

Ritmo circadiano e atividade locomotora em *Bothrops jararacussu* (Serpentes, Viperidae)

José Geraldo Pereira da Cruz

Universidade Regional de Blumenau
Centro de Ciências Exatas e Naturais – Departamento de Ciências Naturais
Rua Antônio da Veiga, 140
CEP 89010-971 – Blumenau – Santa Catarina
jgcruz@furb.br

Submetido em 02/02/2007
Aceito para publicação em 09/07/2007

Resumo

Muitos parâmetros bioquímicos, fisiológicos e comportamentais exibidos pelos organismos mostram uma flutuação diária que persiste quando os organismos são mantidos em condições constantes do ambiente, demonstrando que são controlados por osciladores endógenos. Temporalmente, a atividade locomotora em répteis é limitada através do sistema circadiano. A relativa estabilidade das vias e a diversidade na atividade motora no ciclo sugerem que o comportamento possa apresentar mecanismos de regulação e conservação. Neste experimento, o comportamento de *Bothrops jararacussu* foi analisado em animais mantidos durante 24h de ciclo claro/escuro e ciclo escuro/claro; para determinar se os aspectos comportamentais são conservados. *Bothrops jararacussu* mostra um padrão de atividade noturna monofásica durante o ciclo claro/escuro, com um ritmo em livre curso. O ritmo de atividade locomotora desaparece no ciclo escuro/claro. Muitos parâmetros exibidos pelos organismos mostram flutuações diárias que, quando persistentes no organismo, são mantidas pelas condições constantes do ambiente.

Unitermos: atividade locomotora, ritmo circadiano, serpentes

Abstract

Circadian rhythm of locomotor activity in *Bothrops jararacussu* (Serpentes: Viperidae). Many biochemical, physiological, and behavioral parameters exhibited by organisms show daily fluctuations, and most of these fluctuations persist when the organisms are maintained in constant environmental conditions, thus demonstrating that they are driven by an endogenous oscillator. Locomotor activity in reptiles is restricted temporally by the circadian system. The relative stability of the patterns and the amount of locomotor activity per cycle suggest that this behavior may be regulated by some conservative mechanism. In the present study, the behavior of *Bothrops jararacussu* was analyzed under animals housed in 24h light/dark cycle and dark/light cycle, to determine which aspects of this behavior were conserved. The *Bothrops jararacussu* displayed a nocturnal activity preference with monophasic activity patterns during the light/dark cycles, and this shows a free-running rhythm. The rhythm of locomotor activity disappears in the 24h dark/light cycle. Many parameters exhibited by organisms show daily fluctuations that may persist when the organisms are held in constant environmental conditions.

Key words: locomotion activity, circadian rhythm, snakes

Introdução

Muitas espécies apresentam comportamento sincronizado em ciclos de 24 horas de claro/escuro, com características noturnas, diurnas ou crepusculares, baseadas na proporção de atividade que ocorre durante este ciclo. Os parâmetros comportamentais mostram uma flutuação que podem persistir quando o organismo é mantido em ciclos constantes de claro/escuro, mostrando que estes são controlados por osciladores endógenos influenciados pelos fotoperíodos (Murphy e Campbell, 1996). Na ausência de variações externas, as oscilações contínuas são expressões intrínsecas dos relógios biológicos, refletindo o estado fisiológico controlado pelo marca-passo central, como ocorre em animais expostos às condições de claro/escuro subjetivas de laboratório (Oster et al., 2003).

Entretanto, o relógio biológico também pode ser mascarado pelo fator que promoveu a sincronização dos ritmos biológicos com o ambiente (*zeitgeber*), podendo ocorrer uma resposta imediata ao estímulo, muitas vezes aumentando e outras diminuindo as variações observadas (Mrosovsky, 1999; Herzog e Tosini, 2001), permitindo que o animal antecipe e enfrente modificações ambientais de forma mais eficiente (Cipolla-Neto et al., 1988; Goldman, 1999; Pereira-da-Cruz et al., 2006).

A ritmicidade circadiana em répteis e outros vertebrados não-mamíferos são reguladas pela glândula pineal, um componente que apresenta células fotossensoras capazes de secretar melatonina, importante hormônio capaz de controlar o sistema circadiano de répteis (Underwood, 1990). A produção circadiana de melatonina é sincronizada pelo grau de luminosidade do ambiente. Os níveis plasmáticos de melatonina se reduzem durante o dia e aumentam no período noturno em répteis que apresentam maior performance locomotora no período noturno (Cassone, 1990). Nos vertebrados, o sistema circadiano está relacionado com a presença funcional de melatonina para promover a sincronização das oscilações endógenas. O bloqueio no ritmo de secreção de melatonina leva a um interrompimento na ritmicidade circadiana de aves e répteis (Menaker et al., 1997; Underwood, 1990). Ritmos diários nos níveis de melatonina estão presentes nas serpentes *Nerodia rhombifera* (Tilden e Hutchison,

1993) e *Tiliqua rugosa* (Firth et al., 1989), com o ritmo de melatonina persistindo em condições de temperatura e escuro constantes. Nas condições experimentais de laboratório, os relógios biológicos controlados pelo sistema nervoso central têm livre-curso e são as expressões de relógios biológicos endógenos, oscilando em períodos de aproximadamente 24 horas (Murphy e Campbell, 1996).

Vertebrados com hábito noturno possuem glândula pineal pouco desenvolvida e pouco funcional. Entretanto, quando submetidos às condições experimentais, podem produzir níveis plasmáticos de melatonina semelhantes àquelas espécies com glândula pineal completamente funcionais, quais apresentam hábitos diurnos. Isto ocorre, porque a melatonina pode também ser produzida por estruturas extra-pineais, como a glândula de Harderian, retina e intestino (Ralph, 1976). Pode-se determinar que as estruturas extra-pineais contribuem para os níveis plasmáticos de melatonina durante o dia e a glândula pineal durante a noite na serpente *Thamnophis sirtalis* parietalis (Mendonça et al., 1996). Mesmo assim, estes estudos não esclarecem como a melatonina regula as manifestações circadianas fisiológicas e comportamentais em animais termodependentes, como em *Bothrops jararacussu*, já que as respostas fisiológicas e comportamentais diferem entre as espécies e os protocolos experimentais utilizados (Menaker et al., 1997).

Embora as evidências indiquem que o sistema circadiano em muitos organismos seja composto por vários osciladores circadianos, a organização e a interação destes osciladores com o ambiente é pouco compreendidas. Isto se deve, em parte, à ênfase na utilização de mamíferos nos modelos experimentais, dificultando um melhor entendimento do ponto de vista filogenético. Vertebrados não-mamíferos são uma importante alternativa para o entendimento dos princípios da organização do sistema circadiano, podendo os estudos com *B. jararacussu* fornecer alguns avanços neste sentido. Assim, procuramos mostrar a influência dos ciclos claro/escuro e escuro/claro na motilidade e distância percorrida de *B. jararacussu* em condições experimentais, objetivando o entendimento da organização circadiana do ponto de vista da variabilidade e evolução entre as espécies.

Material e Métodos

Os experimentos foram realizados com serpentes mantidas em condições subjetivas de ciclo claro/escuro ambiental 12:12 (dia/claro e noite/escuro) e entre 7:00 às 19:00 horas, no verão. Foram estudados quatro espécimes de *B. jararacussu* de 24 meses de idade, pesando em média $49,1 \pm 2,7$ g e comprimento médio de $48,0 \pm 2,6$ cm, obtidas no serpentário da Universidade Regional de Blumenau (FURB), (Nordeste de Santa Catarina; latitude $26^{\circ}55'26''$ e longitude $49^{\circ}03'22''$); no Estado de Santa Catarina, Brasil (Certificado de Registro de Criadouro da Fauna Silvestre – 900238/IBAMA).

Os animais mantidos nas condições de ciclo claro/escuro foram submetidos ao teste experimental para análise da motilidade e distância percorrida (Grupo Controle – 0 Dias). Posteriormente, as condições ambientais foram invertidas para ciclo escuro/claro (12:12), com os animais sendo submetidos semanalmente aos testes experimentais, durante 21 dias. Finalmente, estes animais retornaram ao ciclo subjetivo claro/escuro durante o mesmo período de tempo. A avaliação da performance locomotora foi filmada no laboratório do serpentário, com temperatura ambiente de 22 ± 1 °C e umidade relativa do ar de $56 \pm 2\%$, utilizando-se a arena em campo aberto. O teste do campo aberto consistiu na mensuração das variáveis da motilidade e distância percorrida dos indivíduos experimentais, colocados em uma arena limitada por uma parede circular. O interior desta arena, de 280cm de diâmetro, foi pintado de preto e o assoalho foi subdividido em segmentos de linhas brancas para formar 19 espaços iguais. A taxa de ambulação foi aferida a partir da anotação do número de setores desenhados no chão do aparelho que foram transpassados pelo animal e os tempos gastos nas atividades motoras foram cronometrados, durante o período de 24 horas.

Para análise de variância, os dados foram coletados em intervalos de 2 horas. Após ser observada a significância do teste F da análise de variância menor que 5% ($p < 0,05$), procedeu-se o emprego do teste de Tukey para comparação das médias duas a duas.

Resultados

O tempo de maior motilidade e distâncias percorridas para o grupo controle ocorreram ente 20:00 e 24:00 horas, com intensidade máxima às 22:00 horas ($81,3 \pm 7,1$ minutos e $23,0 \pm 3,4$ metros, respectivamente). Análise de variância apresentou significância do teste F para o tempo de motilidade ($F = 48,008$; $p < 0,0001$) e distância percorrida ($F = 22,0 \pm 39$; $p < 0,0001$), com o teste de Tukey mostrando diferenças significativas para estes períodos, quando comparados com os períodos compreendidos entre 02:00 e 18:00 horas ($p < 0,05$). Espécimes de *B. jararacussu* submetidas a ciclo escuro/claro durante 21 dias, não apresentaram diferenças estatisticamente significativa entre os períodos, nos dias analisados ($p > 0,05$). A inversão no ciclo de luminosidade aboliu o ritmo original (Figura 1).

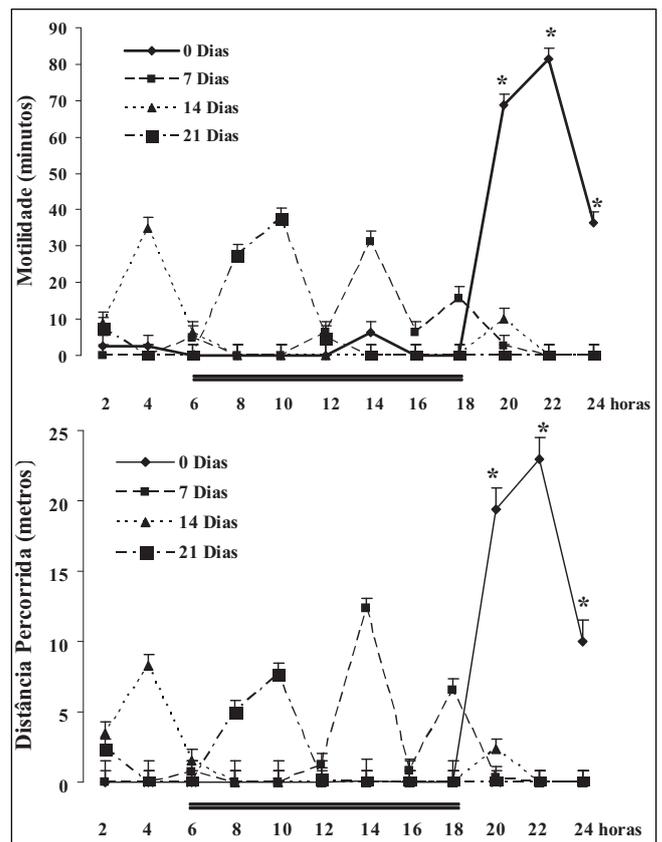


FIGURA 1: Variações na atividade motora durante 24 horas de *Bothrops jararacussu* submetidas aos ciclos de escuro/claro durante 21 dias. A barra no eixo das horas representa o período normal de dia/claro. O teste de Tukey mostrou diferenças significativas na motilidade e distâncias percorridas entre os períodos de 20:00 e 24:00 horas para o grupo controle (0 Dias), quando comparados com os outros períodos. Não foram observadas diferenças para outros dias avaliados ($n=4$, $*p < 0,05$).

Não foram observadas diferenças estatísticas na motilidade e distância percorrida no grupo controle (0 Dias), nos períodos analisados, após serem expostas durante 21 dias a ciclo escuro/claro (12:12). Entretanto, após 7 dias no ciclo claro/escuro (12:12), foram observadas diferenças significativas para motilidade e distâncias percorridas no período matutino, entre 8:00 e 10:00 horas, com picos máximos de motilidade às 8:00 horas ($75,0 \pm 6,5$ minutos), e de distância percorrida às 10:00 horas ($23,4 \pm 2,5$ metros). Análise de variância apresentou significância para motilidade ($F = 19,626$; $p < 0,0001$) e distância percorrida ($F = 22,765$; $p < 0,0001$), com o teste de Tukey mostrando diferenças significativas para os períodos compreendidos entre 8:00 às 10:00 horas, quando comparados com outros períodos ($p < 0,05$). *B. jararacussu* também apresentou valores estatisticamente significativos para motilidade e distância percorrida no período noturno no décimo-quarto-dia, entre 22:00 e 24:00 horas, atingindo o pico máximo de motilidade ($76,3 \pm 11,4$ minutos) e distância percorrida ($25,8 \pm 1,1$ metros) às 24:00 horas. Análise de variância mostrou diferenças significativas nos períodos de 24 horas para motilidade ($F = 30,403$; $p < 0,0001$) e distância percorrida ($F = 366,22$; $p < 0,0001$), com o teste de Tukey mostrando diferenças significativas para os períodos compreendidos entre 2:00 às 20:00 horas, quando comparados com outros períodos ($p < 0,05$). O período de motilidade e distância percorrida no vigésimo-primeiro-dia ocorreu entre 20:00 e 24:00 horas, com picos máximos de motilidade de $81,0 \pm 4,8$ minutos e distância percorrida de $25,8 \pm 1,0$ metros às 22:00 horas. Análise de variância mostrou diferenças significativas na motilidade ($F = 158,18$; $p < 0,0001$) e distância percorrida ($F = 409,86$; $p < 0,0001$), com o teste de Tukey mostrando diferenças significativas para os períodos compreendidos entre 02:00 às 18:00 horas, quando comparados com os demais períodos ($p < 0,05$). Assim, os animais ao retornarem ao ciclo claro/escuro apresentaram uma inversão no ciclo de motilidade e distância percorrida no 7 dia, retornando ao ciclo original após o 14 dia (Figura 2).

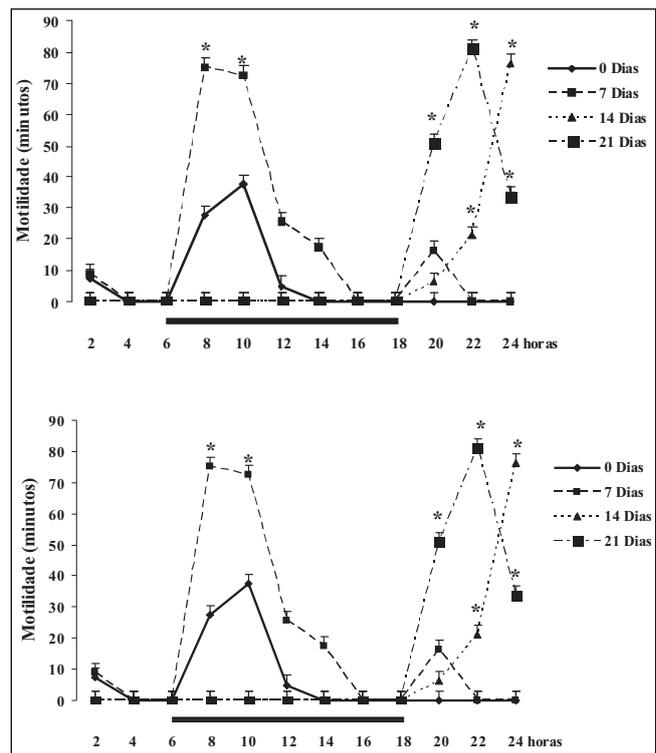


FIGURA 2: Variações na atividade motora durante 24 horas de *Bothrops jararacussu* submetidas aos ciclos de claro/escuro durante 21 dias, após serem mantidas no mesmo período de tempo nas condições subjetivas de escuro/claro. A barra no eixo das horas representa o período normal de dia/claro. O teste de Tukey não mostrou diferenças significativas na motilidade e distância percorrida grupo controle (0 Dias), quando comparado com os outros períodos. Entretanto, foram observadas diferenças entre os períodos de 8:00 a 10:00 horas, após 7 dias, entre 22 e 24 horas após 14 dias, e entre 20 e 24 horas após 21 dias, quando comparados com os demais períodos ($n = 4$, $*p < 0,05$).

Discussão

Do ponto de vista filogenético, a evolução do sistema circadiano ocorreu pelas pressões seletivas influenciadas pelo grau de luminosidade do nicho ecológico onde os diferentes répteis se desenvolveram (Menaker et al., 1997). Isto permitiu o aparecimento de osciladores rítmicos capazes de preparar adequadamente o comportamento e a fisiologia destes animais, antecedendo as modificações do ambiente (Daan et al., 2001).

A periodicidade comportamental de *B. jararacussu* é controlada através de osciladores circadianos quanto este animal é exposto às condições subjetivas de claro/escuro. *B. jararacussu* em ciclos claro/escuro (12:12),

apresentou atividades motora e locomotora monofásica no período noturno (Figura 1 - 0 Dias). Em *B. jararacussu*, provavelmente, existem dois ou mais relógios envolvidos na regulação dos ritmos locomotores circadianos. Estes relógios devem ser mutuamente complementares, modulando informações temporais ao longo do sistema nervoso central, com livre-curso ao longo de um período de 24h, em ciclo de claro/escuro.

Daan et al. (2001) sugeriram a presença de dois osciladores genéticos, ativados pelo grau de radiação de luminosidade produzida pelas estações do ano sendo que a intensidade da luminosidade poderia ser avaliada pelo sistema nervoso central e atuar sobre dois pares de genes circadianos (*per1*, *cry1*, *per2* e *cry2*). O oscilador *per1/cry1* seria acelerado pela luz e desacelerado pelo escuro, enquanto o oscilador *per2/cry2* seria desacelerado pela luz e acelerado pelo escuro, fornecendo um perfeito mecanismo molecular para mensurar as estações do ano e a intensidade da atividade motora. A endogenicidade destes ritmos proporcionaria uma capacidade antecipatória, permitindo que os animais organizem recursos fisiológicos e comportamentais antes que estes sejam necessários, fornecendo uma resposta mais eficiente às alterações do ambiente (Shine e Lambec, 1990; Paranjpe e Sharma, 2005).

Em *B. jararacuçu*, à semelhança de outros organismos, a glândula pineal poderia ser considerada um transdutor neuroendócrino que sofreria influências da luminosidade do ambiente, estando relacionada com a mediação da ação do hormônio melatonina (Cassone, 1990). Répteis noturnos expostos durante dias e noites subjetivas, apresentam aumento de atividade locomotora e secreção de melatonina pela pineal durante o período noturno, sendo que a mudança de fase altera o relógio biológico, caracterizado pela relativa inatividade motora e locomotora, com diminuição na concentração plasmática de melatonina (Menaker et al., 1997). A importância da pineal na organização circadiana é observada quando esta glândula é retirada, causando a eliminação dos ritmos circadianos (Underwood, 1990). Entretanto, os níveis plasmáticos de melatonina não diferem de forma significativa na serpente *Thamnophis sirtalis parietalis* quando a glândula pineal é retirada (Mendonça et al., 1996).

Atividade locomotora controlada por ritmos circadianos são descritos em muitas espécies de répteis (Underwood, 1990). A remoção da glândula pineal em lagartos abole a atividade locomotora em *Anolis carolinensis* e alguns indivíduos de *Sceloporus olivaceus* (Underwood, 1977; Underwood, 1983), não afetando a ritmicidade locomotora em iguana do deserto *Dipsosaurus dorsalis* (Janik e Menaker, 1990) ou em Iguana iguana (Tosini e Menaker, 1998).

A maioria dos estudos investiga o ritmo de atividade locomotora para determinar como o grau de ritmicidade circadiana manifesta-se através da variação do fotoperíodo. Isto permite definir o sincronismo interno em relação às condições externas do ambiente. Assim, quando *B. jararacussu* foi submetida à inversão no ciclo de luminosidade, houve um mascaramento na atividade motora e locomotora durante o período de 21 dias, em condições subjetivas de ciclo escuro/claro (12:12), demonstrando uma fraca ligação entre o relógio biológico e uniformidade dos ritmos (Figura 1). Em nosso laboratório, também observamos comportamento idêntico quando *B. jararacussu* foi mantida durante 21 dias em condições de escuro constante (dados não demonstrados). Em ambas as condições, há uma aparente perda de atividade motora e locomotora, pois os animais apresentam estes parâmetros comportamentais aumentados quando na presença de alimento.

Muitas vias da atividade animal são influenciadas por fatores exógenos e endógenos, com os relógios biológicos movimentando as vias de atividade, estando envolvidos estímulos que podem mascarar estes ritmos endógenos, aumentando ou suprimindo esta atividade (Underwood, 1992). Por exemplo, estímulos como alta temperatura (Huey, 1982), desidratação (Bowker, 1993; Winne e Keck, 2004) e saciedade (Metcalf e Steele, 2001) suprimem a atividade, enquanto a fome aumenta a atividade (Metcalf e Steele, 2001). O mascaramento é um processo que distorce a atividade do relógio interno para episódios internos ou externos ao corpo (Minors e Waterhouse, 1989). Considerando a capacidade de alguns fatores mascarar os ritmos circadianos, o entendimento das causas (endógenas ou exógenas) no campo das vias de atividade dos animais podem ser bastante esclarecedoras.

Apenas em animais termodependentes foi demonstrado que os ritmos circadianos diminuem ou desaparecem durante a hipotermia e hibernação (Vivien-Roels e Arendt, 1989). Entretanto, em todos os casos, a dificuldade é decidir se a diminuição dos ritmos estaria relacionada com a atividade do relógio central, ou pela diminuição do metabolismo ligado à hipotermia. Foi demonstrado que os níveis de *per2*mRNA em lagartos (*Podarcis sicula*) são constantes nas 24h a 6°C, quando comparados com a expressão cíclica a 29°C. Os altos níveis a 6°C são atribuídos à lenta degradação do mRNA em baixas temperaturas. Alternativamente, a eficiência no bloqueio na degradação ou transporte pode atenuar a volta do *feedback* molecular para a regulação circadiana da expressão de *per2*. Portanto, as concentrações de *per2*mRNA e/ou eventualmente proteínas, não são modificadas pelas baixas ou altas temperaturas. Os altos níveis de mRNA de *per2* em baixas temperaturas fornece evidência, mas não prova, que o relógio não é influenciado pelo frio (Magnone et al., 2005). Assim, a atividade motora e locomotora de *B. jararacussu* pode estabelecer um novo paradigma, onde a "hibernação" de alguns répteis estaria relacionada com os ciclos de luminosidade e não somente com a temperatura.

O relógio biológico permitiria que serpentes de regiões sub-tropicais permanecessem imóveis durante o período de hibernação no inverno, mesmo quando a temperatura ambiente se elevasse; retornando à atividade quando o ciclo claro/escuro retornasse aos padrões da primavera. Durante o inverno, o relógio circadiano favorece esta condição, quando há uma modificação dos fatores bióticos e abióticos no ambiente, como redução do alimento e temperatura.

As necessidades de manter-se imóvel durante o período de "hibernação" (ciclo escuro/claro), desapareceram quando estes animais voltaram às condições subjetivas de ciclo claro/escuro (12:12). No sétimo-dia de exposição a este ciclo, os animais responderam aumentando o período de atividade motora e locomotora no período matutino; retornando ao período noturno, natural desta espécie de serpente, após o décimo-quarto-dia (Figura 2).

Este grau de antecipação após o sétimo-dia reflete a adaptação de *B. jararacussu* às condições do ambiente,

ativadas após as condições subjetivas de ciclo claro/escuro. A atividade antecipatória é um grande avanço adaptativo, permitindo a *B. jararacussu* uma melhor condição fisiológica e comportamental para enfrentar as condições do ambiente, sincronizadas através dos ciclos de luminosidade. Estes resultados fornecem fortes evidências de que os ciclos circadianos podem apresentar um papel crítico e não apenas uma iniciação, mas também uma interrupção da atividade.

O estudo da atividade locomotora da *B. jararacussu* realizado em laboratório, sugere que a luz é um potente zeitgeber para esta espécie, a exemplo do que ocorre na maioria dos animais; demonstrando que estes são capazes de modificar seu ritmo de atividade de acordo com as variações de luminosidade presente no ambiente. A inversão do ciclo natural de luminosidade é capaz de mascarar a sincronização da atividade, possivelmente, através da modulação sazonal de osciladores circadianos, responsáveis pelo controle da atividade motora e locomotora. Entretanto, os mecanismos moleculares responsáveis pela modulação da atividade motora, através destes relógios biológicos, ainda não foram descritos completamente. Aparentemente, existe um limite neste ciclo, para que a singularidade comportamental manifeste-se através da ação dos estímulos exógenos sobre o relógio biológico.

Os resultados comportamentais observados em *B. jararacussu*, em condições de luminosidade subjetivas de laboratório, demonstram a importância das pesquisas futuras para o entendimento da expressão e o funcionamento dos osciladores genéticos, e de como estes traduzem as mudanças sazonais de luminosidade do ambiente em diferentes organismos.

Referências

- Bowker, R. G. 1993. The thermoregulation of the lizards *Cnemidophorus exsanguis* and *C. velox*: some consequences of high body temperature. In: Wright, J. W & Vitt, L. J. (ed.). **Biology of the Whiptail Lizards**. Oklahoma Museum of Natural History, Norman, UK, p.117-132.
- Cassone, V. M. 1990. Effects of melatonin on vertebrate circadian systems. **Trends in Neurosciences**, 13 (1): 457-464.
- Cipolla-Neto, J.; Margues, N.; Menna-Barreto, L. S. 1988. **Introdução ao estudo da cronobiologia**. Icone Edusp, São Paulo, Brasil, 270pp.

- Daan, S.; Albrecht, U.; van der Horst, G. T. J.; Illnerova, H.; Roenneberg, T.; Wehr, T. A. 2001. Assembling a clock for all seasons: are there M and E oscillators in the genes? **Journal of Biological Rhythms**, **16** (2): 105-116.
- Firth, B. T.; Thompson, M. B.; Kennaway, D. J. 1989. Thermal sensitivity of reptilian melatonin rhythms "cold" tuatara vs. "warm" skink. **American Journal of Physiology**, **256** (1): 1160-1163.
- Goldman, B. D. 1999. The circadian timing system and reproduction in mammals. **Steroids**, **64** (9): 679-685.
- Herzog, E. D.; Tosini, G. 2001. The mammalian circadian clock shop. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, **12** (4): 295-303.
- Huey, R. B. 1982. Temperature, physiology, and the ecology of Reptiles. Biology of the Reptilia. In: Gans, C. & Pough, F. H. (ed.). **Physiology C**. vol. 12 Academic Press, London, UK, p.26-91.
- Janik, D. S.; Menaker, M. 1990. Circadian locomotor rhythms in the desert iguana I. The role of the eyes and the pineal. **Journal of Comparative Physiology**, **166** (1): 803-810.
- Magnone, M. C.; Jacobmeier, B.; Bertolucci, C.; Foà, A.; Albrecht, U. 2005. Circadian expression of the clock gene *Per2* is altered in the ruin lizard (*Podarcis sicula*) when temperature changes. **Molecular Brain Research**, **133** (2): 281-285.
- Menaker, M.; Moreira, L. F.; Tosini, G. 1997. Evolution of circadian organization in vertebrates. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, **30** (3): 305-313.
- Mendonça, M. T.; Tousignant, A. J.; Crews, D. 1996. Pinelectomy, melatonin and courtship behavior in male red-sided garter snakes (*Thamnophis sirtalis parietalis*). **Journal of Experimental Zoology**, **274** (1): 63-74.
- Metcalf, N. B.; Steele, G. I. 2001. Changing nutritional status causes a shift in the balance of nocturnal to diurnal activity in European minnows. **Functional Ecology**, **15** (1): 304-309.
- Minors, D. S.; Waterhouse, J. M. 1989. Masking in humans: the problem and some attempts to solve it. **Chronobiology International**, **6** (1): 261-271.
- Mrosovsky, N. 1999. Masking: history, definitions and measurement. **Chronobiology International**, **16** (4): 415-429.
- Murphy, P. J.; Campbell, S. S. 1996. Physiology of the circadian system in animals and humans. **Journal of Clinical Neurophysiology**, **13** (1): 2-16.
- Pereira-da-Cruz, J. G.; Reinert, M.; Schmitt, A. A. J. 2006. Variações circadianas em *Spilotes pullatus* (Colubridae). **Biotemas**, **19** (4): 49-53.
- Oster, H.; Van Der Horst, G. T. J.; Albrecht, U. 2003. Daily variation of clock output gene activation in behaviourally arrhythmic *mPer/mCry* triple mutant mice. **Chronobiology International**, **20** (4): 683-695.
- Paranjpe, D. A.; Sharma, V. K. 2005. Evolution of temporal order in living organisms. **Journal of Circadian Rhythms**, **3** (1): 1-13.
- Ralph, C. L. 1976. Correlations of melatonin content in pineal gland, blood, and brain of some birds and mammals. **American Zoologist**, **16** (1): 35-43.
- Shine, R.; Lambeck R. 1990. Seasonal shifts in the thermoregulatory behaviour of Australian blacksnakes *Pseudechis porphyriacus*. **Journal of Thermal Biology**, **15** (1): 301-305.
- Tilden, A. R.; Hutchison, V. H. 1993. Influence of photoperiod and temperature on serum melatonin in the diamondback water snake, *Nerodia rhombifera*. **General and Comparative Endocrinology**, **92** (3): 347-354.
- Tosini, G.; Menaker, M. 1998. Multioscillatory circadian organization in a vertebrate, *Iguana iguana*. **The Journal Neuroscience, Washington**, **18** (3): 1105-1114.
- Underwood, H. 1977. Circadian organization in lizards: the role of the pineal organ. **Science New York**, **195** (4278): 587-589.
- Underwood, H. 1983. Circadian organization in the lizard *Anolis carolinensis*: a multioscillatory system. **Journal of Comparative Physiology**, **152** (1): 265-274.
- Underwood, H. 1990. The pineal and melatonin: regulators of circadian function in lower vertebrates. **Experientia**, **46** (1): 120-128.
- Underwood, H. 1992. Endogenous rhythms. Biology of the Reptilia. Hormones, brain, and behavior. In: **Physiology C**. vol. 18. University of Chicago Press, Chicago, USA, p.229-297.
- Vivien-Roels, B.; Arendt, J. 1989. Circadian and circannual fluctuations of pineal melatonin content in *Testudo hermanni* G. (Reptilia, Chelonia) under natural conditions of photoperiod and temperature. **Annales D'Endocrinologie**, **40** (1): 93-94.
- Winne, C. T.; Keck, B. 2004. Daily activity patterns of Whiptail Lizards (Squamata: Teiidae: Aspidoscelis): a proximate response to environmental conditions or an endogenous rhythm? **Functional Ecology**, **18** (3): 314-321.