biológicos são chamados de **circadianos** (do latim, *circa* significa “cerca de” e *diēs* significa “dia”). O fato dos ritmos circadianos possuírem um período diferente daquele das variações ambientais evidencia que eles são gerados por um mecanismo interno do organismo (Aschoff, 1963). As estruturas responsáveis pela geração do ritmo circadiano recebem o nome de **osciladores circadianos** que, no caso dos mamíferos, estão localizados nos núcleos supraquiasmáticos do hipotálamo (Golombek & Rosenstein, 2010). A lesão dos núcleos supraquiasmáticos resulta na perda da ritmicidade circadiana (Binkley, 1993).

Quando o organismo é exposto a ciclos ambientais naturais, os ritmos biológicos passam a expressar período de 24 horas e dizemos que o ritmo está **sincronizado** (Moore-Ede et al., 1982). A **sincronização** de um ritmo diário envolve a detecção da variação ambiental diária pelo organismo e o processamento dessa informação cíclica no oscilador circadiano. Para os mamíferos, o principal fator ambiental sincronizador é o ciclo claro/escuro (Aschoff, 1963).

Além de expressarem ritmos diários, muitos animais também exibem variações fisiológicas, anatômicas e comportamentais ao longo do ano, que acompanham os ciclos ambientais anuais presentes na duração do dia e na temperatura ambiental, por exemplo. Os ritmos anuais mais conhecidos estão associados à reprodução, migração e hibernação (Dunlap et al., 2004), mas também foram observadas mudanças nos horários e na duração da atividade diária ao longo do ano, em aves e mamíferos (Daan & Aschoff, 1975; Bartness & Albers, 2000). Há evidências de que essas mudanças sazonais são endógenas, ou seja, geradas internamente, e estão sincronizadas à variação anual da duração do dia (Daan & Aschoff, 1975; Elliott, 1976).

ROEDORES SUBTERRÂNEOS

Investigações de organismos que vivem em ambientes fóticos extremos fornecem oportunidades para se explorar os aspectos evolutivos e mecanísticos da ritmicidade circadiana (Beale et al., 2016; Flôres et al., 2016). Especificamente em relação ao ambiente subterrâneo, além da ausência de luz, os animais também estão sujeitos à alta umidade, temperaturas relativamente constantes, fluxo de ar reduzido e, conseqüentemente, baixas concentrações de oxigênio e altas concentrações de dióxido de carbono, em comparação à superfície (Lacey et al., 2000). Essas características ambientais, somadas à alta demanda energética associada à escavação, impõem desafios fisiológicos aos habitantes do subterrâneo. Especialmente dentre os roedores subterrâneos, foi observado um conjunto de modificações morfológicas e fisiológicas que oferecem vantagens ou são conseqüências da vida neste ambiente, como taxas metabólicas basais menores que as esperadas para animais epígeos e maior desenvolvimento dos sistemas somatossensorial e olfativo, em detrimento do visual e auditivo (Buffenstein, 2000).

Em relação aos padrões temporais de atividade, diferentes grupos de roedores subterrâneos apresentam variações inter e intraespecíficas no horário do dia em que estão ativos, tanto em estudos de campo como de laboratório (Jarvis, 1973; Nevo et al., 1982; Gettinger, 1984; Lovegrove et al., 1993; Benedix Jr, 1994; Ben-Shlomo et al., 1995; Lovegrove & Muir, 1996; Urrejola et al., 2005; Cutrera et al., 2006; Šklíba et al., 2007; Estevan et al., 2016; Vlasatá et al., 2017). Apesar disso, a maioria dos animais estudados em laboratório apresentou ritmo de atividade endógeno quando mantidos em condições constantes (Lovegrove et al., 1993; Ben-Shlomo et al., 1995; Lovegrove & Muir, 1996).

A principal família de roedores subterrâneos endêmicos da América do Sul é a dos Ctenomidae (tuco-tucos). Os ctenomídeos possuem distribuição geográfica ampla, desde ambientes de altas altitudes até o nível do mar, geralmente em áreas abertas de campos e matagais (Vassallo, 1998; Lacey et al., 2000). Compõem o gênero com maior número de espécies dentre os grupos de roedores subterrâneos existentes atualmente, sendo que a maioria foi descrita como solitária (Lacey et al., 2000). Grande parte da dieta dos ctenomídeos é composta de partes aéreas das plantas e, portanto, a maior parte do seu forrageamento ocorre na superfície (Busch et al., 2000). Segundo Borghi et al. (2002), o maior consumo de itens na superfície, com maior exposição a predadores, pode estar

relacionado à manutenção de olhos funcionais de tamanho moderado nos tuco-tucos, em relação aos outros roedores subterrâneos. Estudos realizados pelo nosso grupo com uma espécie de tuco-tucos do norte do deserto do Monte (*Ctenomys aff. knighti*), no noroeste da Argentina, mostraram que, em ambiente semi-natural, esses animais emergem diariamente à superfície (Tomotani et al., 2012). Os episódios de saída à superfície duram até uma hora, são dispersos ao longo do dia e há indícios de que o horário de maior frequência das saídas varia sazonalmente. Recentemente, sensores de luz (luxímetros) miniaturizados (Migrate Technology, UK) começaram a ser utilizados pelo nosso grupo, para automatizar o registro temporal da atividade dos animais na superfície (Flôres et al., 2016). Apesar da curta duração e baixo número amostral, os dados obtidos no verão e no inverno corroboraram os indícios de sazonalidade observados em Tomotani et al. (2012).

Neste projeto, propomos caracterizar de forma mais sistemática a sazonalidade observada no padrão temporal diário de emergência à superfície dos tuco-tucos *Ctenomys aff. knighti*, estendendo a duração dos registros automatizados das saídas dos animais, de modo a obter dados contínuos ao longo das estações do ano. Também daremos início à tentativa de explicar essa sazonalidade, levando em consideração que:

1. Esses tuco-tucos vivem em ambiente desértico, no qual os ciclos anuais de temperatura possuem amplitude considerável e podem, portanto, modular diretamente a atividade que os animais realizam na superfície, assim como outros fatores ambientais, como chuvas e incidência de vento (Tomotani et al., 2012);
2. Existe a possibilidade de que a sazonalidade que observamos seja melhor explicada pela existência de mecanismos endógenos sincronizados ao fotoperíodo.

Para explorar essas questões, também registramos, ao longo do ano, o ritmo diário de atividade dos tuco-tucos por meio de sensores de movimento (acelerômetros) e, simultaneamente, medimos as variações ambientais diárias de temperatura, umidade e velocidade do vento da região de estudo. Além disso, registramos o ritmo diário de atividade de animais mantidos em laboratório ao longo do ano.

Esse trabalho faz parte do projeto de estudo cronobiológico de roedores subterrâneos da espécie *Ctenomys aff. knighti* (tuco-tucos), em campo e em laboratório, que tem sido desenvolvido pelo Laboratório Binacional Argentina – Brasil de Cronobiologia, composto pela colaboração entre a Prof^ª. Gisele Oda (Depto. de Fisiologia, IBUSP) e a

Dr^a. Verónica Valentinuzzi, do *Centro Regional de Investigaciones Científicas y Transferencia Tecnológica* (CRILAR), unidade executora do *Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas* (CONICET) do Governo Argentino, localizado em Anillaco, La Rioja.

CAPÍTULO 1. RITMOS BIOLÓGICOS DE ATIVIDADE/REPOUSO

1.1. PADRÕES DIÁRIOS DE ATIVIDADE DOS ANIMAIS NA NATUREZA

A nível comportamental, na natureza, os animais geralmente apresentam ritmo de atividade/repouso de 24 horas e podem concentrar seu estado de atividade em diferentes fases do dia (Bartness & Albers, 2000). Animais que apresentam a maior parte da atividade durante a noite, como a maioria dos roedores, são denominados noturnos. Já os animais ativos majoritariamente durante o dia são diurnos. Existem, também, animais que concentram sua atividade nos horários dos crepúsculos, chamados crepusculares. Nesse caso, como existem concentrações de atividade em dois horários distintos, ao longo das 24 horas, dizemos que os animais possuem atividade bimodal, diferentemente da atividade unimodal, na qual a atividade se concentra em apenas um horário (Bartness & Albers, 2000). Há, ainda, animais que possuem vários episódios de atividade ao longo do dia. Caso esses episódios ocorram com periodicidade definida menor do que de 24h, o ritmo de atividade é considerado ultradiano. Por outro lado, se a atividade ocorre em horários aleatórios, ela é chamada arritmica ou, ainda, catemeral (do grego, *cata* significa “ao longo de” e *hemera* significa “dia”), destacando a ocorrência de episódios de atividade ao longo das 24 horas (Bartness & Albers, 2000; Tattersall, 2006).

1.2. CARACTERÍSTICAS DOS RITMOS

Classificar os estados comportamentais em fases de atividade e repouso permite estabelecer marcadores temporais e, assim, é possível definir as características dos ritmos comportamentais dos animais. Os marcadores comumente utilizados em estudos de Cronobiologia são a fase de início da atividade (*onset*), a fase do fim da atividade (*offset*), duração da fase ativa (α ou *alfa*) e duração da fase de repouso (ρ ou *rô*) (Refinetti, 2016). O período de um ritmo se refere à duração de tempo total de um ciclo completo, equivalente à soma de *alfa* e *rô* (Figura 1).

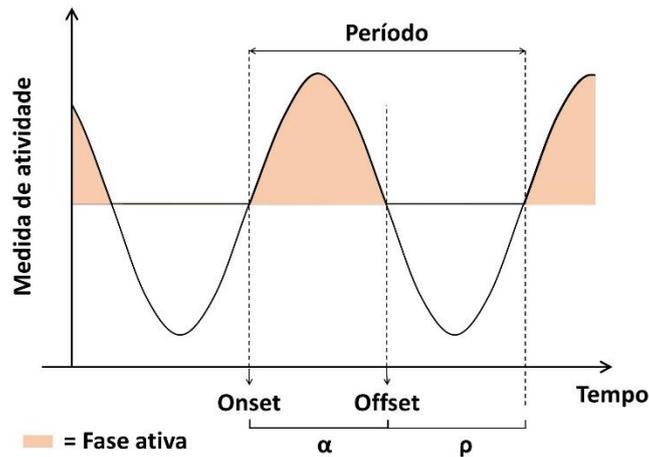


Figura 1. Série temporal de um ritmo de atividade hipotético, ilustrando os marcadores temporais e nomenclaturas utilizados no estudo dos ritmos biológicos.

Em condições constantes, quando as pistas temporais dos ciclos ambientais estão ausentes, o ritmo de atividade dos animais continua a ser expresso. Nessa situação, o ritmo é chamado *ritmo em livre-curso*. O período do ritmo em livre-curso é próximo de 24 horas e corresponde ao período intrínseco do oscilador circadiano (τ), devido ao controle que este exerce sobre a ritmicidade do comportamento do animal (Marques et al., 2003). Por esse motivo, geralmente é possível deduzir o período e fase do oscilador circadiano a partir da análise do registro do ritmo de atividade e repouso.

Para analisar as características do ritmo de atividade e repouso dos animais, utilizamos gráficos chamados de *actogramas* (Marques et al., 2003). Nesse tipo de gráfico, a variação comportamental é exibida em função do tempo, sendo que cada linha representa um dia de registro e o dia seguinte se inicia na linha abaixo do anterior (Figura 2A). Ao visualizar o registro temporal de atividade dessa forma, podemos verificar, por exemplo, se o início do ritmo de atividade ocorre no mesmo horário em dias consecutivos. Caso essa pontualidade esteja presente, é possível dizer que o ritmo observado tem período de 24 horas (Figura 2). Neste trabalho, a extensão do registro, em número de dias, será indicada por **D**. Os registros hipotéticos da figura 2, por exemplo, possuem $D = 5$ dias.

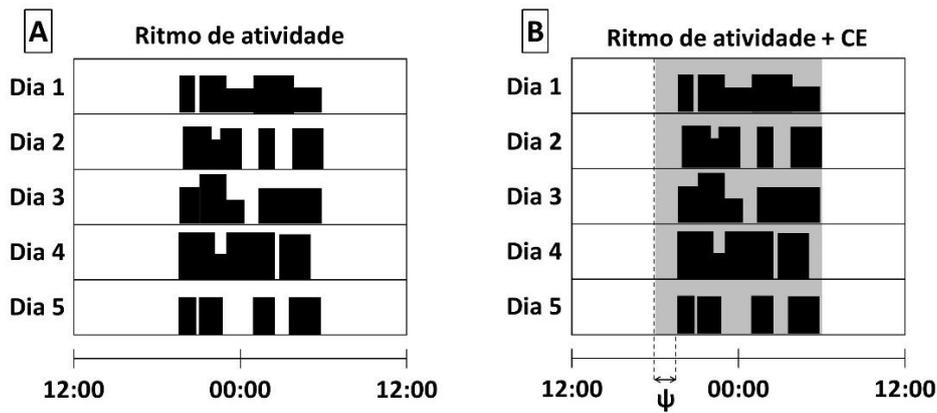


Figura 2. Representação hipotética de um ritmo de atividade na forma de actograma, sem sobreposições (A) e sobreposto ao ciclo de claro/escuro (CE) do ambiente (B). Nesse tipo de gráfico, o eixo X indica os horários do dia e cada dia é representado em uma linha horizontal. O dia sucessivo do registro é exibido abaixo do anterior. Barras pretas: ocorrência de atividade. Fundo cinza: fase de escuro do dia.

Simultaneamente ao registro do ritmo de atividade, podemos medir a intensidade de iluminação do ambiente ao longo do dia. A proporção entre a duração da fase do dia em que há luz (*fase de claro*) e a duração da fase em que não há luz (*fase de escuro*) é chamada *fotoperíodo* (Refinetti, 2016). Ao sobrepor o registro do fotoperíodo ao actograma da atividade do animal, será possível visualizar mais facilmente o intervalo de tempo entre o início da atividade e o início da fase de claro (Figura 2B). Esse intervalo de tempo é um exemplo de relação de fase (ψ) entre o ciclo de claro/escuro e o ritmo de atividade. A existência de relação de fase fixa entre o ritmo biológico e o ciclo ambiental define a ocorrência de sincronização entre os dois (Moore-Ede et al., 1982; Marques et al., 2003).

1.3. MECANISMOS DE SINCRONIZAÇÃO

A sincronização do ritmo circadiano de um organismo por um ciclo ambiental geralmente é obtida pela contribuição de dois mecanismos: *arrastamento*, associado ao ajuste do oscilador endógeno, e *mascaramento*, associado à reação do organismo a fatores exógenos.

1.3.1. ARRASTAMENTO

Informações ambientais cíclicas detectadas pelo organismo são transmitidas e processadas no oscilador circadiano, nos núcleos supraquiasmáticos. Durante os primeiros dias de exposição do animal ao ciclo ambiental diário, o período τ do oscilador se ajusta gradualmente ao período de 24 horas e a relação de fase ψ entre o ritmo biológico e o ciclo ambiental se torna estável. Esse processo de ajuste temporal do oscilador circadiano é denominado arrastamento e o ciclo ambiental capaz de arrastar o oscilador é chamado de *Zeitgeber* (Marques et al., 2003). O ajuste ocasionado pelo arrastamento é refletido no período e fase do ritmo de atividade expresso pelos animais. No ambiente natural, a presença de um mecanismo de temporização interna capaz de ser arrastado aos ciclos ambientais está associado à antecipação de desafios ambientais previsíveis.

1.3.2. MASCARAMENTO

As informações ambientais detectadas pelo organismo também são transmitidas a outras vias, nas quais não há participação do oscilador circadiano. Isso permite que o organismo possa reagir imediatamente a uma determinada condição ambiental, não necessariamente cíclica, modificando a amplitude do seu ritmo de atividade, sem resultar em ajustes temporais do oscilador (Marques et al., 2003). Esse processo é chamado de mascaramento e está presente, por exemplo, quando um animal diurno se torna inativo durante o meio do dia, como reação aguda à temperatura ambiental muito elevada, naquele momento (Bennett et al., 1984; Kenagy et al., 2002). Dessa forma, o mascaramento proporciona flexibilidade ao organismo, possibilitando reações a mudanças abruptas ou imprevisíveis no ambiente (Marques et al., 2003).

CAPÍTULO 2. LABORATÓRIO E CAMPO

2.1. EXPERIMENTOS CRONOBIOLOGICOS EM CAMPO

O estudo dos animais em seu ambiente natural nos permite compreender aspectos ecológicos e a importância adaptativa dos ritmos biológicos (Halle & Weinert, 2000; Marques & Waterhouse, 2004; Forrest & Miller-Rushing, 2010). A observação da dimensão temporal na história natural dos seres vivos é antiga, sendo que as primeiras documentações de ritmos biológicos ocorreram há séculos atrás e se focaram principalmente em eventos sazonais. As descrições sistemáticas de ritmos diários são mais raras e relativamente recentes (Forrest & Miller-Rushing, 2010; Rotenberg et al., 2003).

Para que uma amostragem do ritmo diário de atividade de determinada espécie seja informativa, do ponto de vista cronobiológico, ela deve ser feita, idealmente, durante dois ou mais dias, em intervalos de tempo múltiplos de 24 horas, a depender dos objetivos e limitações do experimento (Benedito-Silva, 2003). Em campo, a coleta dos dados de atividade pode ser realizada por diversas técnicas, que foram divididas em duas categorias, por Ropert-Coudert & Wilson (2005): observações a distância e observações feitas diretamente sobre o animal. Dentre as técnicas de observação a distância, destacam-se:

- Observações visuais diretas;
- Armadilhas do tipo "live-trap", principalmente no caso de animais noturnos;
- Detectores de passagem, em pontos fixos do habitat do animal, como na entrada de suas tocas ou túneis, no caso de diversos pequenos mamíferos (Halle & Weinert, 2000);
- Câmeras com iluminação infra-vermelha e sensibilidade a movimento.

Esses registros são realizados em pontos fixos do ambiente, o que pode não cobrir a atividade total do animal, além de requererem certo nível de esforço para a coleta de dados ao longo das 24 horas do dia. O desenvolvimento de novas tecnologias permitiu diminuir a restrição dos registros quanto à área de detecção, dando surgimento a técnicas de registros feitos diretamente sobre o animal. Dentre essas técnicas, a rádio-telemetria é

uma das mais comuns, na qual os animais são marcados com colares contendo transmissores de sinais de alta frequência e sua posição espacial deve ser amostrada manualmente, utilizando receptores desses sinais (Halle & Weinert, 2000), o que ainda demanda esforço de amostragem ao longo de 24 horas. Adicionalmente, conforme observado em Rado et al. (1993), a amostragem de atividade do animal é feita, em geral, durante poucos minutos a cada intervalo de registro (tipicamente 30 minutos ou 1 hora), o que pode não representar o comportamento realizado pelo animal na maior parte do tempo.

A técnica de *bio-logging* é uma das mais recentes empregadas para caracterização de ritmos biológicos em campo (Ropert-Coudert & Wilson, 2005; Dominoni et al., 2017). Assim como na telemetria, os registros não dependem de pontos fixos no ambiente, porém, no *bio-logging*, o aparelho aderido ao animal (chamado de *logger*) realiza as medidas de interesse automaticamente, em intervalos de tempo programados, e as armazena na memória interna do próprio dispositivo (Ropert-Coudert & Wilson, 2005). Sendo assim, essa técnica não requer esforço para realizar amostragens ao longo das 24 horas e não possui nenhuma restrição quanto à área de alcance. Por outro lado, para grande parte dos *loggers*, o acesso aos dados coletados apenas pode ser feito no final do registro. Nesse sentido, para a obtenção dos dados, os animais contendo *loggers* devem ser recapturados do campo (Ropert-Coudert & Wilson, 2005), o que constitui um desafio no estudo de presas, animais com área de vida ampla ou cujo habitat é de difícil acesso. Esse sistema também implica que o *logger* deve ser resistente às condições adversas do ambiente natural e que o tempo de registro irá depender da capacidade de armazenamento do dispositivo e da duração de sua bateria. Além disso, ao aplicar essa técnica de registro, é importante levar em consideração as perturbações causadas pelos próprios *loggers* no comportamento dos animais (Ropert-Coudert & Wilson, 2005), verificando se o peso do aparelho, o tamanho e a estratégia utilizada para aderí-lo ao animal são adequados para a espécie em estudo.

De forma geral, nos registros de campo, a análise dos ritmos de atividade coletados e a busca por possíveis associações com os ciclos ambientais se torna mais complexa, em relação aos registros de laboratório, pois a atividade dos animais é influenciada simultaneamente por diversas variáveis ambientais (Halle & Weinert, 2000; Marques & Waterhouse, 2004).

2.2. EXPERIMENTOS CRONOBIOLOGICOS EM LABORATÓRIO

A possibilidade de manipular e controlar variáveis ambientais em laboratório tornou viável investigar o funcionamento de diversos mecanismos fisiológicos associados à atividade (Halle & Weinert, 2000; Randall et al., 2002). Na área da Cronobiologia, a manipulação dos ciclos ambientais em laboratório permitiu compreender as propriedades dos osciladores circadianos (Rotenberg et al., 2003) e é uma ferramenta essencial para realizar diversos experimentos fundamentais, como os testes de *Zeitgeber* e de mascaramento. Quanto à caracterização de ritmos biológicos, o ambiente de laboratório foi o primeiro a ser utilizado para registrar padrões temporais de atividade dos animais, pela facilidade para observar comportamentos específicos e por fornecer diversas possibilidades para quantificar variáveis fisiológicas e comportamentais com precisão e automatização do registro ao longo das 24 horas (Moore-Ede et al., 1982; Halle & Weinert, 2000; Spruijt & DeVisser, 2006). As principais técnicas de registros automatizados de atividade locomotora em laboratório são (Vorhees et al., 1992; Halle & Weinert, 2000):

- Roda de atividades;
- Detectores de movimento por infra-vermelho;
- Detectores eletromecânicos ou micro-interruptores instalados em túneis, entradas, ninhos e recipientes de comida e água;
- Câmeras sensíveis a movimento.

2.3. ESTUDO DA RITMICIDADE EM TUCO-TUCOS, EM CAMPO E

LABORATÓRIO

Nosso grupo estuda a ritmicidade diária e sazonal de uma espécie de tuco-tucos (*Ctenomys aff. knighti*) das três que possivelmente habitam a província de La Rioja, no noroeste da Argentina (Valentinuzzi et al., 2009). O centro de pesquisas onde os experimentos do grupo são realizados localiza-se no povoado de Anillaco (26°48'S; 66°56'O; 1445m), onde os tuco-tucos ocorrem naturalmente. Essa localização nos permite realizar experimentos em laboratório e em campo, no habitat natural dos tuco-tucos.

Em laboratório, foram realizados estudos de caracterização do ritmo diário de atividade dos tuco-tucos, nos quais foi concluído que há ritmicidade diária robusta na atividade locomotora, atividade em roda e temperatura corporal, sendo que os animais são expressamente noturnos. Além disso, a ritmicidade persiste quando os animais são mantidos em escuro constante (Valentinuzzi et al., 2009; Tachinardi et al., 2014).

2.3.1. CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE EM CAMPO

Dentre os métodos de registro citados no item 2.1, muitos apresentam limitações para o registro da atividade de roedores subterrâneos ao longo das 24 horas. Observações visuais diretas, já realizadas pelo nosso grupo (Tomotani et al., 2012), evidenciaram que os tuco-tucos saem à superfície em episódios dispersos ao longo do dia, com duração de até 60 minutos, principalmente para forrageamento e remoção de terra dos túneis (Tomotani et al., 2012). Porém, assim como os detectores de passagem, a técnica de observação direta permite registrar a movimentação do animal apenas em pontos específicos e na superfície, sendo que os tuco-tucos realizam a maior parte de suas atividades no subterrâneo. A telemetria não possui essa desvantagem e é aplicada, inclusive, em grande parte dos estudos do padrão de atividade de roedores subterrâneos (Jarvis, 1973; Gettinger, 1984; Urrejola et al., 2005; Estevan et al., 2016; Vlasatá et al., 2017). Entretanto, as tentativas anteriores de registro da atividade dos tuco-tucos com rádio-telemetria, realizadas pelo nosso grupo (Tomotani, 2011), resultaram em amostragens imprecisas da localização dos animais (erro de 200 m²), o que impossibilitou, na época, a quantificação da movimentação de cada animal a cada hora do dia. Dessa forma, a telemetria não foi eficiente para detectar movimentos diários de curtas distâncias realizados por esses tuco-tucos no subterrâneo.

Recentemente, o método de *bio-logging* passou a ser utilizado, primeiramente com o uso de *loggers* detectores de luz miniaturizados, da Migrate Technology, UK (serão referidos neste trabalho como *luxímetros*), para caracterizar o padrão temporal diário de exposição à luz dos tuco-tucos (Flôres et al., 2016). Os luxímetros foram compatíveis com o tamanho dos tuco-tucos, apresentaram alta resistência ao ambiente subterrâneo e alta capacidade de armazenamento de dados (dimensões 15 x 6 x 6 mm; peso 0.65g; capacidade de 2 anos de registro de iluminância a cada 5 minutos). Por outro lado, como

a taxa de recaptura dos tuco-tucos em campo é baixa, houve a necessidade de manter os animais em arenas semi-naturais para aumentar a chance de recuperação dos *loggers*.

Os momentos em que os tuco-tucos se expõem à luz coincidem temporalmente com os momentos em que eles emergem à superfície (*atividade de superfície*). Dessa forma, o registro do luxímetro também fornece o padrão temporal de atividade de superfície dos tuco-tucos, durante os horários do dia em que há luz solar. Neste projeto, com a intenção de caracterizar o ritmo de atividade dos tuco-tucos nas arenas semi-naturais, utilizamos, além dos luxímetros, *loggers* detectores de movimento (*acelerômetros*), que registram a aceleração dos animais nas três dimensões espaciais (Technosmart, Itália). Portanto, com os acelerômetros, obtivemos o registro de *atividade geral* dos tuco-tucos, que abrange a atividade de superfície e a do subterrâneo. Pelo seu nível de precisão, amostragem automática de alta frequência (de 1 a 25 Hz) e independência de pontos fixos no ambiente, o acelerômetro é mais informativo em relação aos métodos apresentados anteriormente (Collins et al., 2015; Dominoni et al., 2017) e se mostrou mais adequado para o registro da atividade dos tuco-tucos.

2.3.2. RITMOS DIÁRIOS E SAZONAIS EM CAMPO E LABORATÓRIO

Em diferentes grupos de mamíferos e aves foi observado que o padrão temporal diário de atividade dos animais se modifica ao longo do ano, acompanhando as variações de fotoperíodo. No verão, quando os dias são mais longos, a duração da atividade diária (*alfa*) dos animais diurnos é maior e, no inverno, quando os dias são mais curtos, o *alfa* é menor. O contrário ocorre com o *alfa* dos animais noturnos, que é menor no verão e maior no inverno (Daan & Aschoff, 1975).

Diversas hipóteses foram propostas para explicar essas variações anuais. Dentre aquelas com enfoque nos fatores endógenos, foi proposto que as variações de *alfa* são devidas aos diferentes padrões de arrastamento (definido em 1.3.1) do oscilador circadiano por diferentes fotoperíodos ao longo do ano (Daan & Aschoff, 1975; Elliott, 1976). Outras com enfoque nos fatores exógenos, propõem a ocorrência de mascaramento da atividade dos animais (definido em 1.3.2) ao longo do ano por determinadas condições ambientais importantes no contexto de cada espécie, como, por exemplo, as mudanças sazonais de temperatura ambiental para pequenos roedores de ambientes desérticos ou do Ártico (Chappell & Bartholomew, 1981b; Kenagy et al., 2002; Long et al., 2005).

Para os tuco-tucos *Ctenomys aff. knighti*, obtivemos evidências de variação sazonal da atividade de superfície diária, a nível individual, provenientes de observações visuais diretas (Tomotani et al., 2012) e de dados do luxímetro, obtidos na minha iniciação científica (Figura 3). Essa variação não se limitou apenas à duração da atividade. No verão, os animais apresentaram atividade de superfície bimodal, ocorrendo em horários próximos aos crepúsculos e, no inverno, atividade unimodal, com maior frequência no meio do dia.

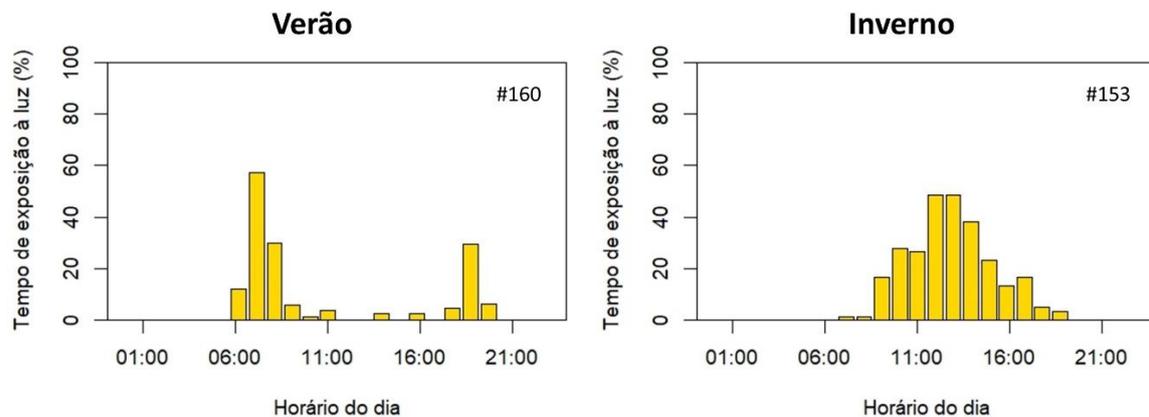


Figura 3. Sazonalidade dos padrões diários de exposição à luz (atividade de superfície) de tuco-tucos mantidos em arenas semi-naturais durante as estações de verão e inverno de 2015. Cada gráfico exhibe dados do registro de 7 dias de um indivíduo. Barras amarelas: média da porcentagem de tempo por hora em que os tuco-tucos permaneceram na superfície.

A sazonalidade que observamos se assemelha àquela obtida para os coruros (Octodontidae) e roedores epígeos (Chappell & Bartholomew, 1981b; Kenagy et al., 2002; Rezende et al., 2003; Long et al., 2005). Nesses trabalhos, foi proposto que os níveis de atividade constituíam reações diretas à temperatura ambiental e, portanto, as variações sazonais se deviam ao mascaramento. No verão, a atividade crepuscular seria resultante da inibição da atividade nas altas temperaturas do meio dia e o contrário ocorreria no inverno, quando os animais concentravam sua atividade em temperaturas mais amenas do meio do dia. Adicionalmente, considerando o contexto ambiental dos tuco-tucos *Ctenomys aff. knighti*, habitantes do subterrâneo e do deserto, há outras variáveis ambientais que, potencialmente, podem alterar o horário das saídas à superfície por mascaramento, como a ocorrência de chuvas e incidência de vento (Tomotani et al., 2012).

Por outro lado, a variação sazonal da atividade de superfície dos tuco-tucos também é condizente com os dados apresentados em Daan & Aschoff (1975), nos quais a variação do *alfa* ao longo do ano corroborava a existência de mecanismos endógenos responsivos ao fotoperíodo. Sabendo que o ritmo de atividade dos tuco-tucos em laboratório é capaz de se arrastar ao ciclo claro/escuro e até a padrões irregulares de exposição à luz (Flôres et al., 2016), existe a possibilidade de que a sazonalidade observada seja resultante de arrastamento diferenciado do oscilador circadiano ao ciclo claro/escuro de fotoperíodos diferentes em cada época do ano. Como primeiro passo para compreender a variação sazonal da atividade de superfície dos tuco-tucos, verificaremos a relação dessa sazonalidade com as variações ambientais, dando maior ênfase à temperatura. Nesse sentido, também pretendemos verificar a ocorrência de sazonalidade da atividade em roda dos tuco-tucos em laboratório, onde estarão expostos ao fotoperíodo natural e a temperatura ambiental será mantida constante.

2.4. CARACTERIZAÇÃO DE VARIÁVEIS AMBIENTAIS EM LABORATÓRIO E CAMPO

Ao associarmos determinado processo fisiológico a uma variável ambiental como a temperatura do ar (T_a), por exemplo, estamos assumindo que a T_a medida corresponde àquela percebida pelo organismo em seu microambiente. Em um laboratório fechado, sem janelas que produzam iluminação heterogênea e sem correntes de ar, um termômetro em equilíbrio térmico com o ambiente indicará o mesmo valor de T_a , independente de sua localização. Então, nesse caso, considerações sobre o microambiente do animal não terão grande impacto na análise da associação entre a variável biológica e a ambiental. Já em um experimento de campo, a localização do termômetro (sob o sol ou sombra, local mais ou menos ventilado) poderá alterar em grandes proporções a medida de temperatura ambiental e, então, ao definir qual T_a o organismo está percebendo, é necessário levar em conta as propriedades da troca de calor entre o animal e o ambiente.

Os processos pelos quais ocorre troca de calor são denominados (Randall et al., 2002):

- *condução*, que consiste na transferência de energia cinética entre dois corpos em contato, sendo que o fluxo de calor ocorre do objeto mais quente para o mais frio;

- *evaporação*, em que a dissipação de calor ocorre por meio da passagem de um líquido para o estado gasoso;
- *convecção*, na qual um fluido em movimento intermedia a transferência de calor;
- *radiação*, em que as ondas eletromagnéticas transportam energia térmica do objeto mais quente para o mais frio, independente do contato direto entre objetos.

Dentre diversos fatores comportamentais e fisiológicos, as características físicas da pelagem dos animais podem alterar de forma importante a taxa de troca de calor por convecção e radiação. O movimento de ar causado pelo vento mantém o fluxo de calor entre a pele e o ar e, como consequência, acelera a dissipação/ganho de energia térmica do animal. A presença de pelos ou penas diminui a velocidade do vento que chega próximo à pele e, então, cria barreiras que atenuam o efeito da convecção (Chappell, 1980; Schmidt-Nielsen, 1997). A radiação emitida pelo sol ocorre nos comprimentos de onda da faixa da luz visível e a eficiência de um objeto para absorver a radiação solar depende da sua cor e área de superfície exposta. Pelagens mais escuras absorvem radiação solar mais eficientemente (Schmidt-Nielsen, 1997).

Um dos métodos para obter uma medida de T_a mais próxima daquela percebida pelo animal é calcular a ***temperatura operativa*** desse animal em determinado ambiente. A temperatura operativa é aplicada a estudos ecofisiológicos como um índice que mede o ganho de energia térmica do animal, levando em consideração os processos de convecção e radiação que ocorrem entre o animal e seu ambiente natural (Bakken, 1980). Isso permitiu utilizar esse índice para estabelecer comparações entre as condições termais de campo e as de laboratório (Bakken, 1980). A fórmula utilizada para calcular a temperatura operativa inclui uma variável que é medida em campo: a temperatura no interior de um modelo de metal, com a mesma dimensão e forma do animal em estudo, coberto com sua pelagem e exposto ao ambiente de interesse (Chappell & Bartholomew, 1981a; Bakken et al., 1985). Existe grande diferença entre essa medida e a T_a amostrada dentro de um protetor contra radiação. Obtivemos, por exemplo, o registro da temperatura corporal de um tuco-tuco morto (T_m) na superfície de uma arena semi-natural, exposto ao sol e o comparamos com a T_a desta mesma área. Ao longo do dia, com o ciclo diário de intensidade de iluminação solar e de temperatura, se torna evidente a maior amplitude da variação da T_m em relação à da T_a (Figura 4). Quando o animal está vivo, seu ganho de calor ao se expor ao sol, na superfície, será melhor estimado observando T_m do que observando a T_a deste ambiente.

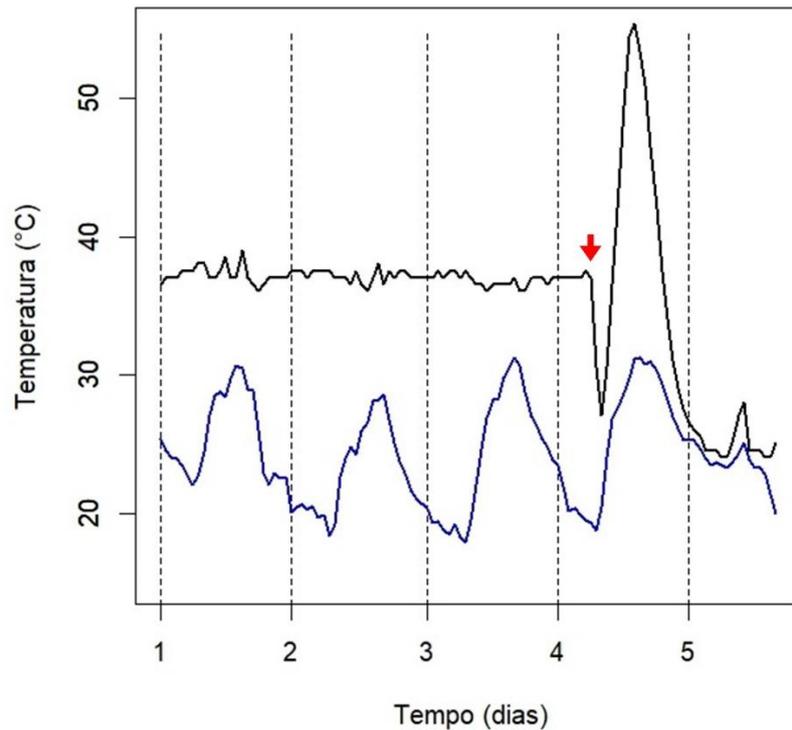


Figura 4. Temperatura corporal do tuco-tuco #201 antes e depois de morto na superfície de uma arena semi-natural. A temperatura foi medida por meio de um *logger* (iButton, Maxim Integrated, USA) implantado intraperitonealmente. O registro da temperatura do animal (linha preta) foi comparado à temperatura do ar, medida no interior de um protetor contra radiação, a 2m do solo (linha azul). Seta vermelha: momento estimado da morte do animal. Enquanto vivo, este animal endotérmico manteve ritmicidade diária de amplitude reduzida.

2.5. OBJETIVOS DESTE PROJETO

- Caracterização do ritmo diário de atividade/repouso dos tuco-tucos em ambiente semi-natural, ao longo do ano, utilizando sensores miniaturizados para discriminar atividade geral e de superfície;
- Verificação sistemática de sazonalidade na atividade geral e de superfície dos tuco-tucos;
- Verificação do grau de mascaramento da atividade de superfície dos tuco-tucos por variáveis ambientais, em especial a temperatura ambiental;
- Verificação de sazonalidade no ritmo diário de atividade em roda de tuco-tucos mantidos em laboratório, sob fotoperíodo natural e temperatura constante.

CAPÍTULO 3. EXPERIMENTOS

3.1. POPULAÇÃO DE ESTUDO, CAPTURAS E MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS

A região onde ocorrem os tuco-tucos da espécie *Ctenomys aff. knighti* está inserida no norte do deserto do Monte, cujo clima é semi-árido a árido. A média anual de temperatura nesse deserto é próxima de 17°C, sendo que a amplitude térmica diária alcança 15°C durante a maior parte do ano, evidenciando a característica continental do clima dessa região (Labraga & Villalba, 2009). A média anual de precipitação está entre 100 e 450mm. As chuvas estão geralmente limitadas ao verão e a época de seca pode durar mais de sete meses (Abraham et al., 2009). Os solos são arenosos e a vegetação predominante deste bioma é um estepe arbustivo, caracterizado por plantas das famílias Zygophyllaceae, Fabaceae e Cactaceae (Fracchia et al., 2011; Aranda-Rickert, 2014). Dentro do povoado de Anillaco, 47 tuco-tucos (*Ctenomys aff. knighti*) adultos (160g ± 53g, 24 fêmeas e 23 machos) foram capturados ao longo de 2016 e 2017, por meio de armadilhas de PVC (Tomotani et al., 2012) enterradas na entrada de suas tocas. Os animais capturados foram levados para o laboratório, no *Centro Regional de Investigaciones Científicas y Transferencia Tecnológica (CRILAR)*, localizado no mesmo povoado. No biotério, os tuco-tucos foram pesados, sexados e colocados em gaiolas de acrílico (53×29×27 cm). Os indivíduos foram identificados por microchips injetados subcutaneamente (Capri, Tecnologia Allflex®, Brasil). As gaiolas foram mantidas em um ambiente com temperatura de 22 ± 1°C, iluminação natural, por meio da janela do laboratório, e sujeito a ruídos mínimos. Os animais foram alimentados diariamente em horários variados. A alimentação foi composta de cenoura, batata-doce, aveia, semente de girassol, ração para roedores e verduras. Assim como diversos pequenos mamíferos, os tuco-tucos não bebem água (Buffenstein, 2000).

Dos tuco-tucos capturados, 29 (165g ± 58g; 15 fêmeas e 14 machos) foram alocados para o experimento nas arenas semi-naturais, onde registramos o ritmo de *atividade de superfície* e *atividade geral* dos animais. Os 18 tuco-tucos restantes (152g ± 42g; 9 fêmeas e 9 machos) permaneceram no biotério, expostos ao fotoperíodo natural, para registro do ritmo de atividade em roda.

Todos os procedimentos deste trabalho seguiram as normas do *American Society of Mammalogists for animal care and handling* (Sikes & Gannon, 2011), foram aprovados pela CEUA do Instituto de Biociências – USP (nº 273/2016) e autorizados pela Dirección General de Ambiente y Desarrollo Sustentable – Secretaría de Ambiente del Ministerio de Producción u Desarrollo Local, La Rioja, Argentina (nº 028/2010 e 062/2008).

3.2. ARENAS: RITMO DE ATIVIDADE EM AMBIENTE SEMI-NATURAL

3.2.1. ARENAS SEMI-NATURAIS

As três arenas semi-naturais utilizadas foram construídas em uma área com vegetação nativa, naturalmente habitada por tuco-tucos, e são delimitadas por telas de arame, acima da superfície, e por barreiras de concreto, abaixo do solo (Figura 5). Cada arena abriga um animal por vez. Na arena 3, que possui menor tempo de uso e maior espaço disponível para novos túneis, foram mantidos até dois animais simultaneamente, desde que apresentassem boa convivência (♀♀ ou ♀♂). A alimentação dos animais nas arenas foi composta da vegetação natural presente nesta área.

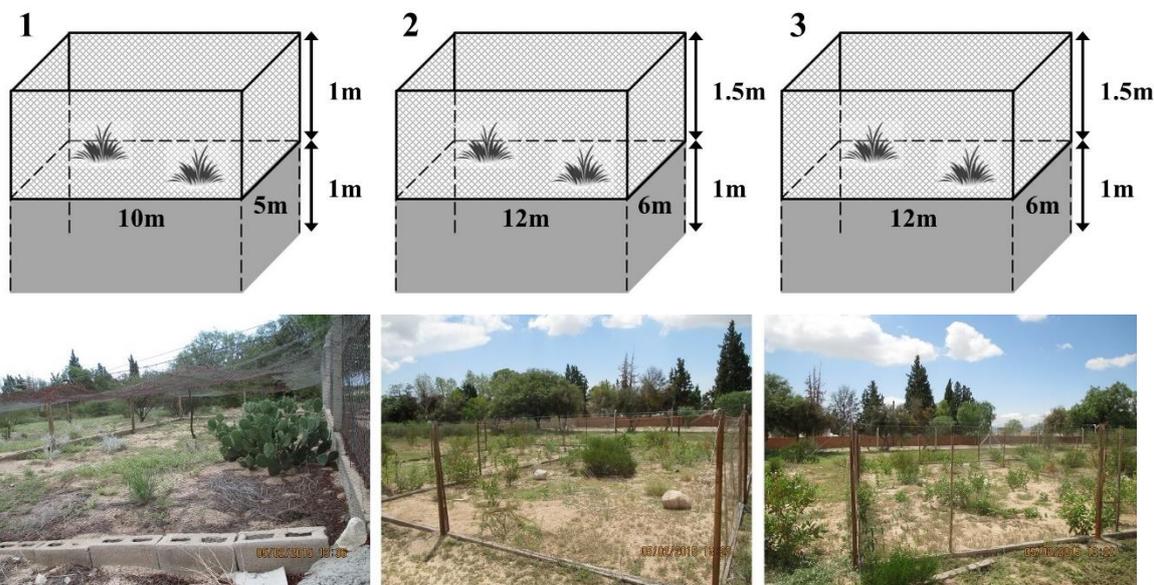


Figura 5. Visão geral das arenas semi-naturais construídas dentro do terreno do CRILAR, Anillaco, La Rioja, Argentina. As dimensões de cada arena estão especificadas acima das fotos. Todas são delimitadas até 1m abaixo do solo por barreiras de concreto.

3.2.2. VARIÁVEIS AMBIENTAIS

A estação meteorológica (HOBO®, empresa Onset, USA), localizada a 1m da arena 2, com altura aproximada de 2m, forneceu o registro contínuo de temperatura do ar, umidade relativa do ar e velocidade do vento, com intervalo de registro de uma hora. Os sensores de temperatura e umidade relativa do ar foram colocados dentro de um protetor contra radiação solar. Também foram registradas a temperatura a 20, 40 e 60 cm abaixo do solo e a temperatura operativa, na superfície, a cada hora. Para essas últimas medidas foram utilizados sensores do tipo *logger* (HOBO®, empresa Onset, USA). De forma similar ao descrito em Bennett et al. (1984) e Kenagy et al. (2002), a temperatura operativa foi medida por um sensor de temperatura encapado com cobre e inserido dentro de um animal taxidermizado, preenchido com algodão (“manequim”). Durante o registro, o manequim foi mantido na superfície, em uma área exposta à luz do sol e cercada por telas de arame, para proteção contra predadores. Obtivemos informações sobre os dias de solstício e equinócio e sobre a variação anual de fotoperíodo em La Rioja a partir de dados disponíveis *on-line* (Time and Date AS, Noruega. <https://www.timeanddate.com>). As estações do ano foram definidas com base nos dias de solstício e equinócio, da seguinte forma:

- Verão: do dia 21/12 ao 19/03;
- Outono: do dia 20/03 ao 20/06;
- Inverno: do dia 21/06 ao 21/09;
- Primavera: do dia 22/09 ao 20/12.

3.2.3. MEDIÇÕES DO RITMO DE ATIVIDADE DOS ANIMAIS

No experimento realizado nas arenas semi-naturais, utilizamos dois *loggers* para registrar a *atividade de superfície* e a *atividade geral* dos tuco-tucos. A sobreposição dos dados dos *loggers* também permitiu deduzirmos o componente da atividade que os tuco-tucos realizam no subterrâneo.

O registro do ritmo diário de *atividade de superfície* dos tuco-tucos foi feito por luxímetro com dimensões 15 x 6 x 6 mm e peso 0.65g (W65, Migrate Technology, UK). *Loggers* já ativados foram presos no dorso dos tuco-tucos por meio de um colar feito com uma abraçadeira de nylon envolta em silicone, para menor incômodo do animal (Figura 6). O

registro da intensidade luminosa foi feito a cada 5 minutos, com sensibilidade para valores entre 1 e 19000 lux.

Além da *atividade de superfície*, utilizamos acelerômetros, com dimensões 23 x 12 x 10 mm e peso 2g (Axy-3, TechnoSmart, Itália), para registrar o ritmo diário de *atividade geral* dos tuco-tucos nas arenas semi-naturais. Para isso, os *loggers* foram afixados nos colares dos animais, da mesma forma que os luxímetros (Figura 6), e posteriormente foram ativados por um interruptor magnético. O acelerômetro registrou um valor de aceleração a cada segundo, para cada um dos três eixos (XYZ) de movimentação.

Por ser a primeira vez, no nosso grupo, que utilizamos acelerômetros para medir a atividade dos animais em ambiente semi-natural, foram realizados testes preliminares de curta duração, antes da adoção definitiva deste *logger* no experimento das arenas. Além disso, animais com acelerômetros sempre permaneceram em observação, no laboratório, pelo menos durante as 24 horas anteriores à liberação nas arenas semi-naturais. Em laboratório, verificamos que os animais não demonstravam sinais de desconforto provocados pelo *logger* e que eram capazes de realizar suas atividades da mesma forma que os animais sem *logger*.



Figura 6. Estratégia utilizada para fixar os *loggers* aos tuco-tucos. Esquerda: exemplo de colar montado, protegido por tubo de silicone e contendo luxímetro (parte superior) e acelerômetro (parte inferior). Centro: detalhe do pescoço de um animal com colar contendo luxímetro (região dorsal) e acelerômetro (região ventral). Direita: animal na gaiola com colar.

3.2.4. PROTOCOLO INICIAL

O nosso plano original consistia do seguinte cronograma de uso das arenas (Figura 7): no início de 2016, 4 animais seriam liberados com luxímetro nas arenas semi-naturais, onde permaneceriam por um ano. Ainda no verão, mais 3 animais seriam liberados com

acelerômetro por aproximadamente 10 dias (Figura 7), com o objetivo de avaliar a técnica utilizada para prender o *logger* ao colar dos animais e as condições de sobrevivência do animal com *logger*, checando se havia perda de peso igual ou maior que 20% do peso anterior à liberação, o que indicaria condição não-permissiva (Sikes & Gannon, 2011). Em 2017, mais 6 animais seriam liberados durante as estações de verão e inverno, para aumentar o número amostral dos registros. Após a recaptura, os animais seriam alocados para o biotério e disponibilizados para outros experimentos do grupo. O colar contendo os *loggers* seria retirado e os dados, descarregados.

2016 - 2017	Arena 1	Arena 2	Arena 3
Janeiro			
Fevereiro	1	2	3
Março	4	5	6
Abril			
Maio			
Junho			
Julho			
Agosto			
Setembro			
Outubro			
Novembro			
Dezembro			
Janeiro	8	9	10
Fevereiro	11	12	13
Março			
Abril			
Maio			
Junho			
Julho	14	15	16
	17	18	19
Agosto			
Setembro			
Outubro			
Novembro			
Dezembro			

Figura 7. Planejamento inicial das liberações de tuco-tucos nas arenas semi-naturais ao longo dos anos de 2016 e 2017. O tempo planejado de permanência de cada indivíduo, em cada arena, está representado pela extensão dos retângulos em vermelho.

3.3. LABORATÓRIO: MEDIDA DO RITMO DIÁRIO DE ATIVIDADE EM RODA

Simultaneamente ao experimento em arena semi-natural, registramos, durante um ano, o ritmo diário de atividade em roda de tuco-tucos mantidos em laboratório. Conforme descrito na seção 3.1, os animais foram mantidos individualmente em gaiolas de acrílico (53 x 29 x 27 cm), em um ambiente exposto ao fotoperíodo natural, com temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$ e sujeito a ruídos mínimos. A alimentação, composta de cenoura, batata-doce, aveia, semente de girassol, ração para roedores e verduras, foi fornecida diariamente em horários variados. As gaiolas foram equipadas com roda de atividades, de diâmetro 23cm, largura 10cm e 1 cm de espaçamento entre as barras. Os registros da roda foram armazenados diretamente em computador, a cada 5 minutos, por meio do ArChron Data Acquisition System (Simonetta System, Universidad Nacional de Quilmes, Buenos Aires).

3.4. ANÁLISES GERAIS

Inicialmente, calculamos a porcentagem de recapturas obtidas no total, em cada ano e em cada semestre dos anos de 2016 e 2017. Os registros do luxímetro, obtidos a cada 5 minutos, foram classificados em saídas ou não-saídas dos animais à superfície, considerando que valores maiores que 2 lux corresponderam a saídas. Este limiar foi estabelecido com base na sensibilidade dos aparelhos. Com os dados obtidos pelo acelerômetro, nos três eixos de movimentação (XYZ), foi calculada a *Overall Dynamic Body Acceleration* (ODBA) de cada animal de acordo com o método empregado em Williams et al. (2016). Para cada eixo, a média móvel dos registros foi calculada, utilizando uma janela de 10 segundos, e foi descontada dos valores brutos. Os valores resultantes para X, Y e Z, em módulo, foram somados, resultando na ODBA. Episódios de atividade de determinado animal foram definidos, a cada 5 minutos, como valores de ODBA acima da média aritmética de todos os valores obtidos para este animal.

As saídas à superfície foram visualizadas em forma de actogramas, confeccionados por meio do programa El Temps (A. Díez-Noguera, Universitat de Barcelona, 1999), para acompanhar a variação da distribuição temporal dos episódios de saídas ao longo do ano. Os registros de atividade também foram apresentados em actogramas, sobrepostos às

saídas à superfície, para avaliarmos qualitativamente a associação temporal entre essas duas variáveis.

Calculamos a porcentagem de tempo, em relação às 24 horas do dia, em que os animais apresentaram episódios de atividade geral (“atividade” vs “repouso”). Do total da atividade de cada dia, calculamos a porcentagem de atividade diurna (“diurna” vs “noturna”) (Figura 8), levando em consideração a mudança do fotoperíodo ao longo do ano. Para isso, utilizamos a seguinte fórmula da porcentagem de atividade diurna (P), modificada de Halle & Weinert (2000):

$$P = \frac{\frac{\sum c_L}{h_L}}{\frac{\sum c_L}{h_L} + \frac{\sum c_D}{h_D}},$$

onde $\sum c_L$ e $\sum c_D$ são a soma dos registros de atividade obtidos durante o dia e durante a noite, respectivamente, e h_L e h_D são o comprimento do dia e da noite.

Como observado acima, o luxímetro detecta episódios de saídas dos animais apenas durante a fase de claridade do dia, até os horários de crepúsculo civil. Sendo assim, para cada dia, também calculamos a porcentagem da atividade diurna que ocorreu na superfície (“superfície” vs “subterrâneo”). A média de todas as porcentagens diárias foi calculada para cada animal e, a partir dessas, obtivemos a média de cada estação.

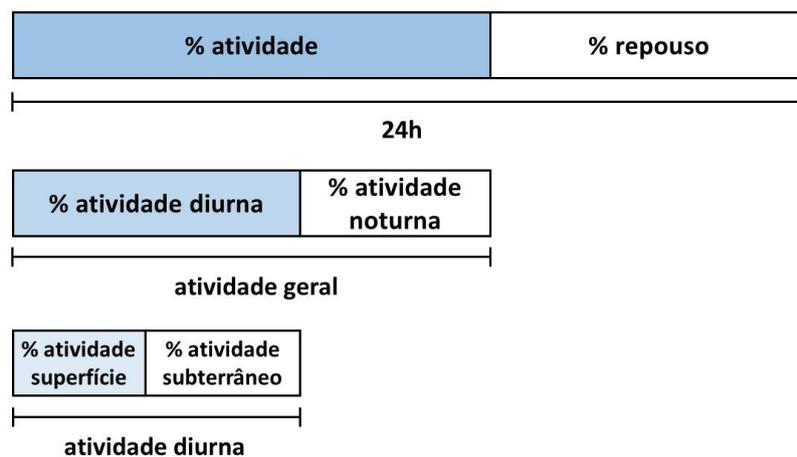


Figura 8. Ilustração do cálculo das porcentagens de atividade realizada pelos tuco-tucos durante o experimento nas arenas semi-naturais, em 2016 e 2017.

Para verificar a ocorrência de variação sazonal no ritmo diário de atividade em roda, em laboratório, e *atividade geral*, nas arenas, foi feita uma análise de variância de Welch

(*Welch's ANOVA*) do horário de início (*onset*), fim (*offset*) e da duração (*alfa*) da atividade diária dos animais nas quatro estações do ano. A estimativa do *onset* foi adaptada de Hut et al. (1999), após o teste de outros métodos buscados na literatura (Suplementos S.1). Calculamos a média móvel dos valores de atividade de cada dia, utilizando uma janela de 6 horas. O primeiro valor da média móvel a ultrapassar a média aritmética dos valores do dia corresponde ao *onset*. Já o *offset* foi estimado como sendo o último valor da média móvel que ultrapassa a média aritmética dos valores do dia. O *alfa* da atividade corresponde à diferença de tempo entre o *offset* e o *onset*. Para comparar os dados das estações, par a par, foi realizado o teste t de Welch.

3.5. ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA AMBIENTAL SOBRE O RITMO DE ATIVIDADE DE SUPERFÍCIE NAS ARENAS SEMI-NATURAIS

Com a informação das condições ambientais no entorno das arenas, pudemos fazer análises estatísticas relacionando a *atividade de superfície* dos tuco-tucos com a temperatura ambiental. Nos cálculos a seguir, demos enfoque à temperatura operativa, por ser mais sensível e mais relevante para o ambiente térmico dos animais, na superfície (Kenagy et al., 2002), e à temperatura medida a 20 cm abaixo do solo, por apresentar maior amplitude de variação ao longo do dia do que as medidas a 40 e 60cm. Para aumentar a amostragem e melhor observar as tendências gerais, também foram incluídos, nos gráficos e análises da seção 4.4, os dados de *atividade de superfície* dos tuco-tucos nas arenas coletados em 2015 (verão: n=6, D=7; inverno: n=6, D=7), durante minha iniciação científica.

Foi calculada a média da quantidade de registros de superfície a cada hora do dia, em cada estação do ano. Para isso, das 12 linhas de dados do luxímetro obtidas a cada hora, contabilizamos quantas possuíam valor acima de 2 lux e transformamos essa quantidade em porcentagem por hora. Para os registros de cada animal (D = 7 a 30 dias), obtivemos, para cada uma das 24 horas do dia, as médias de tempo na superfície. No gráfico final de cada estação, exibimos a média das curvas dos animais (verão: n=14; outono: n=6; inverno: n=9; primavera: n=2). Calculamos também a média de tempo na superfície para cada faixa de temperatura operativa e para cada faixa de temperatura no subterrâneo (a 20 cm abaixo do solo). Nesses casos, associamos um valor de temperatura (operativa ou

a 20 cm abaixo do solo), coletado a cada hora, com a quantidade de registros de superfície obtida naquela hora. Calculamos, para cada animal ($D = 7$ a 30 dias), as porcentagens médias de registros na superfície, em cada faixa de temperatura. No gráfico final, exibimos a média das curvas dos animais (verão: $n=9$; outono: $n=6$; inverno: $n=8$; primavera: $n=2$). Todos os registros obtidos à noite foram excluídos desses cálculos, uma vez que o luxímetro não nos permite detectar saídas dos animais à superfície quando não há luz solar.

Para observar o efeito simultâneo do horário do dia e das temperaturas operativa ou no subterrâneo sobre o tempo gasto na superfície, também foi calculada, para cada animal, a porcentagem média do tempo na superfície a cada hora e faixa de temperatura, resultando em uma matriz. Para cada estação, exibimos a média das matrizes dos animais (verão: $n=9$; outono: $n=6$; inverno: $n=8$; primavera: $n=2$).

Como uma tentativa de avaliar o grau de mascaramento exercido pelas variações ambientais no tempo que os animais permaneceram na superfície, realizamos uma Análise de Regressão Múltipla *Stepwise*, baseada em Long et al. (2005), com modificações. Nessa análise, a variável dependente utilizada foi a porcentagem de tempo na superfície por hora e as seguintes variáveis independentes foram incluídas:

- horário do dia (*hora*);
- temperatura operativa (*tempop*);
- temperatura no subterrâneo (*tempsub*);
- número de identificação dos animais aleatorizado (*ID*);
- umidade relativa do ar (*hr*);
- velocidade do vento (*vvento*);
- interação entre horário do dia e temperatura operativa (*hora:tempop*);
- interação entre horário do dia e temperatura no subterrâneo (*hora:tempsub*).

Considerações sobre as variáveis incluídas na análise, modificações posteriores e os resultados obtidos foram detalhados em Suplementos S.2. Os modelos de regressão múltipla foram ajustados para os dados de cada estação, separadamente. Possíveis correlações lineares entre as variáveis independentes foram verificadas por meio de matrizes de correlação (considerando correlações significativas quando $|r| \geq 0.5$). Para cada estação, o modelo final foi escolhido com base no valor do Critério de Informação de Akaike (AIC) e na ausência de variáveis independentes correlacionadas.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS E ANÁLISES

4.1. RECAPTURAS

Devido às ocorrências de fuga, mortes e predação dos animais, o tempo de permanência nas arenas foi sendo ajustado ao longo do projeto, de forma que o protocolo inicial sofreu modificações, incluindo registros com diferentes durações de tempo (Figura 9). Do total de 29 animais liberados nas arenas, em 2016 e 2017, 5 foram liberados duas vezes, devido à indisponibilidade de indivíduos em determinadas épocas de registro (Figura 9). No início de 2017, definimos que 30 dias de registro ($D = 30$) eram suficientes para os objetivos de aumentar o sucesso de recaptura dos indivíduos e, ao mesmo tempo, obter registros mais longos do que os anteriores (D máximo = 10). Em 2017, também instalamos tetos de nylon nas arenas 2 e 3, com a intenção de impedir a predação dos tuco-tucos por aves, que é frequente dentro do gênero *Ctenomys* sp. (Vassallo et al., 1994). Apesar disso, tanto em 2016 como em 2017, obtivemos menores taxas de recaptura no segundo semestre (Figura 10), ainda que a porcentagem total de recapturas em 2017 tenha sido maior do que em 2016.

2016 - 2017	Tuco-tucos mantidos nas arenas		
	Arena 1	Arena 2	Arena 3
Janeiro			#199 ♀
Fevereiro	#194 ♀	#201 ♂ †	#198 ♂
Março	#193 ♀	#203 ♀	#202 ♂
Abril			#198 ♂ #205 ♀
Maio			
Junho			
Julho	#208 ♀ †		
Agosto	#214 ♀	#222 ♀ #221 ♀	#218 ♂
Setembro			#215 ♂ #221 ♀
Outubro	#216 ♂		
Novembro			
Dezembro			
Janeiro			
Fevereiro	#237 ♀	#238 ♀	#220 ♀
Março	#230 ♀	#249 ♂	#222 ♀
Abril		#245 ♂	#220 ♀
Maio			
Junho		#235 ♂	#238 ♀
Julho		#250 ♂	#251 ♂
Agosto		#239 ♂	#244 ♀
Setembro			
Outubro	#261 ♂	#255 ♀ †	#262 ♂
Novembro			
Dezembro			

Figura 9. Calendário das liberações e recapturas de animais nas arenas semi-naturais durante os anos de 2016 e 2017. O tempo de permanência de cada indivíduo (indicado pelo número de

identificação e sexo) está representado pela extensão dos retângulos. Retângulos vermelhos: animais recapturados; retângulos azuis: animais não recapturados. O símbolo † indica animais encontrados mortos.

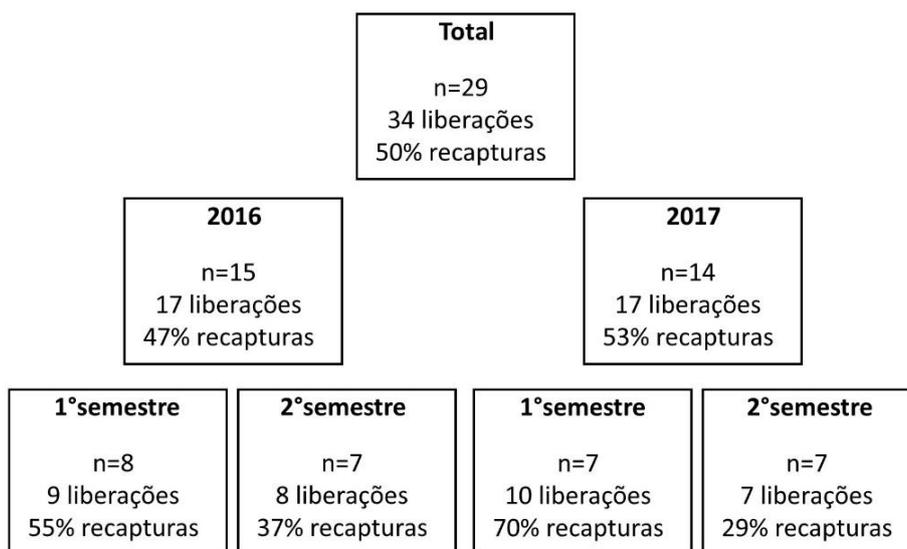


Figura 10. Liberações e porcentagem de recapturas bem sucedidas, realizadas durante os anos de 2016 e 2017.

4.2. DADOS AMBIENTAIS COLETADOS

As variáveis medidas pela estação meteorológica, assim como as temperaturas a 20, 40 e 60 cm abaixo do solo foram registradas ininterruptamente durante 2016 e 2017. No geral, o ano de 2017 foi mais quente que 2016, tanto em relação à média anual quanto às médias estacionais (Tabela I). A amplitude térmica diária da temperatura do ar também foi maior em 2017, porém a das temperaturas medidas abaixo do solo não sofreu alterações (Tabela II). O registro de temperatura operativa foi descontínuo, devido às tentativas de predação do manequim e à degradação do couro, que exigiram a troca de manequim a cada semestre. Por esse motivo, as médias anuais e estacionais dessa variável não foram calculadas. Apesar disso, sua variação diária média foi comparada à das outras medidas de temperatura (Figura 11). A temperatura operativa foi a medida que apresentou maior amplitude de variação, sendo que o valor máximo foi 62.8°C, às 14:30, obtido em novembro de 2017, e o valor mínimo, -11.8°C, às 8:00, obtido em julho de 2017 (dados não exibidos). Na figura 11, também é possível notar que os menores valores da temperatura a 20cm abaixo do solo ocorrem no meio do dia. Em La Rioja, a duração do

dia é de 10 horas e 15 minutos no solstício de inverno e de 14 horas e 2 minutos no solstício de verão (Time and Date AS, Noruega. <https://www.timeanddate.com>).

Tabela I. Médias anuais e estacionais das medidas ambientais obtidas nos anos de 2016 e 2017

2016	Temperaturas (°C)				Umidade Relativa (%)	Vento (m/s)
	Ar	20 cm	40 cm	60 cm		
Anual	16.6	22.1	22.1	22.0	60.1	3.2
Verão	23.3	29.7	29.4	28.7	62.0	3.7
Outono	12.3	17.7	18.8	19.5	72.3	2.3
Inverno	11.2	14.5	14.5	14.6	55.5	2.7
Primavera	19.9	26.9	26.1	25.3	50.2	4.0

2017	Temperaturas (°C)				Umidade Relativa (%)	Vento (m/s)
	Ar	20 cm	40 cm	60 cm		
Anual	17.2	23.1	22.9	22.7	54.5	3.4
Verão	23.2	29.7	29.4	29.0	58.3	3.7
Outono	13.8	19.5	20.2	20.8	64.3	2.9
Inverno	11.7	15.8	15.8	15.9	51.2	2.9
Primavera	20.6	27.3	26.1	25.2	44.7	4.1

Tabela II. Médias anuais da amplitude térmica diária, para a temperatura do ar e a 20, 40 e 60cm abaixo do solo.

	Temperaturas (°C)			
	Ar	20 cm	40 cm	60 cm
2016	11.6	5.1	1.1	0.5
2017	12.6	5.1	1.0	0.4

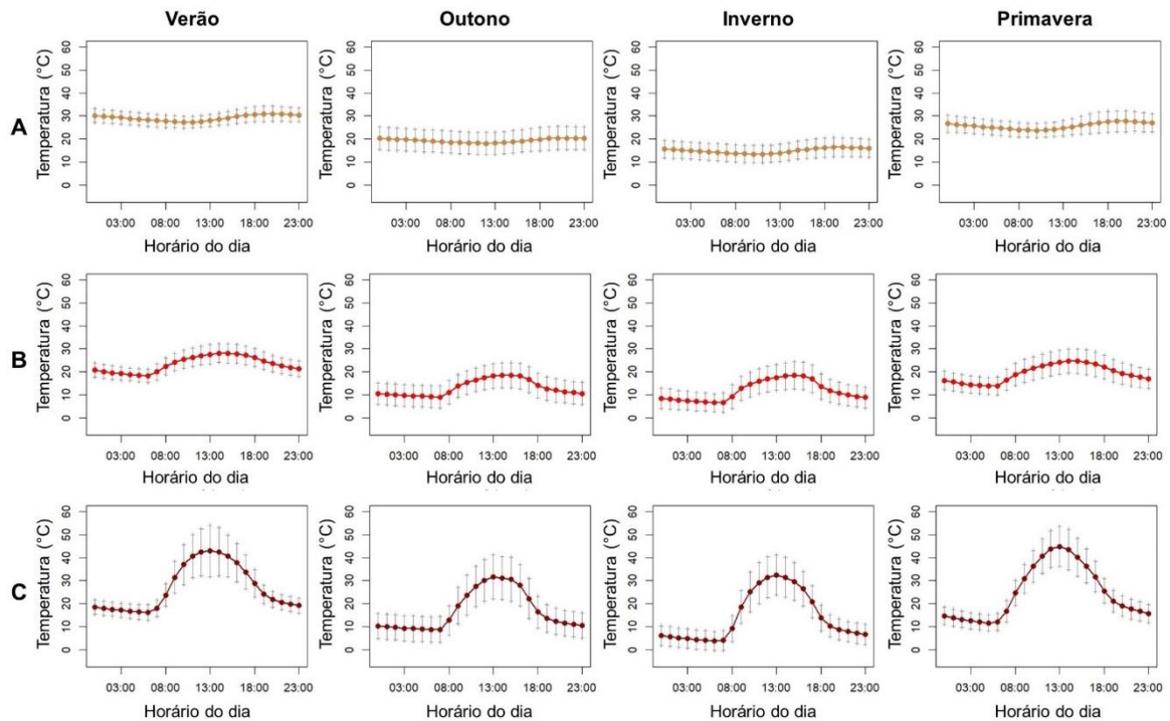


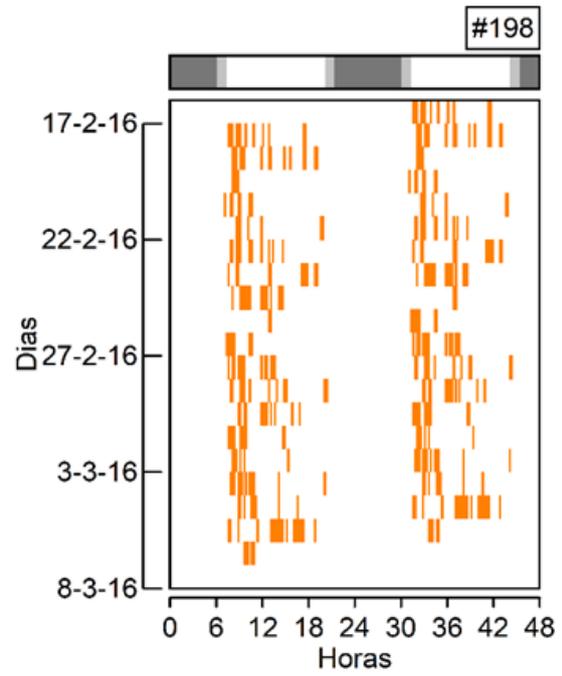
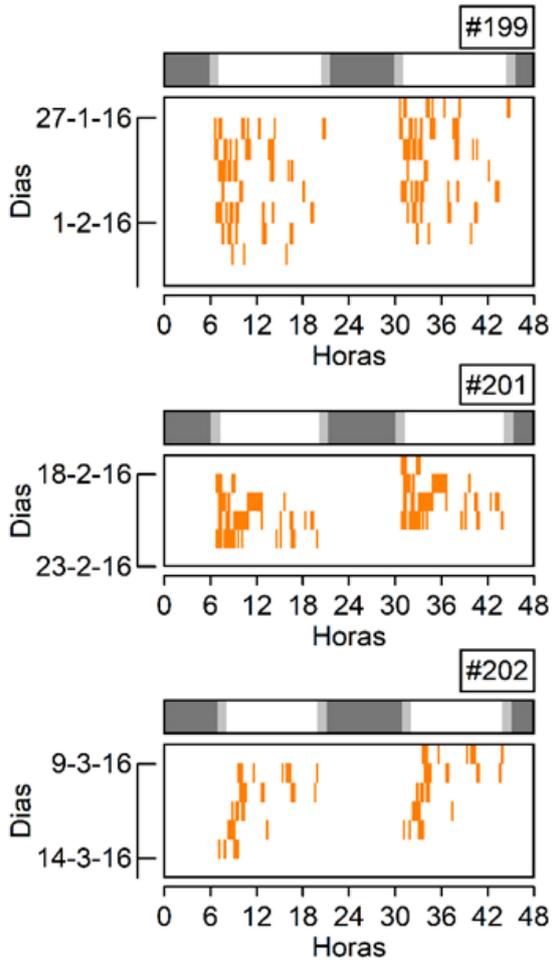
Figura 11. Variação diária das medidas de temperatura ambiental coletadas de 2015 a 2017, para cada estação do ano. O valor médio obtido em cada horário do dia está representado pelos pontos, com o respectivo desvio padrão representado pelas linhas verticais. **A:** Dados de temperatura a 20cm abaixo do solo. **B:** Dados de temperatura do ar, com proteção contra radiação. **C:** Dados de temperatura operativa.

4.3. CARACTERIZAÇÃO DO RITMO DE ATIVIDADE NAS ARENAS SEMI-NATURAIS

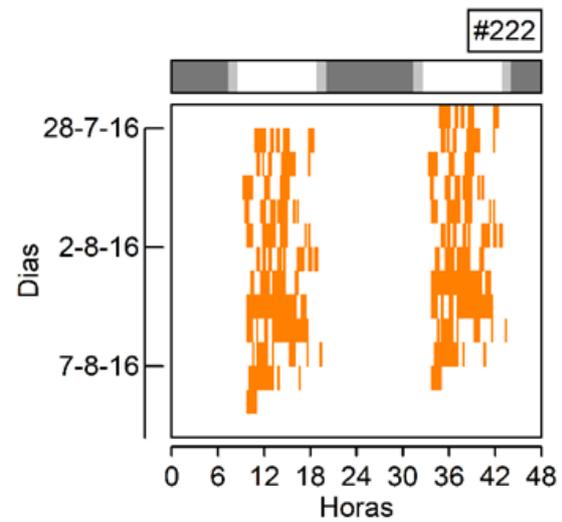
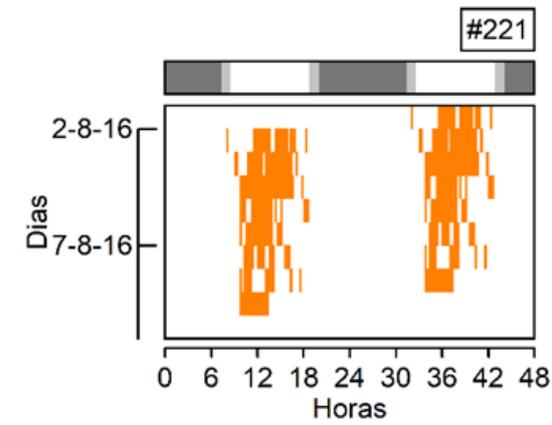
Dentre as 6 tentativas de registro da atividade dos animais com $D \geq 100$, em 2016, apenas uma foi bem sucedida (Figura 9). Foi possível observar, com os dados do luxímetro deste animal (Figura 12, #193), a transição entre os padrões diários de *atividade de superfície* tipicamente encontrados no verão e no inverno.

Nos registros preliminares utilizando o acelerômetro, não houve recapturas de animais sem *logger*, indicando que o método para fixá-lo no colar havia sido eficiente. A variação de peso e a taxa de recaptura dos animais com acelerômetro e luxímetro, nas arenas, foi semelhante à dos animais que possuíam apenas luxímetro, indicando que o acelerômetro não havia alterado as condições de sobrevivência dos animais.

VERÃO



INVERNO



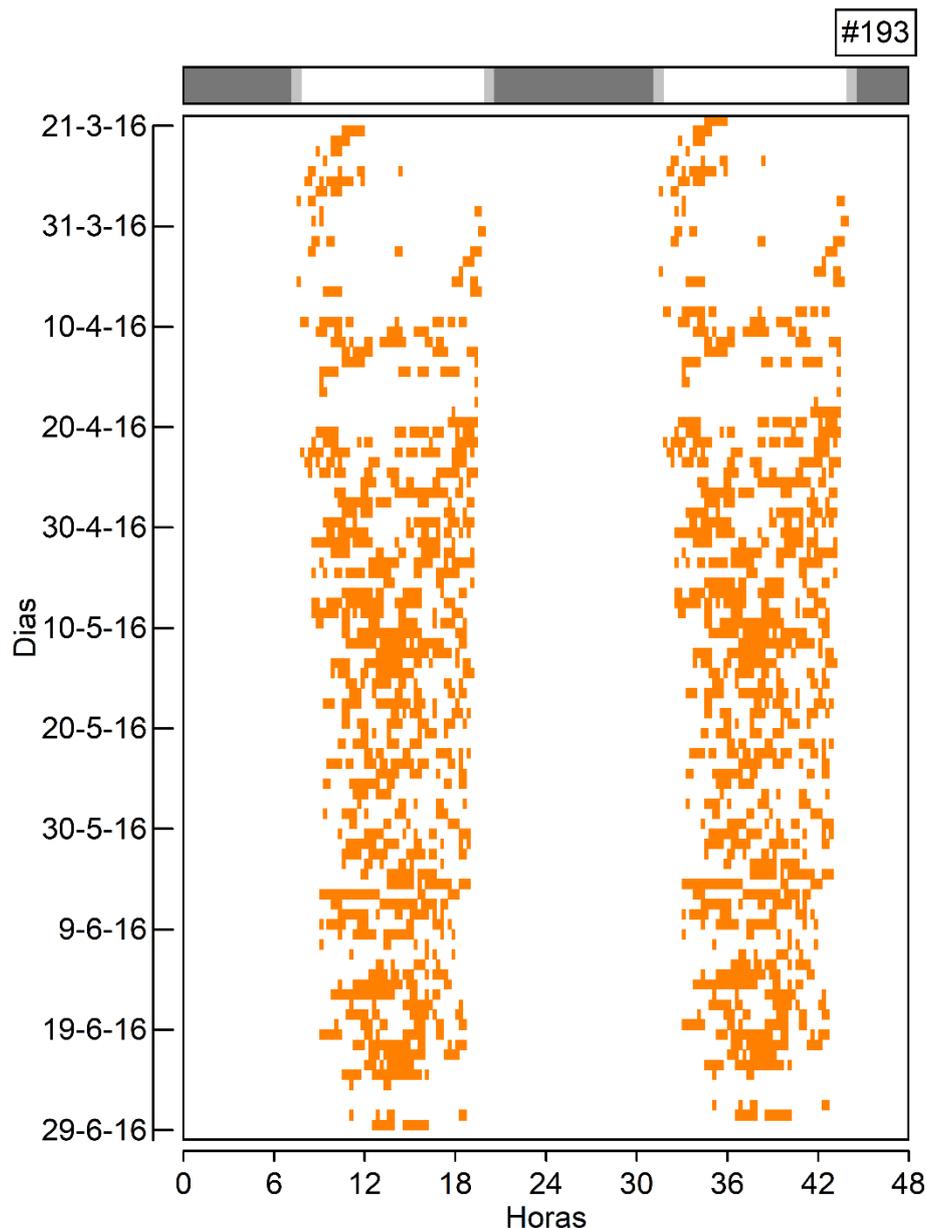


Figura 12. Ritmo diário da *atividade de superfície* de tuco-tucos mantidos em arenas semi-naturais, no ano de 2016, exibidos em forma de actograma. Para melhor visualização dos ritmos, o gráfico foi duplicado, exibindo dois dias por linha. As marcações amarelas indicam os episódios em que o animal saiu à superfície, identificados por registros de iluminação maiores que 2 lux. Acima do gráfico, o fotoperíodo natural em que se iniciou o registro é representado por uma barra com segmentos escuros (noite) e claros (dia).

Os primeiros dados coletados com o acelerômetro revelaram que, além de estarem ativos durante o dia, em concordância com as evidências anteriores do grupo (Tomotani et al., 2012), os tuco-tucos também apresentaram episódios de atividade à noite (Figura 13). Devido à limitação do registro do luxímetro apenas durante a fase de claridade, não é

possível confirmar se a atividade noturna ocorreu na superfície ou no subterrâneo. Durante o dia, alguns dos episódios intensos de atividade foram simultâneos às saídas à superfície. Houve, ainda, episódios nos quais o animal se encontrava na superfície, mas não apresentava movimentação (Figura 13, #201, #221).

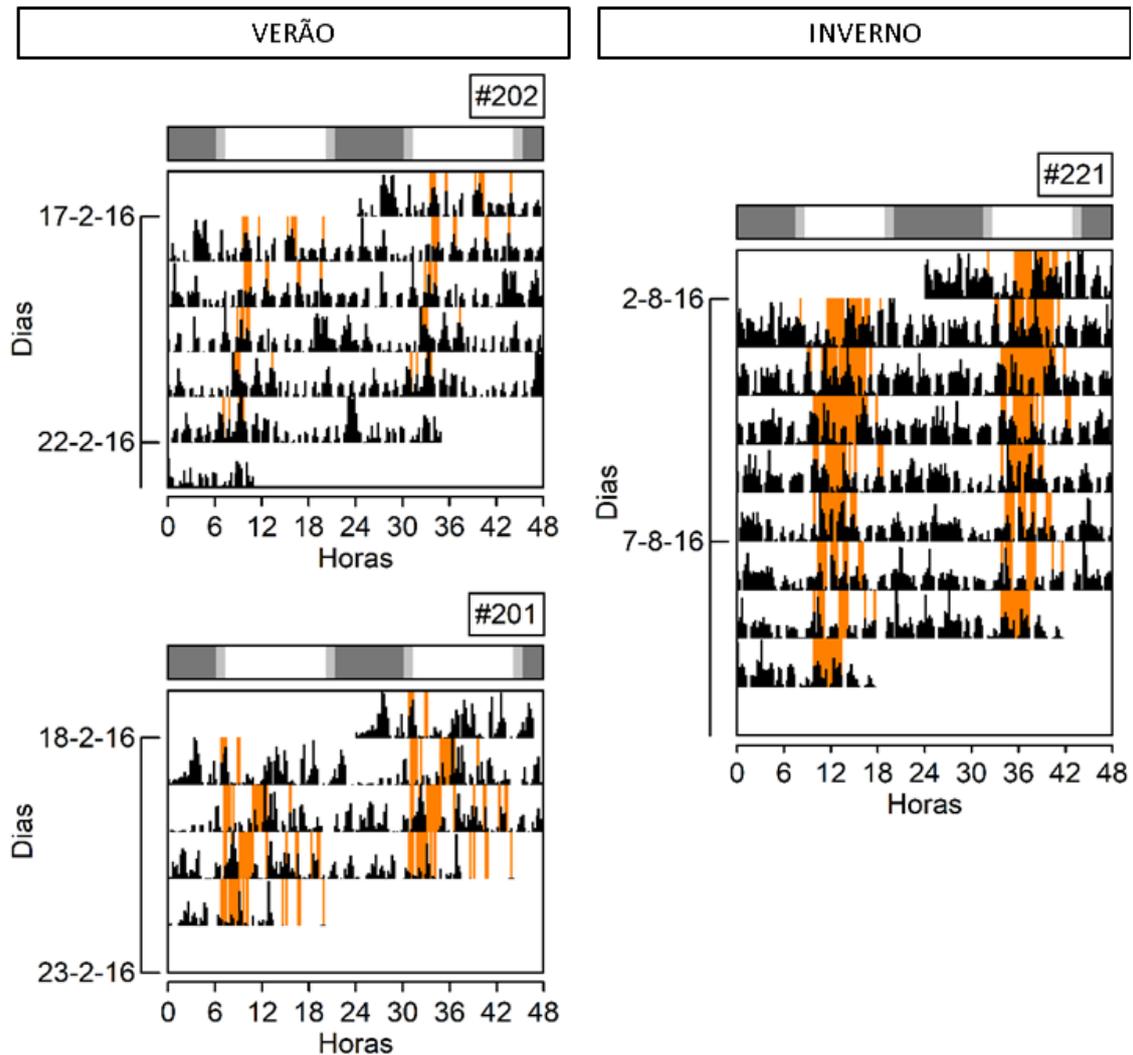
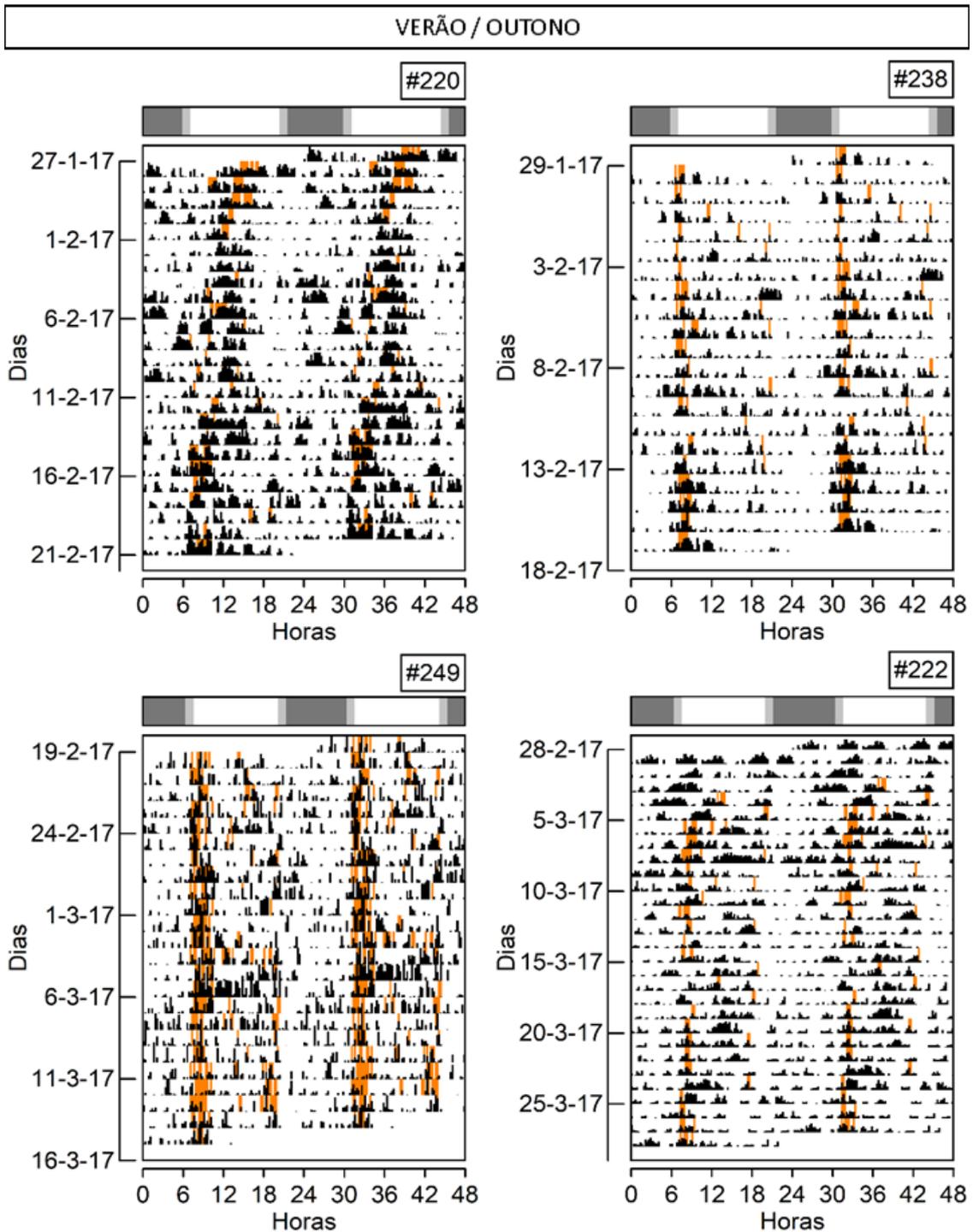


Figura 13. Primeiros registros simultâneos dos ritmos diários de *atividade geral* e de *superfície* de tuco-tucos mantidos em arenas semi-naturais, em forma de actograma. Os registros de *atividade geral* (preto) foram sobrepostos aos registros de *atividade de superfície* (amarelo) do mesmo animal, para os mesmos dias. O fotoperíodo natural em que se iniciou o registro é representado acima do gráfico, por uma barra com segmentos escuros (noite) e claros (dia).

Em 2017, os registros de *atividade geral* dos animais ao longo do ano, mais longos e numerosos, confirmaram as observações anteriores: a *atividade geral* está concentrada durante o dia, mas não está limitada a esses horários, ocorrendo episódios esparsos durante a noite (Figura 14). Também foi observada a mudança gradual no padrão

temporal das saídas à superfície ao longo do ano, sendo que os episódios de saídas, no verão, ocorrem nos crepúsculos e, no inverno, no meio do dia. Os dados obtidos na primavera indicam que ocorre adiantamento gradual no horário de início das saídas ao longo dos dias, reestabelecendo o padrão temporal de *atividade de superfície* característico do verão. Em geral, como os episódios de *atividade geral* estão associados às saídas, também foi possível observar indícios de variação anual no registro desse ritmo.



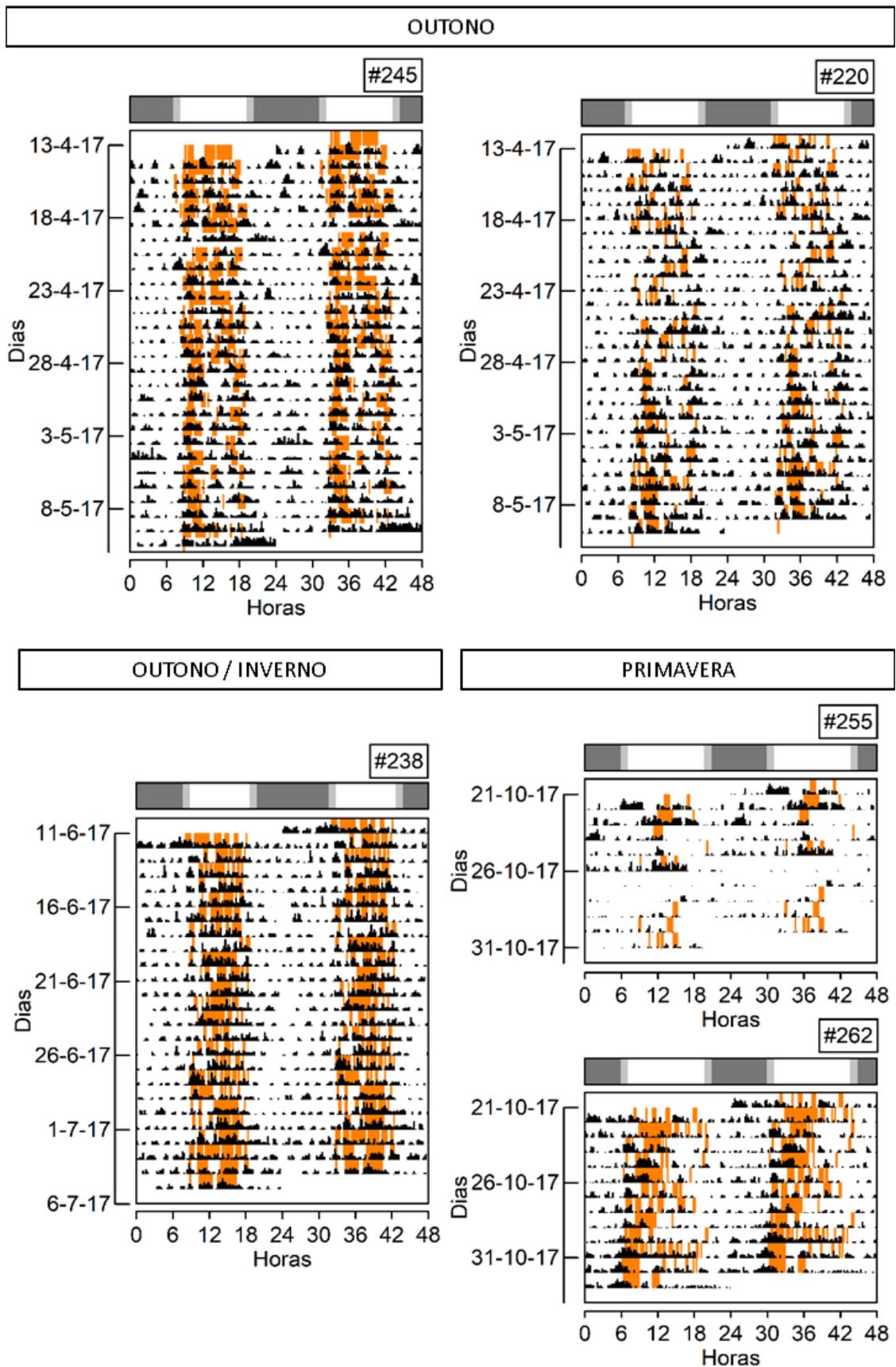


Figura 14. Ritmo diário de *atividade geral* e de *superfície* de tuco-tucos mantidos em arenas semi-naturais, em 2017, exibido em forma de actograma. Marcações amarelas: horários em que os animais

saíram à superfície. Marcações pretas: registros de *atividade geral*. A numeração acima de cada gráfico corresponde à identificação do animal. O fotoperíodo natural em que se iniciou cada registro é representado por uma barra com segmentos escuros (noite) e claros (dia).

Os indivíduos apresentaram a menor porcentagem diária de *atividade geral* e de *superfície* na estação de verão e os maiores valores na estação de inverno (Tabela III). No inverno, cerca de metade da atividade diurna dos animais foi realizada na superfície, contrastando com 15% da atividade diurna, no verão. Já as porcentagens de atividade diurna não variaram de forma tão expressiva ao longo das estações. A maioria dos tuco-tucos estão moderadamente mais ativos durante o dia do que durante à noite, sendo que ocorre grande variação dos valores de porcentagem entre indivíduos dentro da mesma estação (Tabela III).

Tabela III. Quantificação da atividade que os animais apresentaram nas arenas semi-naturais, em cada estação do ano. Foi calculada a porcentagem de tempo, em relação às 24 horas do dia, em que os animais estavam ativos (medida por meio de acelerômetros) e em repouso; a porcentagem de atividade diurna e noturna, em relação ao total da atividade geral diária; a porcentagem de atividade realizada na superfície (medida por meio de luxímetros) e no subterrâneo, em relação ao total da atividade diurna.

VERÃO						
n° animal	Atividade	Repouso	Diurna	Noturna	Superfície	Subterrâneo
201	46.1%	53.9%	48.3%	51.7%	40.6%	59.4%
220	48.8%	51.2%	61.7%	38.3%	9.4%	90.6%
238	45.2%	54.8%	64.1%	35.9%	8.1%	91.9%
249	58.5%	41.5%	66.6%	33.4%	19.5%	80.5%
222	60.3%	39.7%	59.5%	40.5%	5.7%	94.3%
202	51.0%	49.0%	50.1%	49.9%	10.7%	89.3%
Média	51.7%	48.3%	58.4%	41.6%	15.7%	84.3%
OUTONO						
n° animal	Atividade	Repouso	Diurna	Noturna	Superfície	Subterrâneo
222	57.7%	42.3%	51.0%	49.0%	13.0%	87.0%
245	59.7%	40.3%	63.6%	36.4%	31.7%	68.3%
220	53.3%	46.7%	63.1%	36.9%	18.1%	81.9%
238	59.4%	40.6%	67.0%	33.0%	37.2%	62.8%
Média	57.5%	42.5%	61.2%	38.8%	25.0%	75.0%
INVERNO						
n° animal	Atividade	Repouso	Diurna	Noturna	Superfície	Subterrâneo
238	58.5%	41.5%	66.2%	33.8%	35.6%	64.4%
221	64.9%	35.1%	45.1%	54.9%	56.9%	43.1%
Média	61.7%	38.3%	55.6%	44.4%	46.3%	53.7%

PRIMAVERA						
n° animal	Atividade	Repouso	Diurna	Noturna	Superfície	Subterrâneo
255	64.8%	35.2%	53.3%	46.7%	10.8%	89.2%
262	54.9%	45.1%	55.4%	44.6%	42.9%	57.1%
Média	59.8%	40.2%	54.3%	45.7%	26.9%	73.1%

Para verificar estatisticamente a ocorrência de sazonalidade na *atividade geral* dos animais nas arenas semi-naturais, foram utilizados os registros obtidos com acelerômetro durante o ano de 2017. Em geral, foi possível observar variação entre as médias dos parâmetros analisados em cada estação (*onset*, *offset* e *alfa*), sendo que o *alfa* é menor no inverno, condizente com o *onset* mais tardio e o *offset* mais adiantado (Figura 15). Apesar disso, é preciso destacar a expressiva variação intragrupos obtida para todos os parâmetros, principalmente na estação da primavera. Conforme a análise de variância, ocorreram diferenças significativas entre as estações para *onset* ($p < 0.01$), *offset* ($p < 0.01$) e *alfa* ($p = 0.01$). Ao comparar os dados das estações par a par, encontramos diferenças significativas no *alfa* apenas entre verão – inverno e outono – inverno. Houve diferenças significativas entre *onset* e *offset* que não levaram a diferenças no *alfa*, entre verão – outono, inverno – primavera e outono – primavera. Por fim, entre verão – primavera, foi encontrada diferença significativa somente para *offset*, a qual não pareceu ser suficiente para gerar diferenças em *alfa*. Os resultados obtidos para os registros nas arenas foram comparados àqueles obtidos em laboratório e foram apresentados conjuntamente, no final deste capítulo (Figura 23).

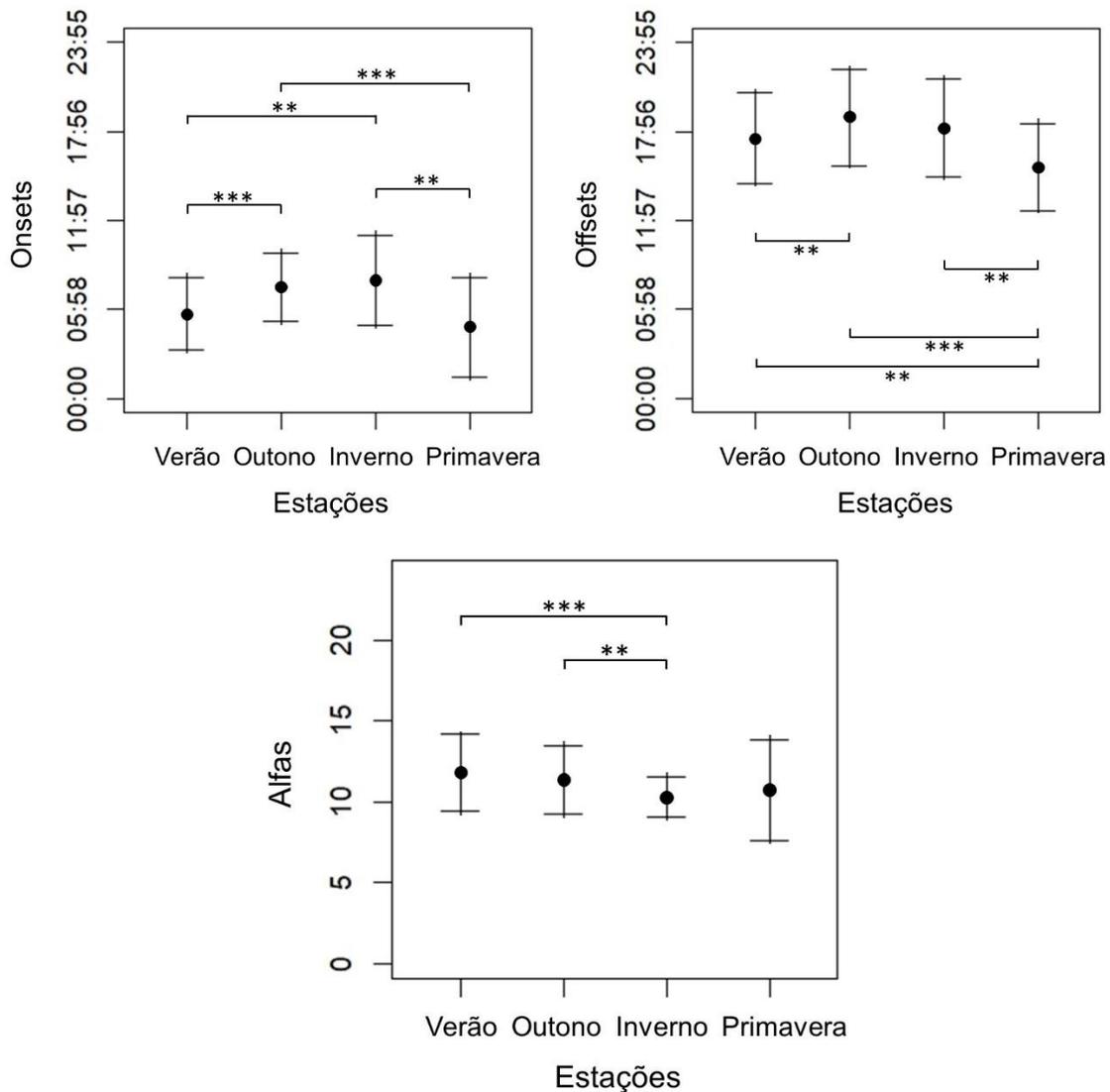


Figura 15. Médias de *onset*, *offset* e *alfa* da *atividade geral* dos tuco-tucos em arenas semi-naturais, para cada estação do ano de 2017. Barras horizontais: desvio padrão. Diferenças significativas são indicadas por *** ($p < 0.01$) ou ** ($p < 0.05$) (Welch).

4.4. INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA AMBIENTAL SOBRE O RITMO DE ATIVIDADE DE SUPERFÍCIE NAS ARENAS SEMI-NATURAIS

Assim como foi visto na seção anterior, observamos, na figura 16, que o tempo de permanência na superfície durante o verão é, em geral, menor que nas outras estações do ano e as saídas dos animais se concentram nos horários dos crepúsculos, principalmente no amanhecer. Nesses horários, a temperatura operativa média é de aproximadamente 15 a 30°C (Figura 11) e vemos, na figura 17, que os animais passam mais tempo na superfície

nesse mesmo intervalo de temperaturas. O tempo na superfície aparentemente não está relacionado à temperatura no subterrâneo, nessa estação (Figura 18).

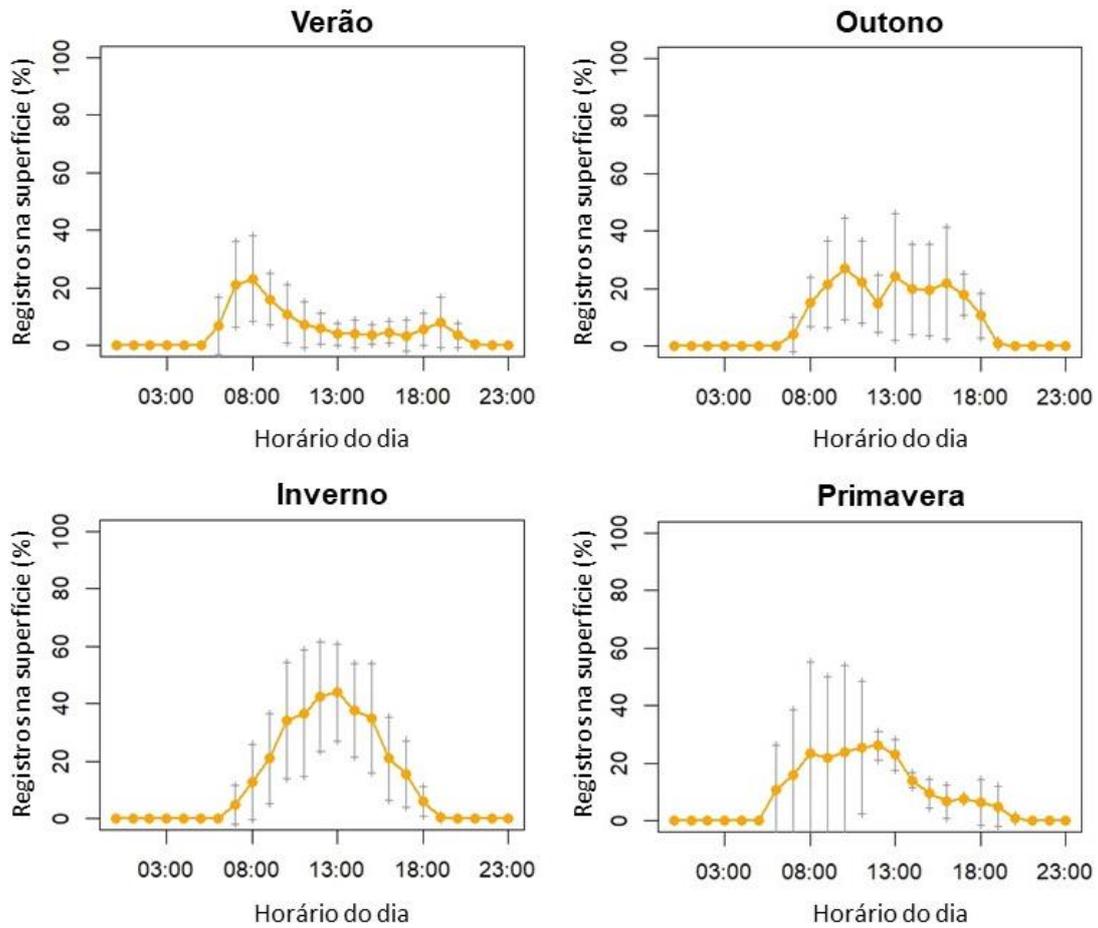


Figura 16. Porcentagem média de registros dos animais na superfície em cada horário do dia, para cada estação do ano, de 2015 a 2017 (Verão: n=14; Outono: n=6; Inverno: n=9; Primavera: n=2; média de cada indivíduo calculada com medidas de D=7 a 30 dias). Linhas verticais representam o desvio padrão de cada ponto.

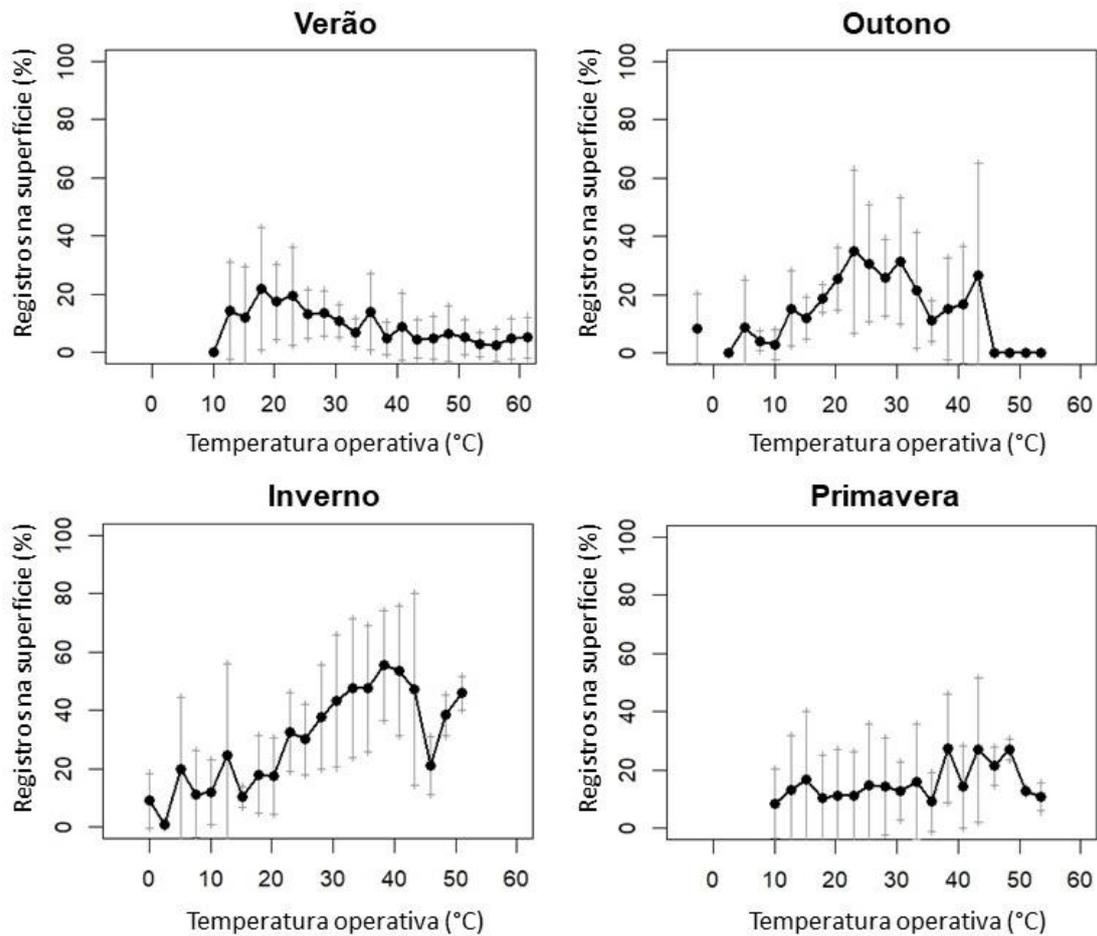


Figura 17. Porcentagem média de registros dos animais na superfície em função da temperatura operativa, em cada estação do ano, de 2015 a 2017 (Verão: n=9; Outono: n=6; Inverno: n=8; Primavera: n=2; D=7 a 30 dias). Linhas verticais: desvio padrão.

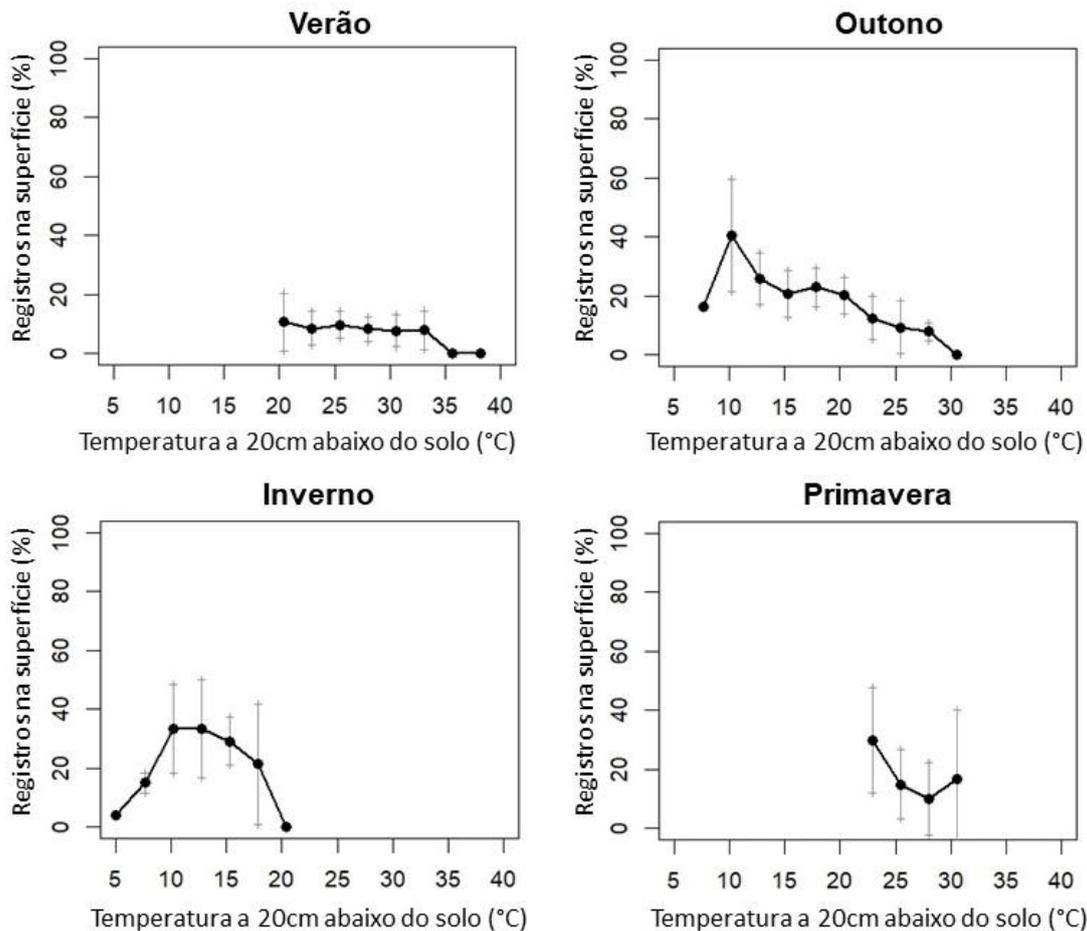


Figura 18. Porcentagem média de registros dos animais na superfície em função da temperatura a 20 cm abaixo do solo, em cada estação do ano, de 2015 a 2017 (Verão: n=9; Outono: n=6; Inverno: n=8; Primavera: n=2; D=7 a 30 dias). Linhas verticais: desvio padrão.

No outono, o tempo gasto na superfície é maior que no verão e as saídas passam a ocorrer ao longo do dia, não se concentrando em um horário determinado (Figura 16). A maior parte da *atividade de superfície* ocorre quando a temperatura operativa está entre 20 e 35°C e, em comparação com os dados de verão, há maior variação entre os indivíduos (Figura 17). Houve ocorrências de temperatura operativa negativa nos dias 27 de abril de 2016 e nos dias 18, 19 e 20 de junho de 2017. Dois animais foram registrados nesses dias, sendo que apenas um deles apresentou registro de saída, às 8:40 do dia 19 de junho (Figura 14, #238). Na figura 18, é possível observar que, conforme a temperatura no subterrâneo aumenta, a partir dos 10°C, o tempo que os animais permanecem na superfície diminui.

No inverno, a *atividade de superfície* é expressa mais intensamente que nas outras estações do ano (Figura 16) e as saídas se concentram no meio do dia, em torno das 13:00.

Diferentemente das outras estações, o tempo na superfície aumentou expressivamente com o aumento da temperatura operativa, alcançando 60% em 40°C (Figura 17). Assim como no outono, há relação entre a atividade de superfície e a temperatura no subterrâneo, sendo que, a partir de 10°C, o tempo na superfície diminui com o aumento da temperatura. Além disso, também é possível notar que o tempo na superfície diminui quando a temperatura no subterrâneo é menor que 10°C.

Os dados de primavera têm número amostral baixo (n=2). Eles indicam, preliminarmente, que as saídas dos animais são mais intensas na fase da manhã, das 8:00 às 12:00 (Figura 16), mas não evidenciam relação entre o tempo na superfície e a variação de temperatura operativa (Figura 17). Além disso, os registros dos animais foram coletados em dias com baixa amplitude de variação da temperatura no subterrâneo, o que diminuiu o número de pontos médios, na figura 18, e impossibilitou a observação de relações com a atividade de superfície.

Ao considerar o efeito simultâneo da temperatura operativa e do horário do dia (Figura 19), a região onde se concentra a atividade de superfície, no verão, está mais restrita ao horário do dia (entre 8:00 e 10:00) do que a um determinado intervalo de temperaturas. O mesmo pode ser observado considerando simultaneamente a temperatura no subterrâneo e o horário do dia (Figura 20).

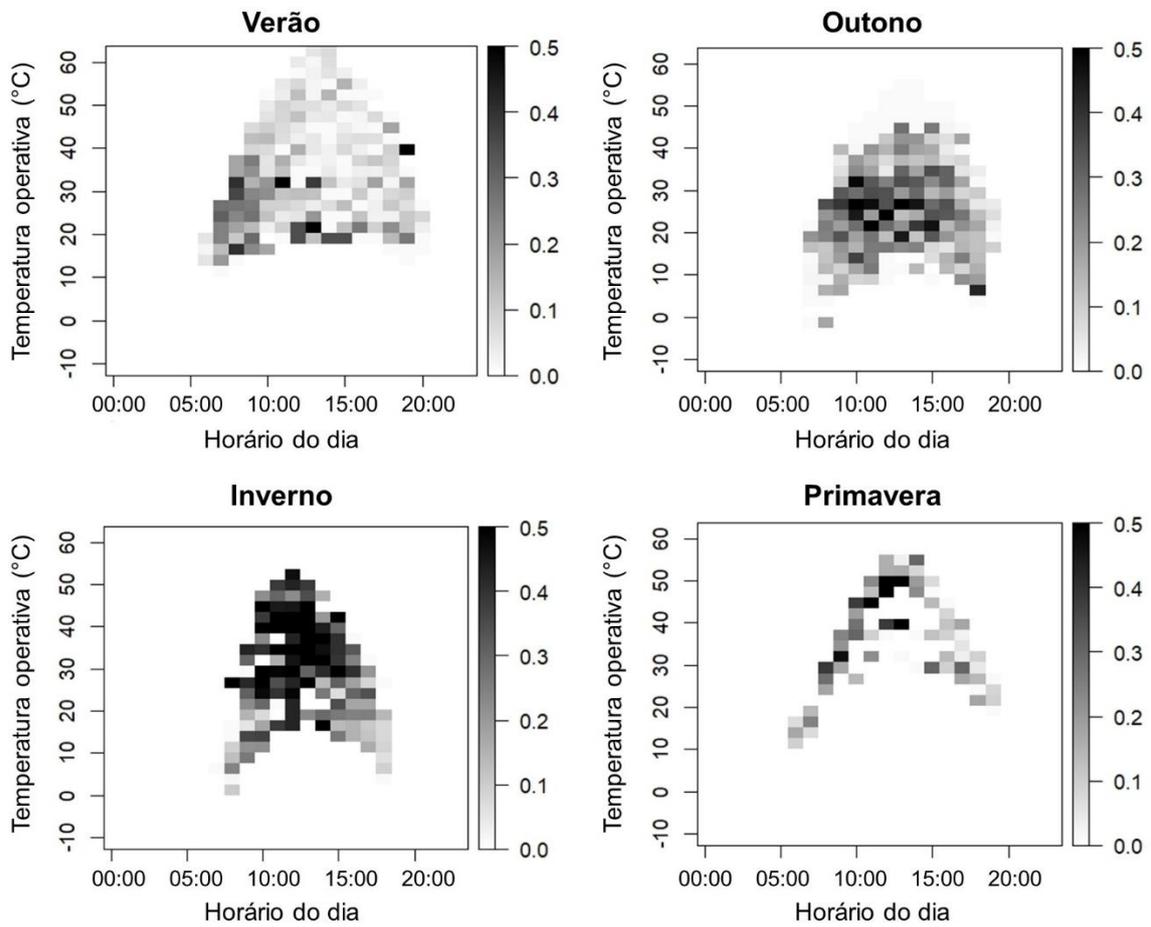


Figura 19. Porcentagem média de registros dos animais na superfície em cada horário do dia e faixa de temperatura operativa. Os valores da variável “Registros na superfície” estão representados por tonalidades entre o branco (0%) e o preto (50%).

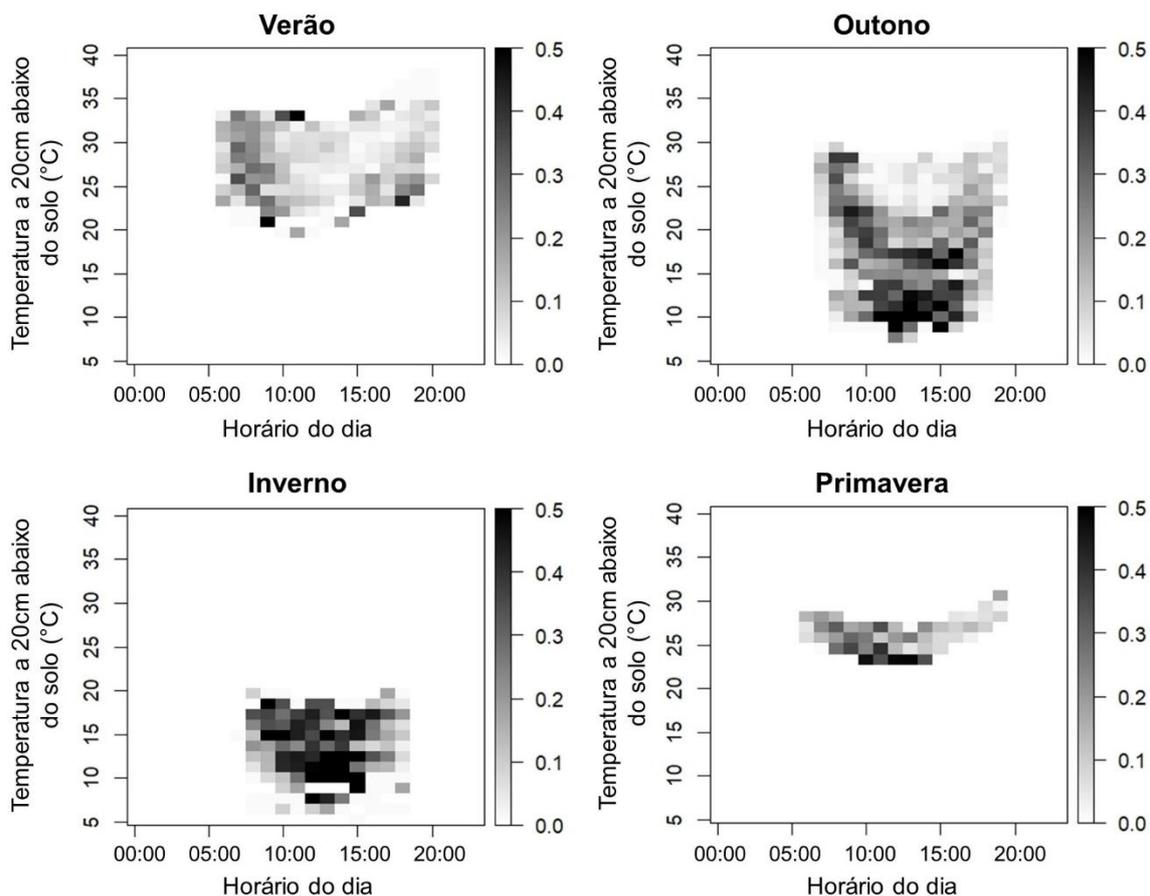


Figura 20. Porcentagem média de registros dos animais na superfície em cada horário do dia e faixa de temperatura a 20 cm abaixo do solo. Os valores da variável “Registros na superfície” estão representados por tonalidades entre o branco (0%) e o preto (50%).

No outono, a *atividade de superfície* ocorre em um intervalo amplo de horários e de temperaturas operativas (Figura 19). Os pontos com os maiores valores de tempo na superfície (próximos de 50%) estão ligeiramente concentrados na faixa de temperatura operativa entre 20 e 30°C. Na figura 20, o tempo na superfície das 7:00 às 10:00 não possui relação aparente com a temperatura no subterrâneo. A partir das 10:00 da manhã, porém, a atividade de superfície parece ser maior quando as temperaturas são menores.

No inverno, as saídas ocorrem majoritariamente das 10:00 às 15:00 e em temperaturas operativas acima de 20°C, com exceção das amostras obtidas às 12:00, nas quais as saídas ocorrem independentes do valor de temperatura. Apesar da amplitude de variação da temperatura no subterrâneo ter sido menor, em comparação com os dados de verão e outono, a atividade de superfície parece estar igualmente restrita das 10:00 às 15:00, sendo que o tempo na superfície é moderadamente maior em temperaturas no subterrâneo menores (Figura 20).

Os dados obtidos na primavera foram insuficientes para inferir sobre o efeito simultâneo do horário e das temperaturas sobre o tempo na superfície.

Os modelos finais de regressão múltipla explicaram em torno de 15% da variação da atividade de superfície dos tuco-tucos em cada estação (Suplementos S.2). Para os dados de verão, a variável que mais contribuiu para explicar a variação da atividade de superfície foi o horário do dia, seguido da temperatura operativa. Para os dados de outono e inverno, a temperatura operativa apresentou o maior poder explicativo. O efeito interativo entre horário e temperatura no subterrâneo também contribuiu para explicar parte da variação dos dados do outono. Para os dados de primavera, o horário, a temperatura no subterrâneo e a umidade relativa foram as variáveis com maior poder explicativo (Suplementos S.2).

4.5. RESULTADOS E ANÁLISES DOS REGISTROS DE LABORATÓRIO

Os registros de atividade em roda dos animais em laboratório ocorreram do dia 5 de novembro de 2016 ao dia 5 de dezembro de 2017. Durante esse ano, foi necessário rearranjar a disposição dos animais no biotério, por motivos de manutenção ou ocorrência de experimentos simultâneos no laboratório. Dessa forma, o registro apresentou descontinuidades em determinadas épocas do ano.

A atividade em roda dos animais ocorreu regularmente durante à noite (Figura 21), conforme esperado para os tuco-tucos, segundo estudos anteriores do nosso grupo (Valentinuzzi et al., 2009). A duração (*alfa*) da atividade em roda foi, aparentemente menor no verão e maior no inverno. Grande parte dos indivíduos apresentou adiantamento do *onset* antes do início do inverno, por volta do mês de abril, refletindo o adiantamento do início da noite, no inverno. O *offset* aparentemente possui menor variação ao longo do ano. No entanto, da mesma forma como observado para os dados das arenas, é preciso destacar a variação intragrupos considerável, principalmente para os *onsets* (Figura 21 e 22).

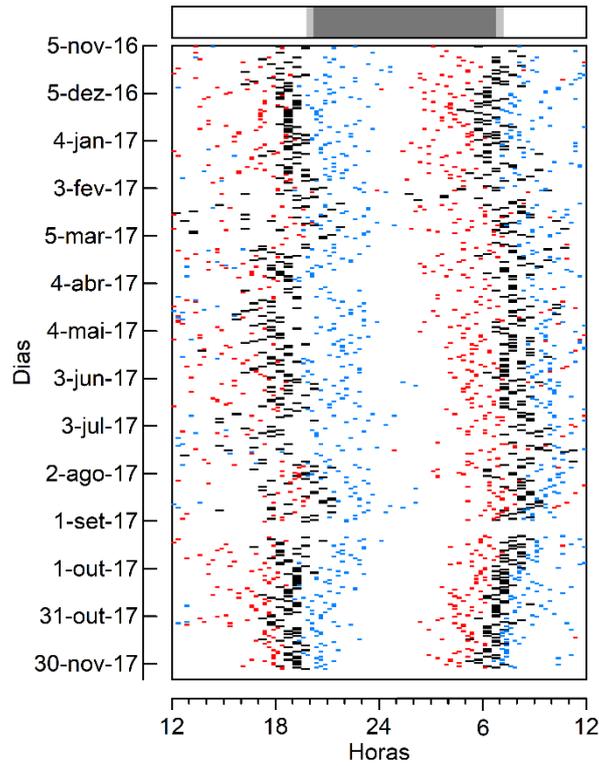
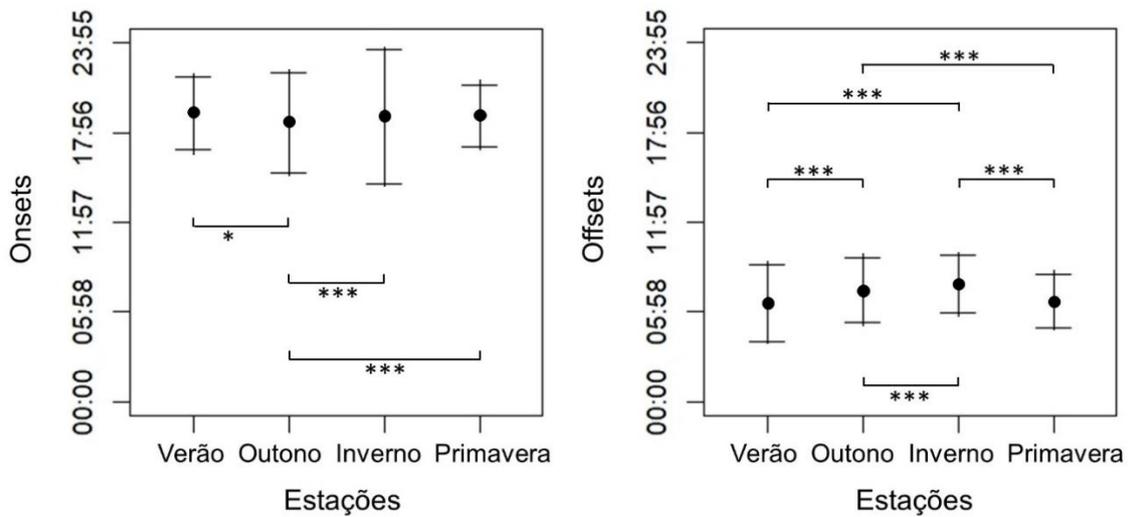


Figura 21. Média do onset e offset da atividade em roda de tuco-tucos mantidos em laboratório, expostos a fotoperíodo natural, durante o ano de 2017. O actograma está centralizado na meia-noite, evidenciando a fase de escuro do dia, na qual os animais estavam ativos. Marcações pretas indicam a média obtida para o *onset* (à esquerda) e *offset* (à direita) da atividade para cada dia do ano. Marcações azuis: média + desvio padrão. Marcações vermelhas: média - desvio padrão.



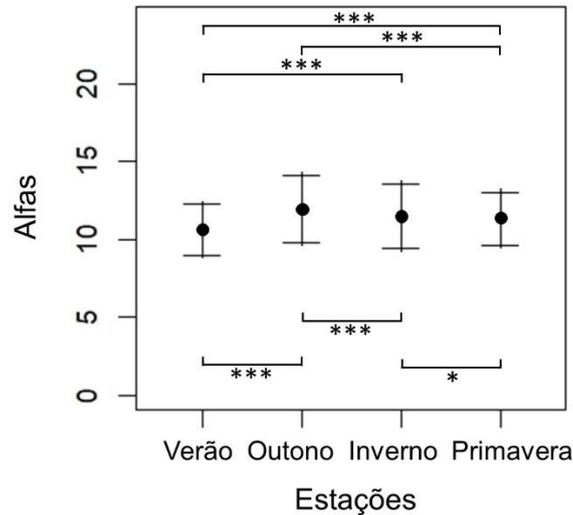


Figura 22. Médias de onset, offset e alfa calculados da atividade de roda dos tuco-tucos em laboratório, para cada estação do ano de 2017. Barras horizontais: desvio padrão. As diferenças significativas são indicadas por *** ($p < 0.01$) ou * ($p < 0.1$) (Welch).

Segundo a análise de variância, todos os parâmetros analisados apresentaram diferenças significativas entre as estações ($p < 0.01$) e, pelos testes par a par, o *alfa* apresentou diferenças significativas para todas as combinações entre estações, apesar de serem moderadas (Figura 22). Entre verão – inverno, outono – inverno e inverno – primavera, houve diferenças significativas principalmente no *offset*. Entre verão – primavera, apesar de *alfa* ser diferente, não houve diferenças significativas para *onset* ou *offset*. Para as outras duas combinações (verão – outono e outono – primavera), todos os parâmetros apresentaram diferenças significativas.

Ao comparar o resultado dos testes realizados para os dados das arenas e do laboratório, verificamos que, em ambos, o *alfa* é significativamente diferente entre verão – inverno e inverno – outono (Figura 23). Para os outros pares de combinações, foram encontradas diferenças significativas no *alfa* apenas para os dados de laboratório. Entre verão e inverno, para os dados das arenas, há diferença no *onset*, enquanto que, para os dados de laboratório, há diferença no *offset*. Em ambos os ambientes, o *onset* e *offset* da primavera e do outono foram diferentes (Figura 23). É preciso, porém, fazer ressalvas quanto aos conjuntos de dados analisados. Por termos reunido o conjunto de dados de todos os animais, em cada estação, essa primeira análise pode ter atenuado variações sazonais que observamos a nível individual. Para verificar a consistência dos resultados, é preciso realizar a comparação dos onsets obtidos ao longo das estações, para cada indivíduo.

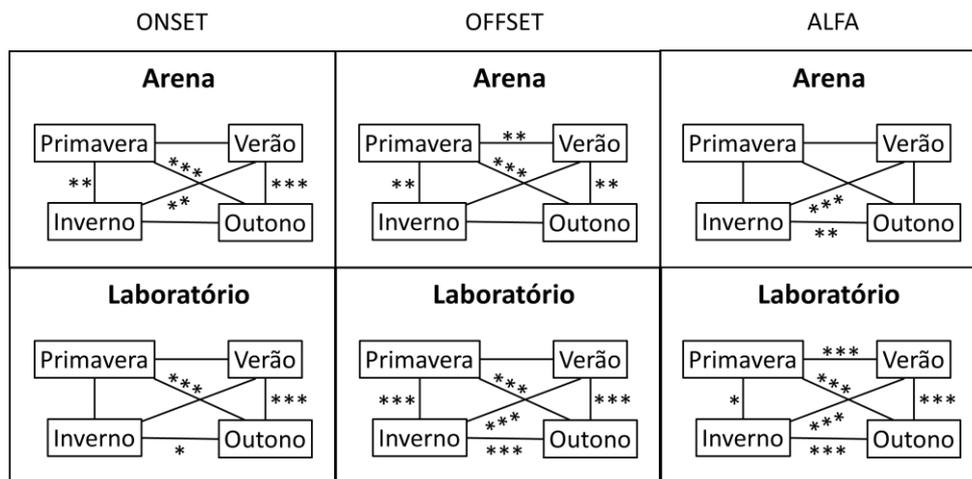


Figura 23. Comparação entre os horários de *onset*, *offset* e entre os *alfas* ao longo das estações do ano, nas condições de laboratório ou arena semi-natural, com base nos resultados dos testes t de Welch. Diferenças significativas entre duas estações são indicadas por *** ($p < 0.01$), ** ($p < 0.05$) ou * ($p < 0.1$).

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

5.1. OS COMPONENTES DA ATIVIDADE DIÁRIA DOS TUCO-TUCOS NAS ARENAS SEMI-NATURAIS

Como mencionado acima, o estudo dos ritmos biológicos em campo e laboratório, de forma complementar, permite entender, por um lado, aspectos ecológicos e evolutivos dos ritmos e, por outro lado, o funcionamento de mecanismos fisiológicos endógenos associados a esses ritmos (Rotenberg et al., 2003; Marques & Waterhouse, 2004). Apesar disso, o registro da atividade dos animais em campo, com a mesma rigidez e sistematização dos registros de laboratório constitui um grande desafio (Halle & Weinert, 2000). Nosso grupo havia realizado tentativas de medir a atividade dos animais em campo por meio de observação visual direta e telemetria (Tomotani et al., 2012). Mais recentemente, passamos a utilizar luxímetros para automatizar o registro da atividade de superfície (Flôres et al., 2016). Nesse trabalho, introduzimos o uso dos acelerômetros, que foram capazes de medir, com êxito, a atividade dos animais na superfície e no subterrâneo.

As médias de porcentagem de atividade (em contraposição à de repouso) que obtivemos, em torno de 55% (Tabela III), são maiores do que as observadas para outros roedores subterrâneos. Em estudos feitos por telemetria, esses valores costumam variar de 20 a 30% de atividade por dia (*T. bottae*: Gettinger, 1984; *G. bursarius*: Benedix, 1994; *S. cyanus*: Urrejola et al., 2005; *H. argenteocinereus*: Šklíba et al., 2007; *S. galili*: Šklíba et al., 2016; *T. macrocephalus*: Vlasatá et al., 2017). Os dados obtidos para outras espécies de tuco-tucos são mais escassos, mas um dos trabalhos indicou porcentagem de atividade diária em torno de 40% (Estevan et al., 2016), também utilizando telemetria. O fato das médias obtidas nesse projeto superarem 40% sustenta a ideia de que os registros feitos com acelerômetro são mais sensíveis a pequenos movimentos corporais do que a maioria dos feitos por telemetria, a qual detecta principalmente deslocamentos espaciais. Ao mesmo tempo, é necessário verificar a precisão do método que utilizamos para separar episódios de atividade dos de repouso dos animais (seção 3.4). Isso poderá ser feito em estudos posteriores que relacionem padrões obtidos no acelerômetro com comportamentos específicos do animal gravados ou observados sistematicamente. Dessa

forma, também será possível definir, de forma mais clara, se determinados comportamentos como *grooming* devem ser incluídos ou não na fase ativa desses roedores subterrâneos, de acordo com o enfoque desejado no trabalho (Andersen & MacMahon, 1981; Benedix, 1994; Halle & Stenseth, 2000). Essa definição também auxiliaria na conclusão sobre a diurnidade da atividade dos tuco-tucos *Ctenomys aff. knighti* nas arenas semi-naturais.

Em relação à quantificação da atividade de superfície (em contraposição à subterrânea), as médias dos valores que obtivemos, no verão e no inverno, foram maiores que a porcentagem deduzida das informações dos indivíduos observados em trabalhos anteriores do grupo (Tomotani et al., 2012). Além da alta variabilidade interindividual que encontramos dentro de cada estação (Tabela III), também foi apontado por Cutrera et al. (2006) que os tuco-tucos machos da espécie *C. talarum* possuem maiores demandas energéticas que as fêmeas, o que implicaria maiores áreas de forrageio. Apesar do baixo número amostral, os dados que obtivemos no verão sugerem que os machos permanecem mais tempo ativos na superfície que as fêmeas. Como os três indivíduos estudados em Tomotani et al. (2012) eram fêmeas, possíveis diferenças entre os sexos dos animais também poderiam justificar a discrepância dos resultados dos dois trabalhos.

Apesar da porcentagem de atividade diurna ter sido maior para a maioria dos indivíduos desse estudo, os acelerômetros trouxeram evidências de episódios de atividade durante à noite, não relatados anteriormente para os tuco-tucos *Ctenomys aff. knighti*. Essas evidências também foram encontradas para outras espécies de tuco-tucos, em maior ou menor grau (Cutrera et al., 2006; Estevan et al., 2016). Ainda é incerto se ocorrem eventuais saídas dos tuco-tucos à superfície durante à noite. De acordo com um estudo termoenergético realizado pelo grupo (Tachinardi et al., 2017), há evidências de que saídas noturnas teriam um alto dispêndio energético para os tuco-tucos na estação de inverno e que seria vantajoso concentrar a fase de atividade somente durante o dia. Durante as observações visuais diretas (Tomotani et al., 2012), também não foram encontrados indícios de atividade noturna quando os observadores começavam os registros, de manhã. Por outro lado, obtivemos registros de animais com mais movimentação à noite (Figura 13, #221). Nesse trabalho, optamos por não assumir a ausência de saídas noturnas.

Além de ter levantado questionamentos interessantes sobre os dados que coletamos, o acréscimo do acelerômetro também poderá ser vantajoso em estudos posteriores do

grupo. O tipo de dado coletado nos permite usar o mesmo sensor para registrar a atividade do animal tanto em campo quanto em laboratório. Por esse motivo, o uso do acelerômetro será interessante em questões relacionadas à mudança de fase da atividade dos animais, quando são transferidos do laboratório para a arena semi-natural, e também em questões relacionadas ao componente endógeno da atividade dos animais em campo (Tomotani, 2011; Improta et al., 2017).

5.2. VERIFICAÇÃO DE SAZONALIDADE NOS PADRÕES DIÁRIOS DE ATIVIDADE

Confirmamos a consistência da variação sazonal na atividade de superfície dos tuco-tucos, apresentando, no verão, padrão crepuscular de saídas à superfície e, no inverno, maior frequência de saídas no meio do dia (Figuras 12, 13 e 14). Outra espécie de roedor subterrâneo (coruros, *Spalacopus cyanus*) apresentou sazonalidade semelhante em seu padrão de atividade de superfície, quando os animais foram observados visualmente em campo (Rezende et al., 2003). Nesse trabalho, havia sido discutida a possibilidade de que os padrões observados para os coruros existissem apenas no nível populacional, já que indivíduos estudados isoladamente em laboratório apresentavam atividade noturna (Begall et al., 2002; Rezende et al., 2003). Em nosso trabalho, conseguimos, pela primeira vez, registrar a atividade dos tuco-tucos individualmente, nas arenas semi-naturais e em laboratório. Nossos registros a nível individual excluem a possibilidade de que os padrões de atividade de superfície sejam expressos somente a nível populacional, nas arenas semi-naturais. Além disso, também verificamos diferenças na duração da fase ativa dos animais entre as estações de verão e inverno (Figura 15). Essas diferenças sugerem que a sazonalidade também está presente na atividade expressa no subterrâneo, assim como foi observado em *S. ehrenbergi*, apesar do padrão diário de atividade dessa espécie ser diferente (Rado et al., 1993). É preciso ressaltar, porém, que obtivemos apenas dois registros de acelerômetros dos animais no inverno e dois na primavera. Devido à variabilidade interindividual considerável que os tuco-tucos apresentaram em seu padrão diário de atividade (Figuras 13 e 14), mais dados coletados nessas estações são necessários para verificar a consistência das diferenças encontradas entre estações.

5.3. MODULAÇÃO DA ATIVIDADE DE SUPERFÍCIE PELAS VARIAÇÕES AMBIENTAIS

A sazonalidade da atividade de roedores subterrâneos (Rado et al., 1993; Rezende et al., 2003) e epígeos (Kenagy, 1976; Chappell & Bartholomew, 1981b; Heldmaier & Steinlechner, 1981; Kenagy et al., 2002) tem sido explicada em termos de reações agudas dos animais a mudanças ambientais que ocorrem ao longo do ano, particularmente como mascaramento devido à variação diária da temperatura. Segundo esse mecanismo, os animais evitariam, no verão, as altas temperaturas do meio do dia e, no inverno, concentrariam a atividade durante essas horas, evitando temperaturas mais baixas.

Conforme citado na seção 3.5, um estudo realizado com roedores epígeos (Long et al., 2005) forneceu a base para a realização das análises da relação entre atividade e temperatura de nosso trabalho, devido à escassez de informações semelhantes existentes para os roedores subterrâneos. Ao comparar nossos resultados com os desse estudo, vemos que, no verão, a associação entre a porcentagem de registros na superfície e a temperatura operativa (Figura 17) foi praticamente nula para os tuco-tucos enquanto que, para os esquilos do Ártico, foi expressamente positiva (Long et al., 2005). Nos estudos de roedores epígeos, o ambiente subterrâneo é interpretado como o *refúgio termal* desses animais, o lugar onde buscam abrigo quando as temperaturas na superfície não são permissivas (Chappell & Bartholomew, 1981a). Em contraste, o ambiente subterrâneo é onde os tuco-tucos passam mais de 80% do tempo (deduzido da tabela III), onde ocorre a maior parte da atividade, alimentação e reprodução desses animais (Begall et al., 2007), o que pode justificar a discrepância dos resultados dos dois trabalhos. Quando analisamos a relação dos registros na superfície com a temperatura no subterrâneo, no verão, também não encontramos fortes associações (Figura 18) e as saídas dos animais pareceram ser melhor explicadas pelo horário do dia (Figuras 19 e 20; Suplementos S.2). Esse resultado é consistente com o estudo termoenergético de Tachinardi et al. (2017), no qual foi visto que, no verão, o dispêndio energético dos tuco-tucos não depende da variação diária da temperatura ambiental. Apesar do padrão de atividade de superfície dos coruros (Rezende et al., 2003) ter sido semelhante ao que observamos para os tuco-tucos, os autores atribuíram o padrão da atividade de superfície à variação de temperatura na superfície, realizando associações qualitativas. Além disso, também observaram que a atividade

geral dos animais diminui quando são mantidos em ambientes com temperaturas mais altas, em laboratório (Rezende et al., 2003).

Na estação de inverno, por outro lado, a relação da porcentagem de registros na superfície com a temperatura operativa é mais expressiva (Figuras 17 e 19), em comparação ao verão. Isso condiz, novamente, com os resultados encontrados em Tachinardi et al. (2017), onde, no inverno, o horário mais vantajoso para os animais estarem ativos era dependente dos valores de temperatura ambiental ao longo do dia. Dessa forma, esses resultados sustentam a ideia de que as saídas dos tuco-tucos à superfície, no inverno, estão mais relacionadas ao seu balanço energético. Outro indício que corrobora essa ideia é o comportamento de *basking*, no qual a exposição do animal ao sol gera aumento passivo da temperatura corporal (Warnecke et al., 2008). Esse comportamento costuma ser observado em pequenos mamíferos que possuem alto dispêndio energético durante o dia. Nas observações visuais dos tuco-tucos (Tomotani et al, 2012), havia sido relatado o comportamento de vigilância, que poderia ser interpretado como *basking*, e, nos dados que coletamos nesse trabalho, ocorreram episódios esporádicos em que os animais se mantiveram imóveis enquanto estavam na superfície.

A aplicação da versão simplificada da medida de temperatura operativa, da forma como utilizamos nesse trabalho, não permite prever as respostas fisiológicas do animal vivo, mas é suficiente para fazer correlações com comportamentos observados (Kenagy et al., 2002). Ao mesmo tempo, pelo fato dos tuco-tucos serem subterrâneos, poderia ser questionado se o manequim, mantido na superfície durante todo o registro, representa adequadamente o microambiente dos tuco-tucos. No subterrâneo, por exemplo, a troca de calor entre os tuco-tucos e o ambiente ocorre principalmente por condução (Buffenstein, 2000) e esse processo não é representado nas medições feitas com o manequim. Quando analisamos a relação entre os registros na superfície e a temperatura no subterrâneo, observamos que a temperatura no subterrâneo também contribui para explicar a atividade dos tuco-tucos no outono, principalmente (Figura 20; Suplementos S.2). Além disso, há trabalhos que relacionam a variação anual da profundidade em que roedores realizam suas atividades com a mudança das temperaturas em diferentes níveis abaixo do solo (Kenagy, 1973; Rado et al., 1993). Mesmo assim, isso não elimina a possibilidade de que esses animais também são influenciados pela temperatura na superfície (Rado et al., 1993; Rezende et al., 2003; Vlasatá et al., 2017).

Os modelos finais de regressão múltipla que obtivemos (Suplementos S.2) indicaram que as outras variáveis ambientais consideradas na análise, velocidade do vento e umidade relativa do ar, foram menos determinantes na ocorrência da atividade de superfície dos animais. Além disso, no geral, o poder explicativo nos nossos modelos para a variação da atividade de superfície foi menor que a metade daquele obtido em Long et al. (2005). Isso pode indicar que outros fatores não considerados na análise, como cobertura vegetal e predação (Pellman et al., 2015), possam ter maior impacto na atividade dos animais, do que consideramos inicialmente. Ao mesmo tempo, é possível que, por assumir relações lineares entre as variáveis, o modelo de regressão múltipla pode não ter representado bem as relações entre as variáveis que medimos. Como próximo passo, podemos estudar o uso de modelos mais adequados para analisar relações não-lineares, como o que foi utilizado em Vlasatá et al. (2017).

5.4. PERSPECTIVAS PARA A INVESTIGAÇÃO DOS FATORES ENDÓGENOS ASSOCIADOS À ATIVIDADE DE SUPERFÍCIE

É importante lembrar que a variação sazonal que obtivemos também se assemelha aos dados de Daan & Aschoff (1975), no qual a mudança anual do fotoperíodo foi suficiente para que ocorresse sazonalidade no padrão diário de atividade de outros mamíferos. Ao registrar a atividade dos tuco-tucos em laboratório, expostos a fotoperíodo natural, pudemos testar se a variação sazonal ocorreria mesmo se a temperatura ambiental fosse mantida constante (Rezende et al, 2003). De fato, os primeiros registros de atividade em roda que obtivemos em escala anual trouxeram indicativos de sazonalidade, principalmente por meio das variações anuais no *alfa* da atividade. O fato do ritmo de atividade em roda dos tuco-tucos apresentar essa sazonalidade, mesmo sob temperatura constante, é um indício de que a sazonalidade observada na atividade de superfície, em ambiente semi-natural, não resulta exclusivamente da variação diária da temperatura ambiental. Esse resultado corrobora a hipótese de que a sazonalidade também seja devida a mecanismos de arrastamento endógenos que resultam em diferentes padrões diários do ritmo de atividade dos tuco-tucos quando expostos a diferentes fotoperíodos ao longo do ano (Daan & Aschoff, 1975; Pittendrigh & Daan, 1976). Para explorar melhor essa hipótese, nosso grupo tem realizado experimentos baseados na transferência dos animais de campo para condições constantes de laboratório (Tomotani et al, 2012; Improta et al,

2017). As diferenças encontradas no parâmetro *alfa* dos registros atividade de animais em condições constantes, previamente capturados no verão e no inverno, constituem mais uma evidência da contribuição dos fatores endógenos para a sazonalidade do padrão diário de atividade dos tuco-tucos (Improta et al., 2017).

5.5. CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE ESTUDOS CRONBIOLÓGICOS EM CAMPO E LABORATÓRIO

Quando os animais são observados na natureza, frequentemente apresentam padrões fisiológicos e comportamentais distintos daqueles esperados segundo os experimentos em laboratório (Calisi & Bentley, 2009). Para os tuco-tucos, por exemplo, a constatação de que os indivíduos são noturnos em laboratório contrasta com as vocalizações e com o forrageamento e remoção de terra dos túneis tipicamente observados durante o dia (Tomotani et al, 2012). Esse contraste, que também foi observado em outros mamíferos, estimula a investigação das estruturas e dos mecanismos responsáveis pela determinação do horário de atividade desses animais (Smale et al., 2003; Hut et al., 2012). Além disso, também tornam clara a importância de se fazer conexões entre estudos cronobiológicos, termoenergéticos e ecológicos da mesma espécie, para entender seus padrões de atividade em diferentes condições ambientais. Nesse contexto, a possibilidade de realizar experimentos em ambiente semi-natural no estudo de ritmos de atividade é interessante, por levar em consideração o contexto ecológico do organismo, mas ainda permitir manipulações em fatores ambientais de interesse (Calisi & Bentley, 2009).

Nesse trabalho, reconhecemos também os desafios de se realizar experimentos em ambiente semi-natural. Apesar dos esforços para proteção dos animais contra predação, obtivemos taxas de recapturas menores no segundo semestre de 2016 e de 2017. Em um estudo sobre a dinâmica populacional de tuco-tucos *Ctenomys talarum*, em campo, no qual as recapturas eram feitas mensalmente, foi encontrada maior mortalidade dos indivíduos no inverno, chegando a uma probabilidade de sobrevivência de 19% (Busch et al., 1989), e o mesmo foi observado para outra espécie de roedor subterrâneo, *Thomomys talpoides* (Andersen & MacMahon, 1981). Nesse último estudo, como as temperaturas no subterrâneo chegaram a 0°C no inverno, foi levantada a possibilidade de que a maior taxa de mortalidade dos indivíduos poderia estar associada às altas demandas

energéticas dessa estação (Andersen & MacMahon, 1981). No caso dos tuco-tucos, apesar das temperaturas medidas no subterrâneo terem sido mais amenas, também há aumento da demanda energética no inverno (Tachinardi et al., 2017), o que poderia estar associado ao aumento da mortalidade, em menor grau do que observado em Andersen & MacMahon (1981). Para dar continuidade aos estudos realizados em arenas semi-naturais, com eventuais manipulações de variáveis ambientais, essas questões também devem ser levadas em consideração.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abraham, E., del Valle, H. F., Roig, F., Torres, L., Ares, J. O., Coronato, F., & Godagnone, R. (2009). Overview of the geography of the Monte Desert biome (Argentina). *Journal of Arid Environments*, 73(2), 144-153.
- Andersen, D. C., & MacMahon, J. A. (1981). Population dynamics and bioenergetics of a fossorial herbivore, *Thomomys talpoides* (Rodentia: Geomyidae), in a spruce-fir sere. *Ecological Monographs*, 51(2), 179-202.
- Aranda-Rickert, A. (2014). Flora del parque geológico Sanagasta. Serie Ciencias Naturales CRILAR. Córdoba: Editorial Brujas.
- Aschoff, J. (1963). Comparative physiology: diurnal rhythms. *Annual review of physiology*, 25(1), 581-600.
- Bakken, G. S. (1980). The use of standard operative temperature in the study of the thermal energetics of birds. *Physiological Zoology*, 53(1), 108-119.
- Bakken, G. S., Santee, W. R., & Erskine, D. J. (1985). Operative and standard operative temperature: tools for thermal energetics studies. *American Zoologist*, 25(4), 933-943.
- Baldi, B., & Moore, D. S. (2014). *The practice of statistics in the life sciences*. WH Freeman and Company.
- Bartness, T. J., & Albers, H. E. (2000). Activity patterns and the biological clock in mammals. In *Activity patterns in small mammals* (pp. 23-47). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Beale, A. D., Whitmore, D., & Moran, D. (2016). Life in a dark biosphere: a review of circadian physiology in “arrhythmic” environments. *Journal of Comparative Physiology B*, 1-22.
- Begall, S., Daan, S., Burda, H., & Overkamp, G. J. F. (2002). Activity patterns in a subterranean social rodent, *Spalacopus cyanus* (Octodontidae). *Journal of Mammalogy*, 83(1), 153-158.
- Begall, S., Burda, H., & Schleich, C. E. (2007). Subterranean rodents: news from underground. In *Subterranean Rodents* (pp. 3-9). Springer Berlin Heidelberg.
- Ben-Shlomo, R., Ritte, U., & Nevo, E. (1995). Activity pattern and rhythm in the subterranean mole rat superspecies *Spalax ehrenbergi*. *Behavior genetics*, 25(3), 239-245.
- Benedito-Silva, A. A. (2003). Aspectos metodológicos da cronobiologia. *Cronobiologia: Princípios e Aplicações* (N. Marques & L. Menna-Barreto, orgs.). Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, pp. 297-320.

- Benedix Jr, J. H. (1994). A predictable pattern of daily activity by the pocket gopher *Geomys bursarius*. *Animal Behaviour*, 48(3), 501-509.
- Bennett, A. F., Huey, R. B., John-Alder, H., & Nagy, K. A. (1984). The parasol tail and thermoregulatory behavior of the Cape ground squirrel *Xerus inauris*. *Physiological Zoology*, 57-62.
- Binkley, S. (1993). Structures and molecules involved in generation and regulation of biological rhythms in vertebrates and invertebrates. *Experientia*, 49 (8), 648-653.
- Borghi, C. E., Giannoni, S. M., & Roig, V. G. (2002). Eye reduction in subterranean mammals and eye protective behavior in *Ctenomys*. *Mastozoología Neotropical*, 9(2), 123-134.
- Buffenstein, R. (2000). Ecophysiological responses of subterranean rodents to underground habitats. In: *Life underground: the biology of subterranean rodents* (EA Lacey, JL Patton, and GN Cameron, eds.). University of Chicago Press, Illinois, 62-110.
- Busch, C., Malizia, A. I., Scaglia, O. A., & Reig, O. A. (1989). Spatial distribution and attributes of a population of *Ctenomys talarum* (Rodentia: Octodontidae). *Journal of Mammalogy*, 70(1), 204-208.
- Busch, C., Antinuchi, C. D., del Valle, J. C., Kittlein, M., Malizia, A. I., Vassallo, A. I., & Zenuto, R. R. (2000). Population ecology of subterranean rodents. In: *Life underground: the biology of subterranean rodents* (EA Lacey, JL Patton, and GN Cameron, eds.). University of Chicago Press, Illinois, 183-226.
- Calisi, R. M., & Bentley, G. E. (2009). Lab and field experiments: are they the same animal?. *Hormones and Behavior*, 56(1), 1-10.
- Chappell, M. A. (1980). Insulation, radiation, and convection in small arctic mammals. *Journal of Mammalogy*, 61(2), 268-277.
- Chappell, M. A., & Bartholomew, G. A. (1981a). Standard operative temperatures and thermal energetics of the antelope ground squirrel *Ammospermophilus leucurus*. *Physiological Zoology*, 54(1), 81-93.
- Chappell, M. A., & Bartholomew, G. A. (1981b). Activity and thermoregulation of the antelope ground squirrel *Ammospermophilus leucurus* in winter and summer. *Physiological Zoology*, 54(2), 215-223.
- Collins, P. M., Green, J. A., Warwick-Evans, V., Dodd, S., Shaw, P. J., Arnould, J. P., & Halsey, L. G. (2015). Interpreting behaviors from accelerometry: a method combining simplicity and objectivity. *Ecology and evolution*, 5(20), 4642-4654.

- Cutrerá, A. P., Antinuchi, C. D., Mora, M. S., & Vassallo, A. I. (2006). Home-range and activity patterns of the South American subterranean rodent *Ctenomys talarum*. *Journal of Mammalogy*, 87(6), 1183-1191.
- Daan, S. & Aschoff, J. (1975). Circadian rhythms of locomotor activity in captive birds and mammals: their variations with season and latitude. *Oecologia*, 18(4), 269-316.
- Dominoni, D. M., Åkesson, S., Klaassen, R., Spoelstra, K., & Bulla, M. (2017). Methods in field chronobiology. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 372(1734), 20160247.
- Dunlap JC, Loros JJ, DeCoursey PJ (2004) *Chronobiology: Biological timekeeping*. Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts.
- Elliott, J. A. (1976). Circadian rhythms and photoperiodic time measurement in mammals. In *Federation proceedings* (Vol. 35, No. 12, pp. 2339-2346).
- Estevan, I., Lacey, E., & Tassinó, B. (2016). Daily patterns of activity in free-living Rio Negro tuco-tucos (*Ctenomys rionegrensis*). *Mastozoología neotropical*, 23(1), 71-80.
- Flôres, D. E., Jannetti, M. G., Valentinuzzi, V. S., & Oda, G. A. (2016). Entrainment of circadian rhythms to irregular light/dark cycles: a subterranean perspective. *Scientific Reports*, 6.
- Forrest, J., & Miller-Rushing, A. J. (2010). Toward a synthetic understanding of the role of phenology in ecology and evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 365, 3101-3112.
- Fracchia, S., Krapovickas, L., Aranda-Rickert, A., & Valentinuzzi, V. S. (2011). Dispersal of arbuscular mycorrhizal fungi and dark septate endophytes by *Ctenomys cf. knighti* (Rodentia) in the northern Monte Desert of Argentina. *Journal of Arid Environments*, 75(11), 1016-1023.
- Gettínger, R. D. (1984). A field study of activity patterns of *Thomomys bottae*. *Journal of Mammalogy*, 65(1), 76-84.
- Golombek, D. A., & Rosenstein, R. E. (2010). Physiology of circadian entrainment. *Physiological reviews*, 90(3), 1063-1102.
- Halle, S., & Stenseth, N. C. (2000). Introduction. In *Activity patterns in small mammals* (pp. 3-17). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Halle, S., & Weinert, D. (2000). Measuring and analysing activity of small mammals in the laboratory and in the field. In *Activity patterns in small mammals* (pp. 285-312). Springer, Berlin, Heidelberg.

- Heldmaier, G., & Steinlechner, S. (1981). Seasonal control of energy requirements for thermoregulation in the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*), living in natural photoperiod. *Journal of comparative physiology*, 142(4), 429-437.
- Hut, R. A., Mrosovsky, N., & Daan, S. (1999). Nonphotic entrainment in a diurnal mammal, the European ground squirrel (*Spermophilus citellus*). *Journal of Biological Rhythms*, 14(5), 409-420.
- Hut, R. A. (2001). Natural entrainment of circadian systems: A study in the diurnal ground squirrel, *Spermophilus citellus*. Groningen: s.n.
- Hut, R. A., Kronfeld-Schor, N., van der Vinne, V., & De la Iglesia, H. (2012). In search of a temporal niche: environmental factors. In *Progress in brain research* (Vol. 199, pp. 281-304). Elsevier.
- Improta, G. C., Valentinuzzi, V. S., Oda, G. A. (2017, Outubro). Aftereffects of Natural Summer and Winter Photoperiods in Subterranean Rodents (*Ctenomys aff. knighti*). Poster apresentado no “25° Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo – International Stage”, São Paulo, SP.
- Jarvis, J. U. H. (1973). Activity patterns in the mole-rats *Tachyoryctes splendens* and *Heliophobius argenteocinereus*. *African Zoology*, 8(1), 101-119.
- Kenagy, G. J. (1973). Daily and seasonal patterns of activity and energetics in a heteromyid rodent community. *Ecology*, 54(6), 1201-1219.
- Kenagy, G. J. (1976). The periodicity of daily activity and its seasonal changes in free-ranging and captive kangaroo rats. *Oecologia*, 24(2), 105-140.
- Kenagy, G. J., Nespolo, R. F., Vásquez, R. A., & Bozinovic, F. (2002). Daily and seasonal limits of time and temperature to activity of degus. *Revista Chilena de Historia Natural*, 75, 567-581.
- Labraga, J. C., & Villalba, R. (2009). Climate in the Monte Desert: past trends, present conditions, and future projections. *Journal of Arid Environments*, 73(2), 154-163.
- Lacey, E. A., Patton, J. L., Cameron, G. N. (2000). Introduction. In: *Life underground: the biology of subterranean rodents* (EA Lacey, JL Patton, and GN Cameron, eds.). University of Chicago Press, Illinois, 1-14.
- Long, R. A., Martin, T. J., & Barnes, B. M. (2005). Body temperature and activity patterns in free-living arctic ground squirrels. *Journal of Mammalogy*, 86(2), 314-322.
- Lovegrove, B. G., Heldmaier, G., Ruf, T. (1993). Circadian activity rhythms in colonies of 'blind' mole rats, *Cryptomys damarensis* (Bathyergidae). *African Zoology*, 28 (1), 46-55.

- Lovegrove, B. G., & Muir, A. (1996). Circadian body temperature rhythms of the solitary cape mole rat *Georychus capensis* (Bathyergidae). *Physiology & behavior*, 60 (3), 991-998.
- Marques, M. D., Golombek, D., & Moreno, C. (2003). Adaptação temporal. *Cronobiologia: Princípios e Aplicações* (N. Marques & L. Menna-Barreto, orgs.). Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, pp. 55-98.
- Marques, M. D., & Waterhouse, J. (2004). Rhythms and ecology—do chronobiologists still remember nature?. *Biological Rhythm Research*, 35(1-2), 1-2.
- Moore-Ede, M. C., Sulzman, F. M., & Fuller, C. A. (1982). *The clocks that time us*. Harvard, Cambridge (USA).
- Nevo, E., Guttman, R., Haber, M., & Erez, E. (1982). Activity patterns of evolving mole rats. *Journal of Mammalogy*, 63(3), 453-463.
- Pellman, B. A., Kim, E., Reilly, M., Kashima, J., Motch, O., Horacio, O., & Kim, J. J. (2015). Time-specific fear acts as a non-photoc entraining stimulus of circadian rhythms in rats. *Scientific reports*, 5, 14916.
- Pittendrigh, C. S., & Daan, S. (1976). A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. *Journal of comparative physiology*, 106(3), 291-331.
- Rado, R., Shanas, U., Zuri, I., & Terkel, J. (1993). Seasonal activity in the blind mole rat (*Spalax ehrenbergi*). *Canadian Journal of Zoology*, 71(9), 1733-1737.
- Randall, D., Burggren, W. W., French, K., & Eckert, R. (2002). *Eckert animal physiology*. 5th ed. New York: WH Freeman and Co.
- Refinetti, R. (2016). *Circadian Physiology*. 3rd ed. CRC press.
- Rezende, E. L., Cortés, A., Bacigalupe, L. D., Nespolo, R. F., & Bozinovic, F. (2003). Ambient temperature limits above-ground activity of the subterranean rodent *Spalacopus cyanus*. *Journal of Arid Environments*, 55(1), 63-74.
- Ropert-Coudert, Y., & Wilson, R. P. (2005). Trends and perspectives in animal-attached remote sensing. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 3(8), 437-444.
- Rotenberg, L., Marques, N., & Menna-Barreto, L. (2003). História e perspectivas da cronobiologia. *Cronobiologia: Princípios e Aplicações* (N. Marques & L. Menna-Barreto, orgs.). Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, pp. 31-53.
- Schmidt-Nielsen, K. (1997). *Animal physiology: adaptation and environment*. 5th ed. Cambridge University Press.

- Sikes, R. S., Gannon, W. L. Animal Care and Use Committee of the American Society of Mammalogists. (2011). Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research. *Journal of Mammalogy*, 92(1), 235-253.
- Šklíba, J., Šumbera, R., Chitaukali, W. N., & Burda, H. (2007). Determinants of daily activity patterns in a free-living Afrotropical solitary subterranean rodent. *Journal of Mammalogy*, 88(4), 1009-1016.
- Šklíba, J., Lövy, M., Koeppen, S. C., Pleštilová, L., Vitámvás, M., Nevo, E., & Šumbera, R. (2016). Activity of free-living subterranean blind mole rats *Spalax galili* (Rodentia: Spalacidae) in an area of supposed sympatric speciation. *Biological Journal of the Linnean Society*, 118(2), 280-291.
- Smale, L., Lee, T., & Nunez, A. A. (2003). Mammalian diurnality: some facts and gaps. *Journal of biological rhythms*, 18(5), 356-366.
- Spoelstra, K., Albrecht, U., van der Horst, G. T., Brauer, V., & Daan, S. (2004). Phase responses to light pulses in mice lacking functional *per* or *cry* genes. *Journal of biological rhythms*, 19(6), 518-529.
- Spruijt, B. M. & DeVisser, L. (2006). Advanced behavioural screening: automated home cage ethology. *Drug Discovery Today: Technologies*, 3(2), 231-237.
- Tachinardi, P., Bicudo, J. E. W., Oda, G. A., & Valentinuzzi, V. S. (2014). Rhythmic 24 h Variation of Core Body Temperature and Locomotor Activity in a Subterranean Rodent (*Ctenomys aff. knighti*), the Tuco-Tuco. *PloS one*, 9(1).
- Tachinardi, P., Valentinuzzi, V. S., Oda, G. A., & Buck, C. L. (2017). The Interplay of Energy Balance and Daily Timing of Activity in a Subterranean Rodent: A Laboratory and Field Approach. *Physiological and Biochemical Zoology*, 90(5), 546-552.
- Tattersall, I. (2006). The concept of cathemerality: history and definition. *Folia Primatologica*, 77(1-2), 7-14.
- Tomotani, B. M. (2011). Pós-efeitos da sincronização em campo e a fase de atividade do roedor subterrâneo tuco-tuco (Rodentia: Ctenomyidae). Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.
- Tomotani, B. M., Flores, D. E., Tachinardi, P., Paliza, J. D., Oda, G. A., & Valentinuzzi, V. S. (2012). Field and laboratory studies provide insights into the meaning of day-time activity in a subterranean rodent (*Ctenomys aff. knighti*), the tuco-tuco. *PloS one*, 7(5), e37918.
- Tyler, N. J., Gregorini, P., Forchhammer, M. C., Stokkan, K. A., van Oort, B. E., & Hazlerigg, D. G. (2016). Behavioral Timing without Clockwork: Photoperiod-Dependent Trade-Off

between Predation Hazard and Energy Balance in an Arctic Ungulate. *Journal of biological rhythms*, 31(5), 522-533.

Urrejola, D., Lacey, E. A., Wieczorek, J. R., & Ebensperger, L. A. (2005). Daily activity patterns of free-living cururos (*Spalacopus cyanus*). *Journal of Mammalogy*, 86(2), 302-308.

Valentinuzzi, V. S., Oda, G. A., Araujo, J. F., & Ralph, M. R. (2009). Circadian Pattern of Wheel-Running Activity of a South American Subterranean Rodent (*Ctenomys cf knightii*). *Chronobiology international*, 26(1), 14-27.

Vassallo, A. I., Kittlein, M. J., & Busch, C. (1994). Owl predation on two sympatric species of tuco-tucos (Rodentia: Octodontidae). *Journal of Mammalogy*, 725-732.

Vassallo, A. I. (1998). Functional morphology, comparative behaviour, and adaptation in two sympatric subterranean rodents genus *Ctenomys* (Caviomorpha: Octodontidae). *Journal of Zoology*, 244(3), 415-427.

Vlasatá, T., Šklíba, J., Lövy, M., Meheretu, Y., Sillero-Zubiri, C., & Šumbera, R. (2017). Daily activity patterns in the giant root rat (*Tachyoryctes macrocephalus*), a fossorial rodent from the Afro-alpine zone of the Bale Mountains, Ethiopia. *Journal of Zoology*, 302(3), 157-163.

Vorhees, C. V., Acuff-Smith, K. D., Minck, D. R., & Butcher, R. E. (1992). A method for measuring locomotor behavior in rodents: contrast-sensitive computer-controlled video tracking activity assessment in rats. *Neurotoxicology and teratology*, 14(1), 43-49.

Ware, J. V., Nelson, O. L., Robbins, C. T., & Jansen, H. T. (2012). Temporal organization of activity in the brown bear (*Ursus arctos*): roles of circadian rhythms, light, and food entrainment. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 303(9), R890-R902.

Warnecke, L., Turner, J. M., & Geiser, F. (2008). Torpor and basking in a small arid zone marsupial. *Naturwissenschaften*, 95(1), 73-78.

Williams, C. T., Wilsterman, K., Zhang, V., Moore, J., Barnes, B. M., & Buck, C. L. (2016). The secret life of ground squirrels: accelerometry reveals sex-dependent plasticity in above-ground activity. *Royal Society open science*, 3(9), 160404.

SUPLEMENTOS

S.1. CÁLCULO DO ONSET DE ATIVIDADE

A maior sensibilidade do acelerômetro para detectar a atividade dos animais resulta em registros com maior número de ocorrências por dia e com diferentes intensidades de atividade. Essa característica dificultou a determinação computadorizada e automática do onset de atividade. Devido ao grande volume de dados, a determinação visual, realizada por um ou mais observadores (Kenagy, 1976), foi impraticável. Houve, então, a necessidade de buscar, na literatura, definições de onset que fossem adequadas para esse tipo de registro. A adoção do método utilizado nesse trabalho foi o resultado de cinco tentativas:

1. Com base em trabalhos que realizaram observações visuais e registros com câmeras (Hut, 2001; Ware et al., 2012), o onset é definido como o primeiro comportamento de atividade do animal observado no dia. Para os dados do acelerômetro, isso foi traduzido como o primeiro valor positivo do dia, ou seja, o primeiro horário em que a diferença entre um valor e o seu anterior seja positiva (Figura 24). Ao aplicarmos essa definição a um dos registros obtidos no experimento em arena semi-natural, todas as marcações de onset foram feitas em torno de 00:00 e não corresponderam ao início da atividade observado visualmente (Figura 25).

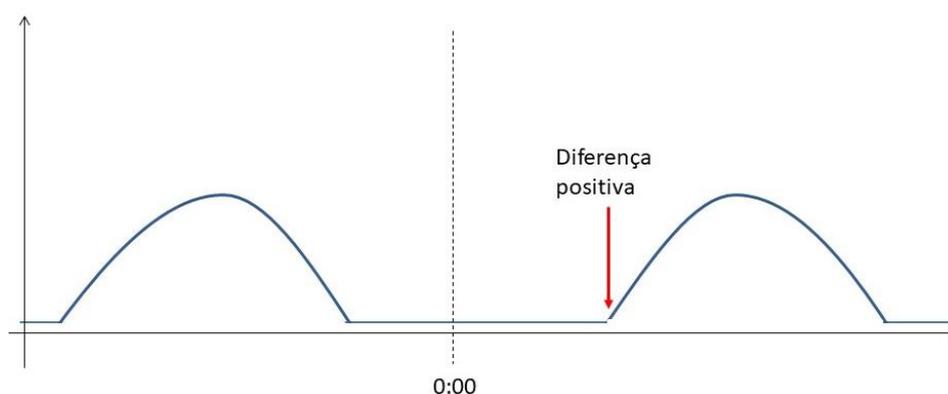


Figura 24. Ilustração da primeira tentativa de definição de onset de um registro de atividade hipotético. Linha vertical pontilhada: início do dia. Seta vermelha: marcação do onset.

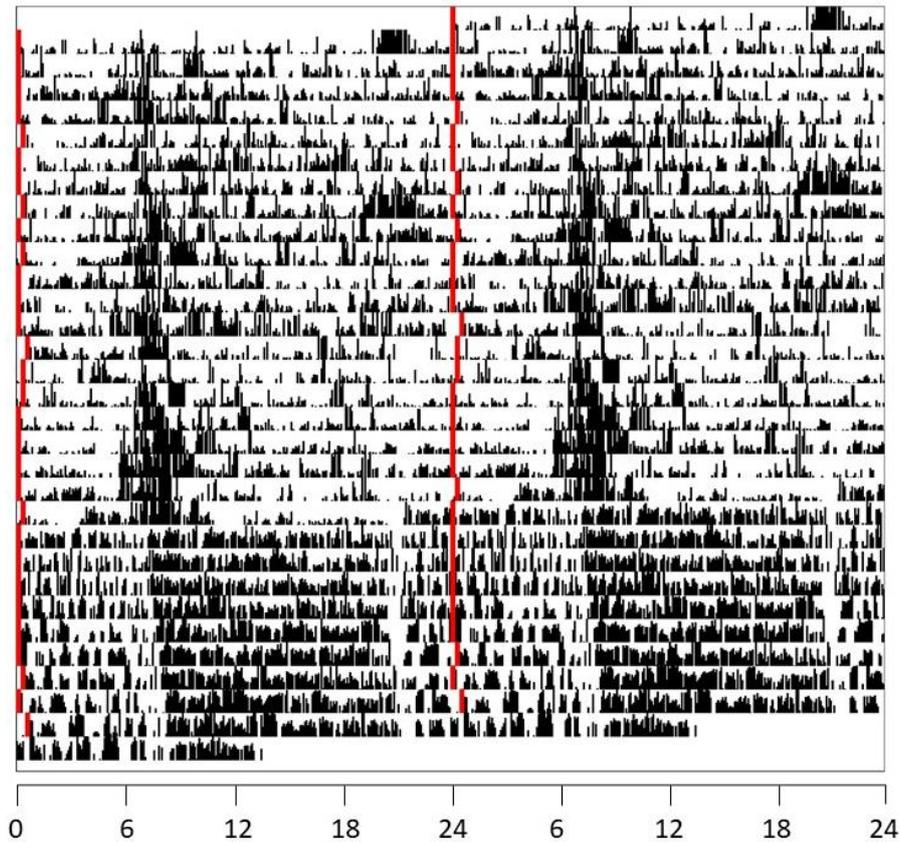


Figura 25. Aplicação da primeira tentativa de definição de onset em um registro de atividade obtido em arena semi-natural, com uso de acelerômetro. Os horários de onset obtidos estão marcados em vermelho.

2. Acrescentamos à definição de atividade uma restrição em relação à sua duração de tempo. Tyler et al. (2016) consideraram um episódio de atividade apenas quando sua duração era de 15 minutos ou mais. Para os dados do acelerômetro, definimos que essa restrição corresponderia à ocorrência de três diferenças positivas consecutivas. O onset seria o horário em que essa sequência se inicia (Figura 26). Ao aplicarmos essa nova regra, vimos que as marcações ainda foram sensíveis a episódios que também não corresponderiam à definição de onset por observação visual (Figura 27).

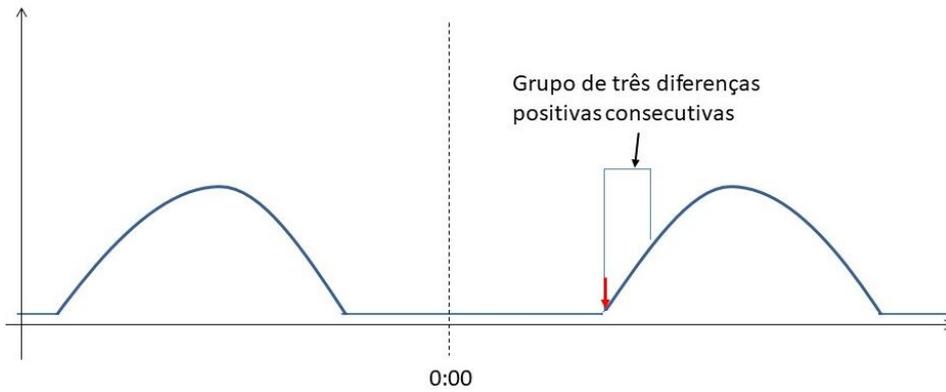


Figura 26. Ilustração da segunda tentativa de definição de onset de um registro de atividade hipotético. Linha vertical pontilhada: início do dia. Seta vermelha: marcação do onset.

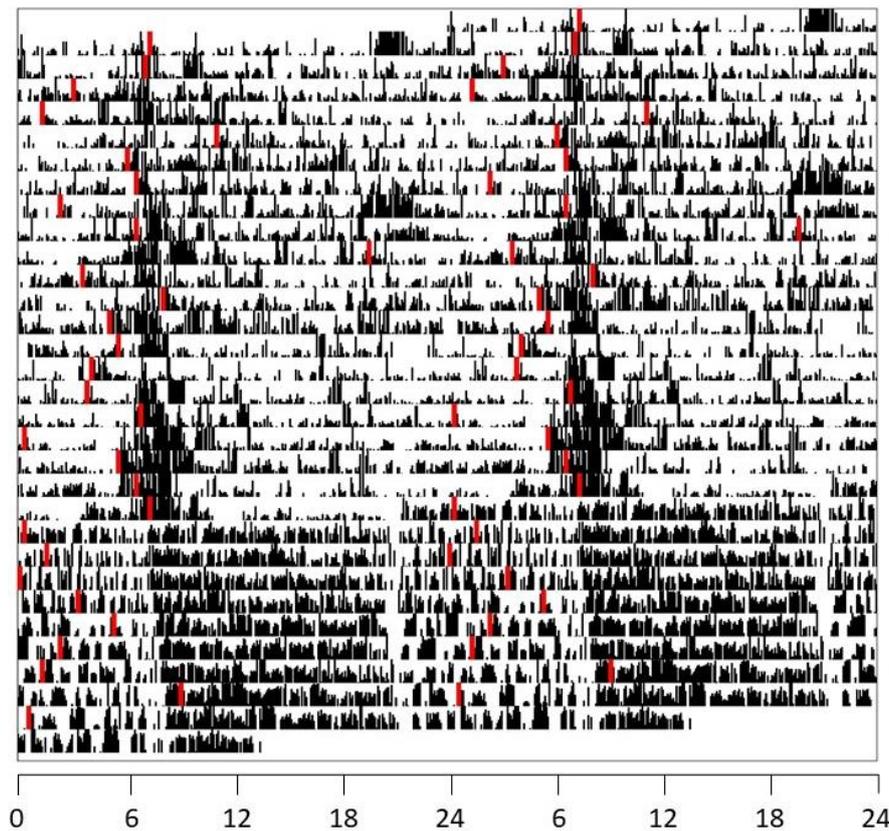


Figura 27. Aplicação da segunda tentativa de definição de onset em um registro de atividade obtido em arena semi-natural, com uso de acelerômetro. Os horários de onset obtidos estão marcados em vermelho.

3. Como uma simplificação do método empregado em Spoelstra et al. (2004), definimos o onset como o primeiro valor do dia a ultrapassar um limiar determinado. Escolhemos como limiar o valor correspondente a $\frac{1}{4}$ do máximo encontrado no registro do animal (Figura 28). Ao aplicar essa definição de onset ao registro de

atividade do acelerômetro, as marcações obtidas se assemelharam mais ao que seria esperado conforme observação visual, porém ainda não foi eficaz para grande parte dos dias registrados (Figura 29).

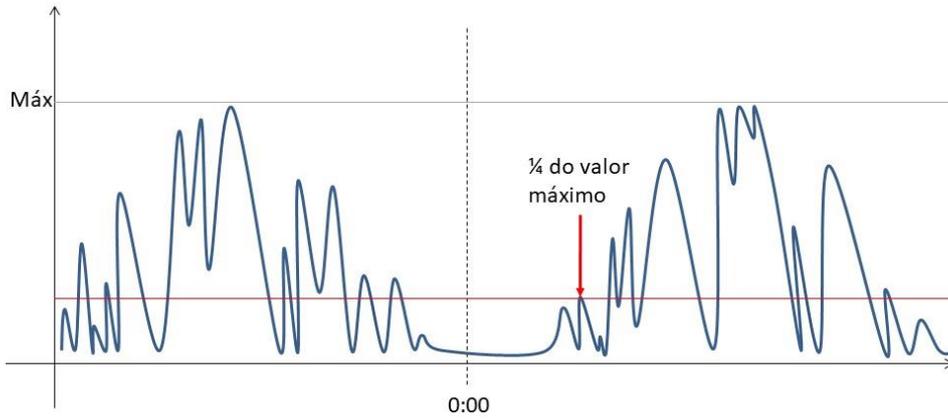


Figura 28. Ilustração da terceira tentativa de definição de onset de um registro de atividade hipotético. Linha vertical pontilhada: início do dia. Seta vermelha: marcação do onset.

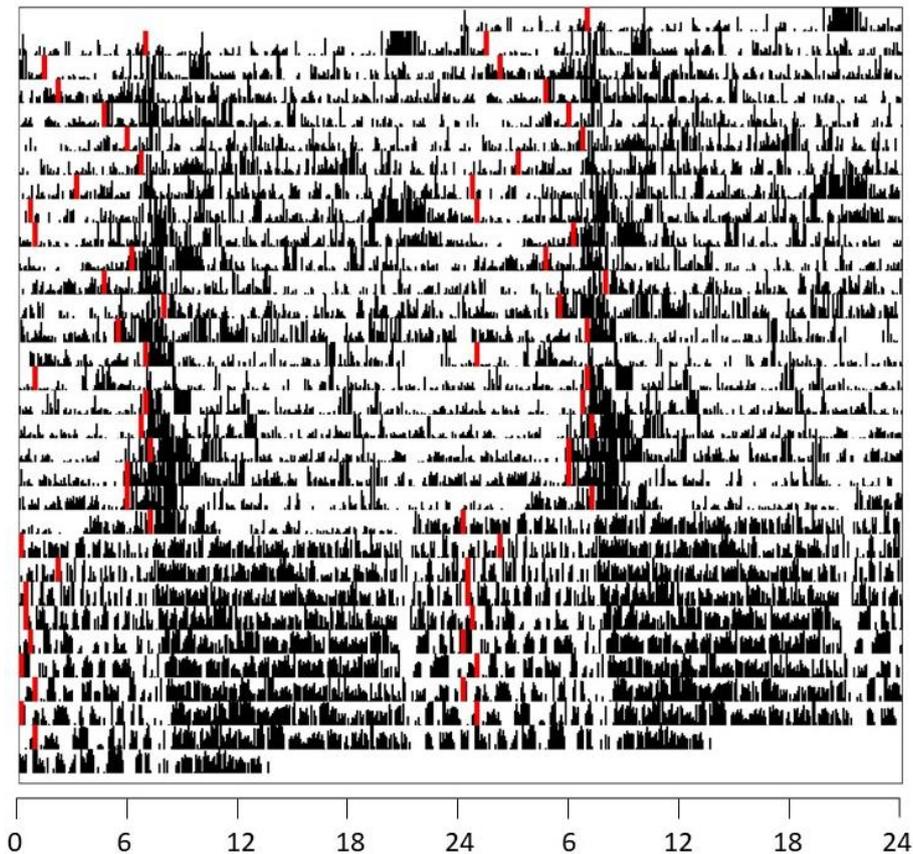


Figura 29. Aplicação da terceira tentativa de definição de onset em um registro de atividade obtido em arena semi-natural, com uso de acelerômetro. Os horários de onset obtidos estão marcados em vermelho.

4. Com base em Hut et al. (1999), utilizamos a média móvel dos registros diários para determinar o limiar que marcaria o início da fase ativa. Calculamos a média móvel dos dados utilizando janelas de 6 e 24 horas. O primeiro ponto em que as duas médias coincidem correspondeu ao onset (Figura 30). Esse método de determinação do onset foi o que mais se aproximou da marcação que seria feita por observação visual (Figura 31). Apesar disso, ao expandirmos a aplicação desse método para determinação do offset, como o último ponto de encontro entre as médias, alguns registros apresentaram erros, marcando offsets mais adiantados (Figura 32).

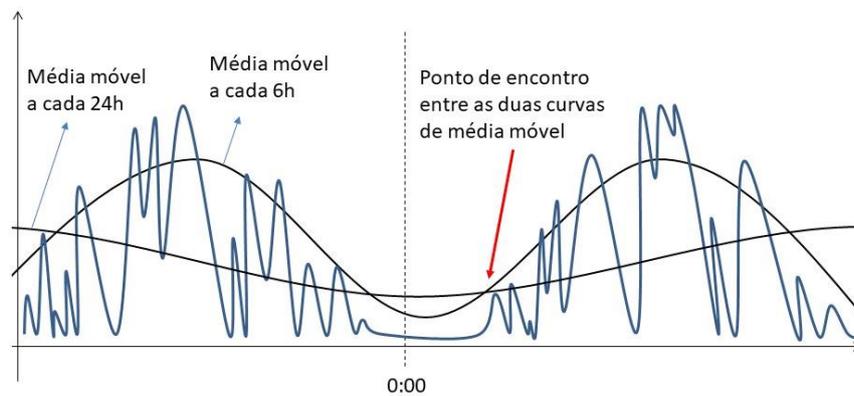


Figura 30. Ilustração da quarta tentativa de definição de onset de um registro de atividade hipotético. Linha vertical pontilhada: início do dia. Seta vermelha: marcação do onset.

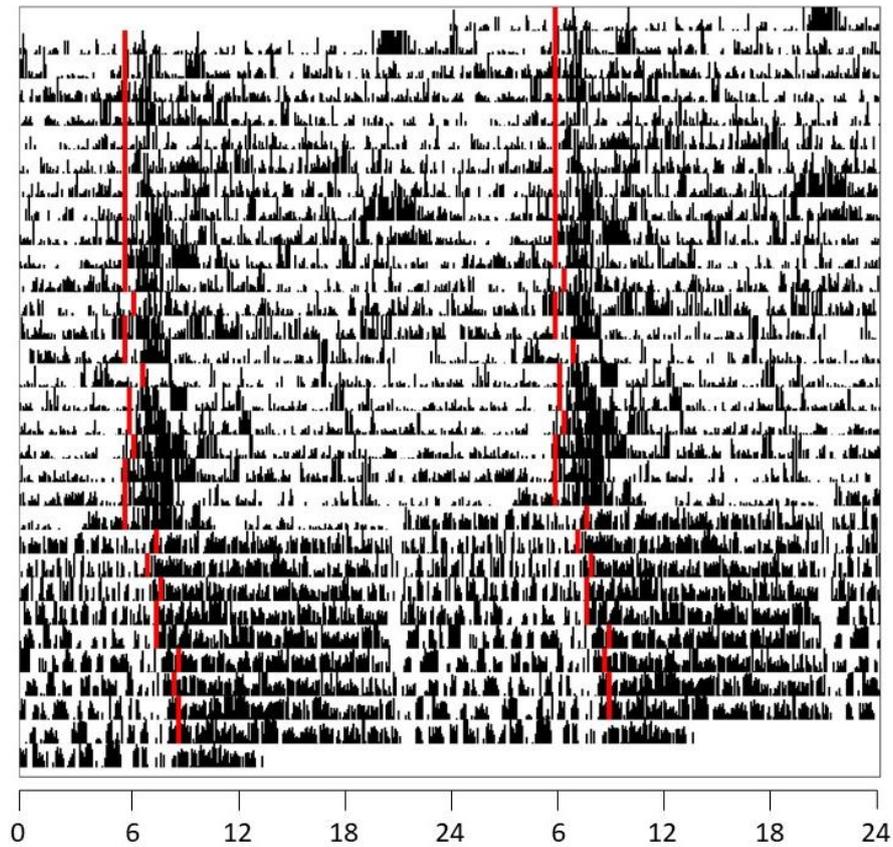


Figura 31. Aplicação da quarta tentativa de definição de onset em um registro de atividade obtido em arena semi-natural, com uso de acelerômetro. Os horários de onset obtidos estão marcados em vermelho.

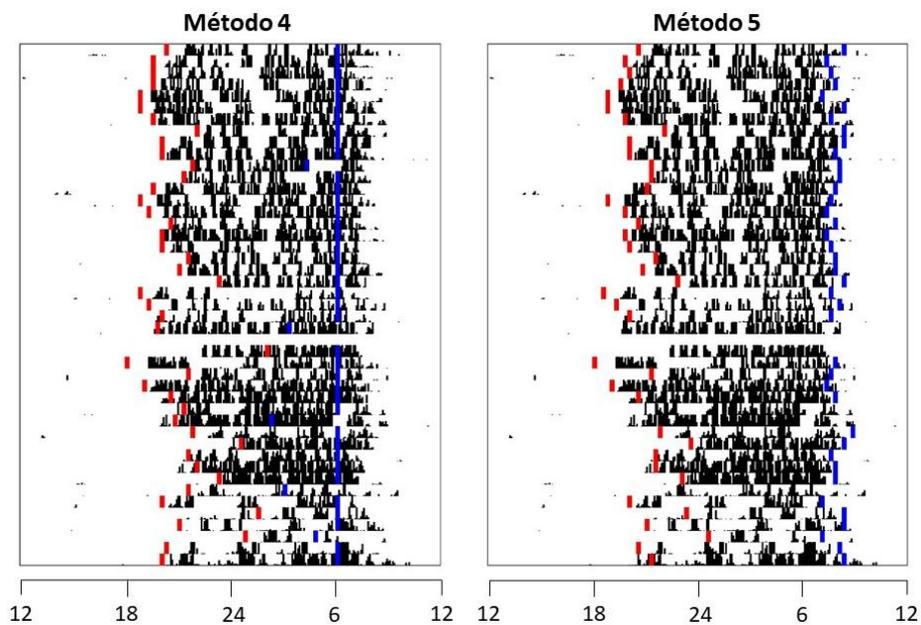


Figura 32. Comparação entre o quarto e o quinto métodos utilizados para determinar onset e offset, em um registro de atividade em roda, obtido em laboratório. Os horários de onset estão marcados em vermelho e de offset, em azul.

5. Decidimos, por fim, que o onset corresponderia ao primeiro ponto de encontro entre a média aritmética e a média móvel dos dados, utilizando janela de 6 horas, e o offset seria o último ponto de encontro entre as médias (Figura 33). Esse foi o método mais eficaz para os dados coletados e, portanto, foi o adotado para realizar as análises desse trabalho.

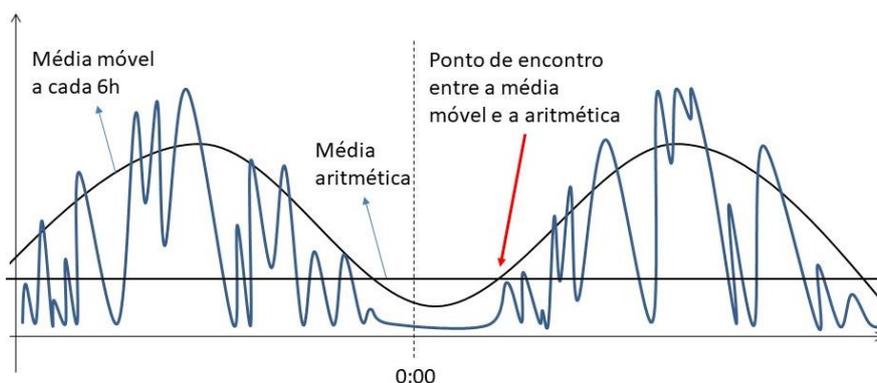


Figura 33. Ilustração da quinta tentativa de definição de onset de um registro de atividade hipotético. Linha vertical pontilhada: início do dia. Seta vermelha: marcação do onset.

S.2. CONSIDERAÇÕES SOBRE A ANÁLISE DE REGRESSÃO MÚLTIPLA

De acordo com o realizado em Long et al. (2005), a variável *hora* foi incluída no formato numérico e foram utilizados os dados brutos das variáveis restantes, com exceção da velocidade do vento, que foi transformada em logaritmo, e do tempo de permanência na superfície, para o qual calculamos o arco-seno da raiz quadrada dos dados brutos. Essas variáveis retornaram os seguintes modelos finais, resumidos na tabela IV.

As variáveis ambientais consideradas são capazes de explicar 16.3% da variação dos dados para a estação de verão, 4% para o outono, 16.3% para o inverno e 17.9% para a primavera. As variáveis com maior poder explicativo foram o horário do dia, no verão, a temperatura operativa, no inverno e outono, e a temperatura a 20cm abaixo do solo, na primavera.

Tabela IV. Resumo do modelo final de regressão múltipla obtido para cada estação do ano, utilizando metodologia semelhante à de Long et al. (2005).

Estação	Variáveis do modelo final	R²	P	n
Verão	hora; tempop; hora:tempop	0.1626	<0.001	399
Outono	tempop; tempsub; vvento	0.04006	<0.001	798
Inverno	tempop; tempsub	0.1627	<0.001	467
Primavera	tempsub; hr	0.1788	<0.001	118

Devido ao fato do horário do dia não possuir variação linear, a estimativa da sua contribuição para explicar a variação dos dados é prejudicada nesse tipo de análise. A inclusão de *hora* em formato numérico pressupõe que o tempo aumenta de forma linear até às 23:00 e diminui abruptamente às 00:00, o que não representa adequadamente a forma como essa variável se modifica. Refizemos a análise incluindo *hora* como variável categórica (nomeada *horacat*), como uma tentativa de melhor representar sua variação. Com essa modificação, o poder explicativo dos modelos finais para as estações de verão, outono e inverno aumentou, enquanto que, na primavera, não houve alterações (Tabela V). No outono e inverno, os modelos finais contêm variáveis representando o efeito interativo entre o horário do dia e a temperatura operativa (*horacat:tempop*) e entre o horário do dia e a temperatura no subterrâneo (*horacat:tempsub*), sugerindo que o efeito do horário sobre o tempo que os animais permanecem na superfície é dependente da temperatura. Isso está de acordo com o que observamos quando esses pares de variáveis independentes são considerados em conjunto para explicar a atividade de superfície, nas figuras 19 e 20.

Tabela V. Resumo do modelo final de regressão múltipla obtido para cada estação, utilizando a variável *hora* como categórica.

Estação	Variáveis do modelo final	R²	P	n
Verão	horacat; tempop	0.2153	<0.001	399
Outono	tempop; tempsub; vvento; horacat:tempop	0.06604	<0.001	798
Inverno	tempop; horacat:tempsub	0.1847	<0.001	467
Primavera	tempsub; hr	0.1788	<0.001	118

As variações de temperatura, umidade e velocidade do vento são cíclicas, se repetindo diariamente e anualmente. Dessa forma, existe interação entre as variáveis ambientais e o tempo nos dados coletados em campo. A inclusão dos dados brutos na análise de

regressão dificulta a separação da contribuição das variáveis ambientais da contribuição do tempo. Nesse sentido, tentamos realizar essa separação ajustando modelos de regressão linear simples de cada variável ambiental em função de horacat e extraímos os valores residuais desses modelos (Baldi & Moore, 2014). Refizemos novamente a análise de regressão múltipla, substituindo os dados brutos das temperaturas (operativa e a 20 cm abaixo do solo), umidade e velocidade do vento pelos seus respectivos valores residuais, nomeando-os com .res. Essa modificação resultou na inclusão de horacat nos modelos finais de todas as estações, com aumento do poder explicativo do modelo final para a primavera (Tabela VI). O modelo final para o verão manteve o mesmo poder explicativo, em relação à tabela V, mostrando que pelo menos parte da contribuição de tempop era independente do horário do dia. Por fim, a inclusão de ID no inverno evidencia a importância da variabilidade interindividual na atividade de superfície dos animais.

Tabela VI. Resumo do modelo final de regressão múltipla obtido para cada estação, utilizando a variável *hora* como categórica e os valores residuais das variações ambientais em função do tempo.

Estação	Variáveis do modelo final	R²	P	n
Verão	horacat; tempop.res	0.2153	<0.001	399
Outono	horacat; horacat:tempsub.res	0.0661	<0.001	798
Inverno	horacat; hr.res; vvento.res; ID	0.1838	<0.001	467
Primavera	horacat; tempsub.res; hr.res	0.224	<0.001	118