



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS, LETRAS E ARTES**  
**DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIA**  
**COGNITIVA E COMPORTAMENTO (PPGNeC)**

**Memória e ritmicidade circadiana em ratos adolescentes  
submetidos a um protocolo de dessincronização forçada- modelo T22**

**Kathlyn Kamoly Barbosa Cavalcanti Araújo**

**João Pessoa, PB**  
**Novembro de 2017**

Kathlyn Kamoly Barbosa Cavalcanti Araújo

**Memória e ritmicidade circadiana em ratos adolescentes  
submetidos a um protocolo de dessincronização forçada- modelo T22**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociência Cognitiva e Comportamento na Universidade Federal da Paraíba, em defesa do grau de mestre em Neurociência Cognitiva e Comportamento, na linha de pesquisa: psicobiologia: Processos Psicológicos Básicos e Neuropsicologia, sob orientação do Prof. Dr. Flávio Freitas Barbosa e coorientação da Profa. Dr<sup>a</sup>. Crhistine Andressa da Silva.

**João Pessoa, PB  
Novembro de 2017**

**Catálogo na publicação Seção  
de Catalogação e Classificação**

A663m Araújo, Kathlyn Kamoly Barbosa Cavalcanti.

Memória e ritmicidade circadiana em ratos adolescentes submetidos a um protocolo de dessincronização forçada - modelo T22 / Kathlyn Kamoly Barbosa Cavalcanti Araújo. - João Pessoa, 2017.

80 f. : il.

Orientação: Flávio Freitas Barbosa.

Coorientação: Crhistine Andressa da Silva.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCHLA.

1. Neurociência cognitiva. 2. Ritmo biológico. 3. Ritmo circadiano. I. Barbosa, Flávio Freitas. II. Silva, Crhistine Andressa da. III. Título.

UFPB/BC

**Memória e ritmicidade circadiana em ratos adolescentes submetidos a um protocolo de dessincronização forçada- modelo T22**

**Autor:** Kathlyn Kamoly Barbosa Cavalcanti Araújo

**Data da defesa:** 28 de Setembro de 2017.

**Banca Examinadora:**



---

Prof.ª. Dr.ª. Mirian Graciela da Silva Stiebbe Salvadori  
Universidade Federal da Paraíba (Membro Interno)

---

Prof. Dr. John Fontenele Araújo

Universidade Federal do Rio Grande do Norte (Membro Externo)

---

Prof.ª. Dr.ª. Crhistiane Andressa da Silva  
Universidade Federal de Pernambuco (Coorientadora)



---

Prof. Dr. Flávio Freitas Barbosa  
Universidade Federal da Paraíba (Orientador)

**João Pessoa, PB  
Setembro de 2017**

*“O período de maior ganho de conhecimento e experiência é o período de maior dificuldade na vida de cada um.”*

**Dalai Lama**

Dedico este trabalho aos meus orientadores, Flávio Barbosa e Crhistine Andressa, pois sem eles não teria conseguido chegar até aqui.

Serei eternamente grata por seus exemplos como pesquisadores e educadores, mas acima de tudo pelo respeito ao próximo. Termino o mestrado com a certeza que não poderia ter tido orientadores melhores do que vocês.

Obrigada por todos os ensinamentos!

## **AGRADECIMENTOS**

E após 2 anos é chegada a hora de finalizar o mestrado. Não posso ter outro sentimento que não seja de gratidão a Deus por ter permitido que eu chegasse até aqui. Apesar dos obstáculos e momentos difíceis, que por vezes me fizeram pensar em desistir, eu consegui chegar nesta reta final, que alegria!

Dessa forma, não posso deixar de agradecer aos meus pais, Hindenburg e Sânzia, por sempre trabalharem para garantir a educação de seus filhos. Esse título não é meu, mas nosso.

Meu sentimento também se estende aos meus irmãos, Karen e Kenny, por todos os momentos que estiveram torcendo por mim.

Eu não poderia de forma alguma deixar de agradecer ao meu esposo, Marcos, porque sem seu incentivo, amparo, eu não teria como chegar até a fase final dessa dissertação. Obrigada por ter sido minha fortaleza, meu conselheiro e, principalmente, por ter sido uma “pãe” para nossa Elisa Vitória, enquanto eu estive ausente escrevendo a dissertação.

Meu sentimento de agradecimento também está presente quando falo das minhas primogênicas, Heloísa e Lorena, minhas gêmeas, que infelizmente não puderam estar comigo para vivenciar essa vitória, mas que no curto espaço de tempo, 6 meses, que permaneceram sendo geradas em meu ventre me fizeram a pessoa mais feliz do mundo.

E falando em amor e vitória, eu agradeço a “pessoinha” que faz com que todo dia eu tenha motivos para ser melhor, minha energia diária e a dona do olhar e do sorriso mais lindos do mundo: Elisa Vitória. Mamãe ama você, infinitamente!

Professor Flávio e Crhis, palavras faltam para agradecer por tudo o que fizeram por mim durante esta jornada. Professor, muito obrigada por ter me recebido no Laboratório de Estudos de Memória e Cognição - LEMCOG e por todo o conhecimento compartilhado. Crhis, obrigada por me apresentar e ensinar sobre a Cronobiologia. Admiro muito o seu trabalho! Crhis e Flávio, vocês são exemplos de pesquisadores e seres humanos.

Ao Prof<sup>o</sup>. Dr. John Fontenele Araújo e a Prof<sup>a</sup> Miriam Salvadori eu agradeço as valiosas contribuições. Assim como, a todos os professores do PPGNEC por dividirem todos os ensinamentos sobre a Neurociência.

Não poderia deixar de agradecer a todos da família LEMCOG, principalmente a Jeane, Augusta, Paulo, Karen, Lívia e Laís por toda a ajuda.

Agradeço a todos os amigos da turma do mestrado 2015, em particular as amigas que o mestrado me deu, Jeane e Maria Augusta, por tudo o que fizeram por mim. Jeane, não tenho como enumerar as vezes que precisei e você prontamente me ajudou. Serei eternamente grata! Augusta, também não tenho como agradecer por todas as palavras de carinho e incentivo que recebi. Mesmo longe, quero sempre saber de notícias maravilhosas sobre vocês.

Agradeço aos animais que foram sujeitos desse estudo por contribuírem com o enriquecimento científico.

Agradeço também a todos os familiares e amigos que torceram por mim ao longo desses anos.

## **SUMÁRIO**

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	11
<b>LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS</b> .....	12
<b>RESUMO</b> .....	13
<b>ABSTRACT</b> .....	14

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>1.1 Memória</b> .....	15
<b>1.1.2 Memórias de Reconhecimento e Espacial</b> .....	17
<b>1.2 Modelos Animais de Memória de Reconhecimento e Espacial</b> .....	19
<b>1.3 Memória e Ritmo Circadiano</b> .....	23
<b>1.4 Sincronização</b> .....	25
<b>1.5 Dessincronização</b> .....	28
<b>1.5.1 Dessincronização Forçada- Modelo T22</b> .....	30
<b>1.5.2 Dessincronização em Adolescentes</b> .....	33
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	37
<b>3 OBJETIVO</b> .....	39
<b>3.1 Objetivo Geral</b> .....	39
<b>3.2 Objetivos Específicos</b> .....	39
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	40
<b>4.1 Animais</b> .....	40
<b>4.2 Delineamento Experimental</b> .....	41
<b>4.3 Aparato Experimental e Objetos</b> .....	42
<b>4.4 Procedimentos Experimentais</b> .....	43
<b>4.5 Dados da Atividade Motora</b> .....	45
<b>4.5.1 Coleta dos Dados</b> .....	45
<b>4.6 Análise Comportamental e Estatística</b> .....	45
<b>5 RESULTADOS</b> .....	47
<b>5.1 Dados da Atividade Motora</b> .....	47
<b>5.2 Parâmetros Comportamentais</b> .....	49
<b>5.2.1 Reconhecimento do Objeto Novo</b> .....	49
<b>5.2.2 Tarefa Espacial Associativa</b> .....	51
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	53

<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	57
<b>8 REFERÊNCIAS</b> .....	58
<b>9 ANEXOS</b> .....	66
<b>9.1 Artigo para submissão</b> .....	66
<b>9.2 Certidão do CEUA</b> .....	80



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representação esquemática dos sistemas de memória e suas respectivas áreas ....	17
<b>Figura 2.</b> Fases de amostra e teste da Tarefa de Reconhecimento de Objetos .....	20
<b>Figura 3.</b> Representação da Tarefa de Reconhecimento Espacial Associativo .....	22
<b>Figura 4.</b> Representação esquemática da Tarefa de Reconhecimento do Objeto (acima) e da Tarefa de Localização do Objeto (parte inferior) .....	23
<b>Figura 5.</b> Sincronização entre o sistema circadiano e a periferia .....	27
<b>Figura 6.</b> Dessincronização entre o sistema circadiano e a periferia.....	29
<b>Figura 7.</b> Atividade motora de um rato sob CE com período de 22 horas (T22) .....	31
<b>Figura 8.</b> Esquema do Modelo de dois processos do regulamento do sono.....	35
<b>Figura 9.</b> Gaiolas de propileno dentro das cabines de claro-escuro .....	40
<b>Figura 10.</b> Campo aberto circular com pistas proximais e pistas distais fixadas na parede da sala de experimento comportamental .....	41
<b>Figura 11.</b> Foto ilustrativa dos objetos utilizados durante o experimento.....	42
<b>Figura 12.</b> Objetos apresentados durante as sessões de amostra (à esquerda) e teste (à direita) na tarefa RON .....	43
<b>Figura 13.</b> Objetos apresentados durante as sessões de amostra (à esquerda) e teste (à direita) na tarefa TEA .....	44
<b>Figura 14.</b> Actogramas plotados duplamente e periodogramas (Sokolove-Bushell) da atividade motora dos animais em T24 .....	47
<b>Figura 15.</b> Actogramas plotados duplamente e periodogramas (Sokolove-Bushell) da atividade motora dos animais em T22 (noite de coincidência) .....	48
<b>Figura 16.</b> Actogramas plotados duplamente e periodogramas (Sokolove-Bushell) da atividade motora dos animais em T22 (noite de não coincidência) .....	49
<b>Figura 17.</b> Taxa de exploração dos objetos antigo não deslocado e novo deslocado para os grupos experimentais T22C (noite de coincidência) e T22NC (noite de não coincidência) e o controle T24 na Tarefa Espacial Associativa.....	50
<b>Figura 18.</b> Índice de discriminação entre o objeto antigo não deslocado e o objeto novo deslocado para os grupos controle e experimentais T 22C (noite de coincidência) e T22NC (noite de não coincidência) .....	51
<b>Figura 19.</b> Taxa de exploração dos objetos antigo não deslocado e novo deslocado para os grupos experimentais T22C (noite de coincidência) e T22NC (noite de não coincidência) e o controle T24 na Tarefa Reconhecimento de Objetos Novos.....	52
<b>Figura 20.</b> Índice de discriminação entre os objetos antigo e novo para os grupos controle e experimentais T22C (noite de coincidência) e T22NC (noite de não coincidência) .....	52

## **LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS**

**H.M.** Henry Molaison

**LTM** Lobo Temporal Medial

**RON** Reconhecimento de Objetos Novos

**TEA** Tarefa Espacial Associativa

**CE** Claro-Escuro

**LAM** Labirinto Aquático de Morris

**NSQs** Núcleo Supraquiasmáticos

**vINSQ** Região Ventrolateral do Núcleo Supraquiasmático

**dmNSQ** Região Dorsomedial do Núcleo Supraquiasmático

**TRH** Tracto Retinohipotalâmico

**TGH** tracto geniculohipotalâmico

**NDR** Núcleos Dorsal da Rafe

**NMR** Núcleos Mediano da Rafe

**FIG** Folheto Intergeniculado

**IMC** Índice de Massa Corpórea

**CIDS-2** Classificação Internacional de Distúrbios do Sono

**T** Período do zeitgeber

**T22** período de 22 horas

**T24** período de 24 horas

**CSL** Componente Sincronizado pela Luz

**CNSL** Componente Não Sincronizado pela Luz

**UFPB** Universidade Federal da Paraíba

**LEMCOG** Laboratório de Estudos em Memória e Cognição

**SAP** Sistema de Acionamento Programado

**UFRN** Universidade Federal do Rio Grande do Norte

## RESUMO

A adaptação temporal das espécies ao ambiente é de fundamental importância para garantir a sobrevivência. No entanto, o ritmo da sociedade moderna cada vez mais induz o indivíduo à dessincronização, tanto interna quanto externa, em decorrência de mudanças de fase bruscas como ocorre no trabalho noturno ou em turnos e no *Jet Lag* social. O mesmo também já é observado em indivíduos adolescentes, que para cumprir com as demandas curriculares e extracurriculares, adotam o hábito de dormir tarde e acordar cedo que leva à privação de sono e a horários irregulares de dormir e despertar. Dessa forma, faz-se importante estudar os efeitos desses deslocamentos de fase crônicos sobre a fisiologia e comportamento de mamíferos jovens. Neste trabalho procuramos caracterizar os efeitos do ciclo CE de 22h, que é um modelo de dessincronização forçada interna, sobre a memória de reconhecimento de objetos e espacial e a expressão da ritmicidade circadiana de ratos adolescentes. Com este objetivo, foram utilizados 44 ratos Wistar machos, divididos em 2 grupos: T24, n=12 (CE 12:12 h) e T22, n=30(CE 11:11 h). O grupo T22 foi subdividido em dois grupos que realizaram os testes, respectivamente: no meio da noite de coincidência entre o ambiente e a noite biológica de cada rato do T22 (n=16) e no meio da noite de não coincidência (n=14). Foram utilizadas as tarefas Reconhecimento de Objetos Novos e Tarefa Espacial Associativa. A atividade motora destes animais foi registrada continuamente e totalizada em intervalos de 5 min. Posteriormente foi analisada por inspeção visual dos actogramas e pelo cálculo da periodicidade circadiana utilizando o programa *El Temps*. Observamos que os ratos sob T22 apresentaram dois ritmos de atividade motora, um sincronizado ao ambiente, exibindo o mesmo período do ciclo CE de 22 e o outro que se expressou em livre-curso, exibindo um período maior que 24h. Em relação às tarefas de memória analisadas, os animais sob T22 apresentaram prejuízo em suas performances. Concluimos que o ciclo CE de 22 h promove dissociação no ritmo circadiano de atividade motora em ratos adolescentes, prejudicando seu desempenho nas tarefas mnemônicas avaliadas.

**Palavras chave:** ritmo biológico; sistema de temporização circadiana; dessincronização.

## ABSTRACT

Temporal adaptation of the species to the environment is of fundamental importance to ensure survival. However, the rhythm of modern society increasingly induces the individual to desynchronization, both internal and external, as a result of abrupt phase changes such as night shift, shift work or social Jet Lag. The same is observed in adolescent individuals who, in order to comply with curricular and extracurricular demands, adopt the habit of sleeping late and waking up early that leads to sleep deprivation and irregular hours of sleep and awakening. Thus, it is important to study the effects of chronic phase shifts on physiology and behavior of young mammals. In this work we attempt to characterize the effects of LD cycle of 22h, a model of internal forced desynchronization, on recognition memory of objects and space and the expression of circadian rhythmicity of adolescent rats. For this purpose, 44 male Wistar rats were used, divided into 2 groups: T24, n = 12 (LD 12:12 h) and T22, n = 30 (LD 11:11 h). The T22 group was subdivided into two groups that performed the tests, respectively: in the middle of coincidence nights between the environment and the biological night of each rat (n=16) and in the middle of non-coincidence nights (n=14). The tasks New Object Recognition and Associative Spatial Task were used. The locomotor activity of these animals was recorded continuously and totalized at 5 min intervals. Later it was analyzed by visual inspection of actograms and calculation of circadian periodicities using the program *El Temps*. We observed that rats under T22 presented two rhythms of motor activity, one synchronized to the environment, exhibiting the same period of the LD cycle, and other in free-running, expressing a period longer than 24h. Regarding the analyzed memory tasks, the animals under T22 presented a loss in their performance. Based on that, we conclude that the LD cycle of 22h promotes dissociation in the circadian rhythm of motor activity in adolescent rats, impairing their performance in the mnemonic tasks evaluated.

**Keywords:** biological rhythm; circadian timing system; desynchronization.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Memória

A memória constitui-se numa das mais complexas funções cognitivas. Sua integridade permite que o ser humano consiga compreender o mundo, associando suas experiências individuais e estabelecendo uma maior interação com o meio (Cruz-Rodrigues & Lima, 2012). A memória pode ser mais bem descrita como uma rede complexa de diferentes funções inter-relacionadas que trabalham em sintonia para reproduzir informações (Paul, Magda & Abel, 2009).

A evidência da memória como uma função cerebral foi possível graças aos achados obtidos no caso do paciente Henry Molaison (H.M.) (Scoville & Milner, 1957; Squire & Wixted, 2011). Este jovem sofria com convulsões epiléticas e por isso foi submetido a uma cirurgia experimental na época, a ressecção bilateral do Lobo Temporal Medial (LTM), o que ocasionou uma amnésia anterógrada total (perda na capacidade de formar novas memórias episódicas) e retrógrada parcial (perda de memórias episódicas passadas), porém sem grandes perdas intelectuais ou o aparecimento de desordens de percepção (Tulving, 2002; Squire & Wixted, 2011).

O caso desse paciente direcionou os trabalhos subsequentes sobre a memória, com um aumento na pesquisa dos seus substratos neurais. Na época, além da compreensão de que o hipocampo parecia desempenhar alguma função específica na memória, foi elucidada a importância de estruturas adjacentes, como a amígdala e o giro hipocampal, no processo de consolidação da mesma (Squire & Wixted, 2011).

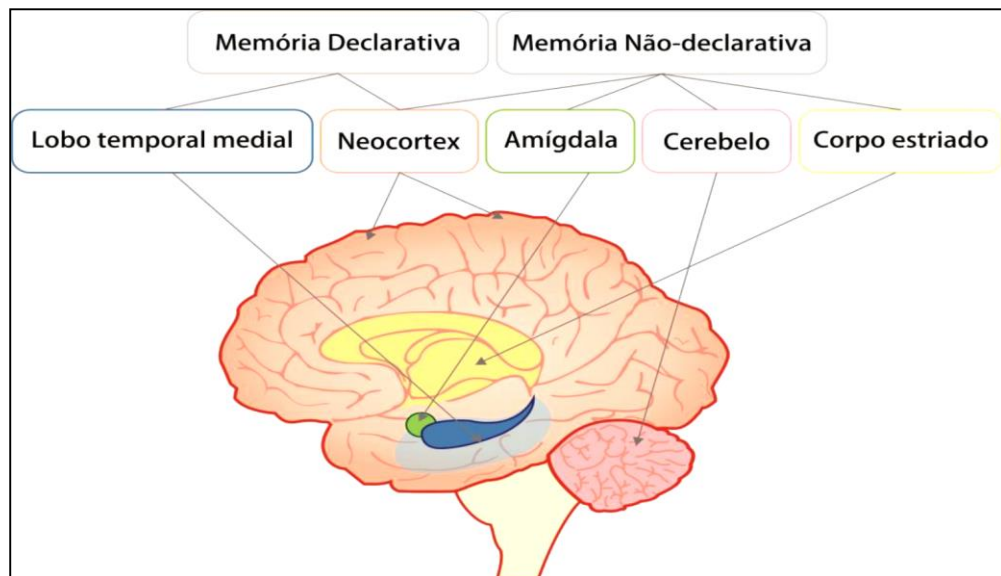
A memória é formada e estabilizada através de três processos. Primeiramente ocorre a codificação, que corresponde à aquisição inicial da memória. Em seguida, através da consolidação, a memória é armazenada para posterior recordação. Finalmente, a recuperação é o processo pelo qual as memórias armazenadas anteriormente são reativadas (Cohen & Stackman, 2015). As memórias recém-formadas são labéis e sujeitas a interferências, mas são estabilizadas com a consolidação, de modo que não são influenciadas pelos mesmos eventos de interferência. Isto é possível graças à cascata de eventos moleculares e celulares que alteram a eficácia sináptica, bem como uma interação prolongada entre o hipocampo e o córtex cerebral (McGaugh, 2000; Eichenbaum & McKenzie, 2011).

A memória pode ser classificada, conforme a taxonomia clássica, levando em consideração o tempo em que pode permanecer retida (curto prazo e longo prazo), bem

como considerando o seu conteúdo (explícito/declarativo e implícito/não-declarativo). Entende-se por memória de curto prazo aquela que pode perdurar por até poucos minutos, enquanto a de longo prazo pode ser revivenciada por horas ou a vida toda. A distinção entre as memórias declarativa e não-declarativa pode ser feita não apenas em termos de anatomia, mas em termos de características operacionais, o tipo de informação processada e o propósito de cada sistema (Izquierdo 2011; Izquierdo, Myskiw, Benetti & Furini, 2013; Pause *et al.*, 2013; Squire & Zola, 1996; Cohen & Stachman, 2015).

A memória implícita é evocada de maneira inconsciente. O seu domínio inclui várias formas de aprendizagem, normalmente expresso em desempenho comportamental melhorado ou acelerado, como exemplo, andar de bicicleta ou dirigir um carro. O funcionamento deste tipo de memória é dependente de estruturas neurais como o cerebelo, o neocórtex, a amígdala e o estriado (figura 1) (Squire & Zola, 1996; Squire & Kandel, 2002; Dickerson & Eichenbaum, 2010).

A memória explícita refere-se a informações que podem ser resgatadas de forma consciente pelo indivíduo por meio de recordações verbais ou imagens visuais. Seu funcionamento está intimamente relacionado ao Lobo Temporal Medial (hipocampo e córtices entorrinal, perirrinal e parahipocampal). Esta memória é subdividida em: semântica e episódica. O subtipo semântico é responsável por conhecimentos gerais e fatos sobre o mundo, sem informações sobre o contexto no qual as memórias foram armazenadas. O subtipo episódico está envolvido com a capacidade de aprender, armazenar e recuperar informações sobre experiências pessoais e únicas que incluem o conhecimento sobre quando e onde aconteceu um determinado evento, bem como, a informação contextual que ocorreu no momento do armazenamento da memória. (Gazzaniga, Ivry & Mangun, 2002; Tulving, 2002; Lombroso, 2004; Dickerson & Eichenbaum, 2010; Crystal, 2010; Pause *et al.*, 2013; Cohen & Stackman, 2015).



**Figura 1.** Representação esquemática dos sistemas de memória e suas respectivas áreas. Extraído de Souza (2015).

### 1.1.2 Memórias de Reconhecimento e Espacial

Como visto, a memória explícita é de extremo valor para os sujeitos, pois através dela é possível acessar fatos e eventos de maneira consciente. Neste contexto, faz-se importante ressaltar a memória de reconhecimento, que julga a ocorrência prévia de estímulos, sendo fundamental para a nossa capacidade de registrar eventos, mas também para orientar o comportamento prospectivo (Cohen & Stachman, 2015).

Por meio de testes como o *Remember/ Know*, é possível distinguir dois processos distintos da memória de reconhecimento: a familiaridade, experiência referida como “saber” e que não envolve a lembrança consciente de detalhes da experiência anterior; e a recordação, referida como “lembrar”, em que a plena atenção aos estímulos presentes (se houver) induz a uma consciente recapitulação dos detalhes contextuais (Yonelinas & Levy, 2002; Tulving, 2002; Eichenbaum, Yonelinas & Ranganath, 2007; Vanssay-Maigne *et al.*, 2011; Cohen & Stachman, 2015; Schoemaker *et al.*, 2017).

Estudos que investigam substratos neurobiológicos entre recordação e familiaridade sugerem que exista uma dissociação funcional desses dois processos dentro do Lobo Temporal Medial. A familiaridade tem sido associada com os córtices entorrinal, perirrinal (em humanos e roedores) e pósrrinal (parahipocampal em primatas), enquanto a recordação tem sido associada com o hipocampo. Acredita-se, portanto, que a familiaridade e a recordação trabalham de forma paralela e independente, com o intuito de fornecer a experiência de reconhecimento global (Cohen & Stachman, 2015; Schoemaker *et al.*, 2017).

Os córtices perirrinal, entorrinal e pósrrinal são identificados como componentes dos fluxos de entradas sensoriais dependentes da experiência que ocorre dentro do hipocampo. Tradicionalmente, acredita-se que somente no hipocampo ocorre a associação das informações "o que", transmitida através do córtex perirrinal, e "onde", transmitida através dos córtices entorrinal e pósrrinal (Ranganath *et. al.*, 2004; Cohen & Stachman, 2015).

Relacionar as informações "o que" e "onde" é essencial para o direcionamento diário de adultos. Por exemplo, encontrar um carro em um estacionamento lotado exige a ligação da memória para as características do objeto, como a cor e modelo do carro, com a memória para a posição do objeto, como a distância em relação à direção de um ponto de referência (Plumert, Franzen, Mathews & Violante, 2017).

A memória espacial pode ser definida como a função cerebral responsável por reconhecer, codificar, armazenar e recuperar informações espaciais sobre o arranjo de objetos ou rotas específicas e, embora, esta memória esteja presente na maioria das espécies animais, as representações da memória espacial podem ser bastante diferentes em humanos e outros animais uma vez que os seres humanos são capazes de usar representações espaciais simbólicas, como mapas, e informações orais ou escritas (Paul *et. al.*, 2009).

O hipocampo tem um papel essencial na codificação de memórias de longo prazo e, assim como as regiões circunvizinhas do Lobo Temporal Medial, exhibe particular importância na memória espacial. As células de lugar nas áreas CA1 e CA3 do hipocampo, combinadas com células de direção da cabeça e de grade presentes no córtex entorrinal medial de roedores, primatas e humanos, fornecem um sistema interno de coordenadas que informa ao indivíduo a sua localização em relação ao ambiente e codifica a memória desse local. Nos roedores, esta rede de neurônios possibilita que eles consigam explorar os ambientes familiares de forma eficiente, graças a sua posição e orientação no espaço. Em humanos, a disfunção neste circuito provoca problemas de memória e desorientação, que são os primeiros sintomas da doença de Alzheimer (Ainge & Langston, 2012; Muessig, Hauser, Wills & Carucci, 2016; Nadasdy *et al.*, 2017; Tan, Will & Cacucci, 2017).

A cognição espacial é obtida através do comportamento exploratório, que é instintivo e amplamente preservado em todas as espécies animais, incluindo o homem. A capacidade dos animais para representar internamente o espaço externo e usar essa representação para orientar o comportamento foi primeiro sugerido por Tolman em 1948,

através da teoria do mapa cognitivo, a qual afirma que o processo de resolução de labirintos por animais em experimentação não pode ser explicado apenas pela utilização sistemática de associações entre estímulos externos e respostas comportamentais, pois após certo período de treinamento, os animais são capazes de inferir atalhos, ou mesmo estabelecer estratégias para resolver os labirintos. Segundo a teoria, as células de lugar, grade e direção da cabeça formam a base neural do mapa cognitivo. Com base nesses achados, crescentes pesquisas foram direcionadas para a memória espacial e seus circuitos, onde muitas delas têm como sujeitos dos experimentos os roedores (Paul *et al.*, 2009; Ainge & Langston, 2012; Nadasdy *et al.*, 2017; Tan *et al.*, 2017).

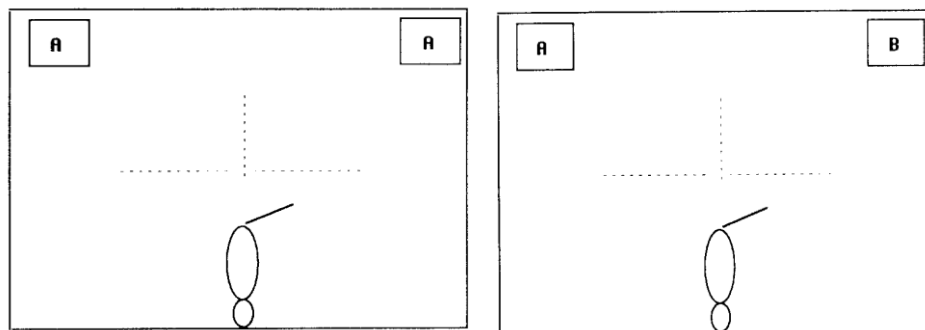
O surgimento da memória espacial e do comportamento converge com a necessidade do animal em explorar o espaço para a sobrevivência fora do ninho. A capacidade dos ratos para aprender e lembrar localizações espaciais não está presente desde o nascimento, mas desenvolve ao longo da adolescência para a idade adulta precoce. A exploração do ambiente inicia com o abrir dos olhos, ocorrendo quando estão com aproximadamente 15 dias de vida. No entanto, antes disso, as células de direção da cabeça já começam a emergir em torno do 12º dia pós-natal, seguidas das células de lugar e por último as de grade, no 21º dia, coincidindo com a fase de desmame e início da adolescência (Ainge & Langston, 2012; Tan *et al.*, 2017).

O nível de amadurecimento também difere entre esses neurônios. As células de direção da cabeça e as de grade mostram picos rápidos de desenvolvimento, em oposição às células de lugar, que mostram uma tendência mais gradual de maturação. O surgimento das habilidades espaciais aloclínicas ocorre somente aos 20-21 dias de vida, enquanto que o processamento associativo na rede de células de lugar torna-se evidente a partir do 16º dia pós-natal (Tan *et al.*, 2017; Muessig *et al.*, 2016).

## **1.2 Modelos Animais de Memória de Reconhecimento e Espacial**

Todo esse entendimento foi possível graças aos avanços nos métodos de pesquisa. No estudo da memória de reconhecimento em humanos, por exemplo, o uso de imagens por ressonância magnética funcional, possibilitaram a identificação de padrões de ativação neural específica nas regiões associadas com a recordação e familiaridade. Contudo, como há limitações nessa população no que diz respeito aos procedimentos, os modelos animais, em particular os roedores, permitem investigar os circuitos neurobiológicos da memória não espacial e os mecanismos celulares da memória de reconhecimento com maior detalhe (Cohen & Stachman Jr., 2015; Brown & Banks, 2015; Warburton & Brown, 2015).

Ennaceur e Delacour (1988) propuseram a tarefa de reconhecimento de objetos novos (RON) com ratos (figura 2), tomando como base o paradigma de preferência espontânea à novidade e diferenciando das outras tarefas de reconhecimento da época. Embora haja uma variação quanto aos procedimentos da tarefa, como o uso de arena ou labirinto em Y como aparato, esta tarefa possui uma sessão de treinamento ou amostra, em que o roedor explora dois objetos idênticos por um período de tempo, em seguida o animal é removido da arena durante um tempo específico (isto é, atraso de retenção). Decorrido este tempo (que também é variável entre as pesquisas) ele retorna ao aparato para a sessão de teste, em que será permitido explorar uma réplica exata do objeto já apresentado (objeto familiar) e um objeto novo. Durante a fase de amostra ocorre a codificação da memória do objeto, já a consolidação do mesmo acontece no intervalo entre as sessões e durante o teste é solicitado ao animal a recuperação da memória do objeto. A preferência pelo objeto novo, demonstrada pelo tempo de exploração, indica que um traço de memória para o objeto familiar foi devidamente codificado, consolidado e então recuperado para guiar o comportamento do roedor durante a sessão de teste (Ennaceur & Delacour, 1988; Ennaceur, Michalikova, Bradford & Ahmed, 2005; Ennaceur, 2010; Winters, Saksida & Bussey, 2008; Ainge & Langston, 2012; Cohen & Stachman Jr., 2015).



**Figura 2.** Fases de amostra (esquerda) e teste (direita) da tarefa RON. Retirado de Ennaceur e Delacour (1988).

De acordo com Ennaceur (2010) ratos, adultos ou jovens, quando apresentados a um objeto familiar ao lado de um objeto novo, frequentemente passam mais tempo explorando o objeto novo do que o familiar.

O teste de reconhecimento de objetos novos tem várias características interessantes: é semelhante aos testes de reconhecimento visual amplamente utilizado em primatas não humanos e em humanos, o que permite comparações entre espécies; é baseado no comportamento espontâneo de ratos e pode ser considerado como um teste de memória de trabalho "puro" completamente livre de componente de memória de

referência; não requer treinamento; não envolve o reforço primário tal como o alimento ou os choques elétricos, isto o faz comparável aos testes da memória usados atualmente no ser humano (Ennaceur & Delacour, 1988; Clark & Martin, 2005). Por ser uma tarefa que avalia a memória para eventos únicos a torna mais sensível a intervenções experimentais amnésicas e além do mais, os roedores não necessitam de nenhum treinamento para induzir o comportamento exploratório do objeto na tarefa, em oposição a outras tarefas como a de não-correspondência tardia para amostra, que além de exigir repetição na realização da tarefa, requer recompensa ou punição (Nemanic, Alvarado & Bachevalier, 2004; Eacott & Norman, 2004; Dere, Huston & Silva, 2007; Ennaceur, 2010; Cohen & Stachman, 2015).

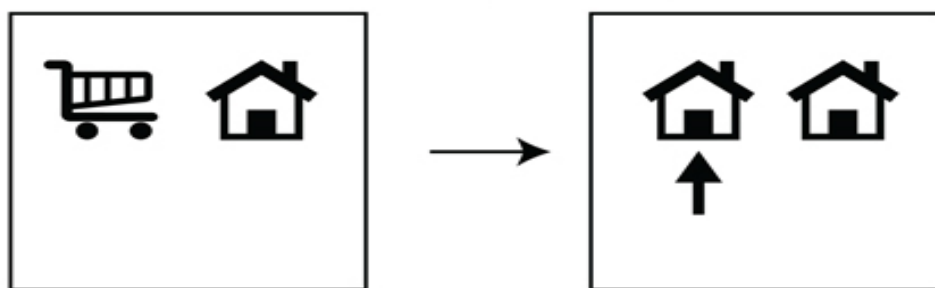
Ainge e Langston (2012) realizaram um estudo com a tarefa RON em ratos com 24 e 30 dias no intuito de comparar a memória de reconhecimento em ratos adolescentes com idades diferentes. Na sessão de amostra, cada rato foi colocado em uma arena quadrada contendo dois objetos iguais (A1 e A2) por dois minutos. Após o intervalo de dois minutos, o rato foi recolocado na arena com um objeto antigo (A1) e um novo objeto (B1) no local do objeto A2, sendo possível explorá-los durante dois minutos. Como esperado para a tarefa, os animais apresentaram um taxa de exploração maior para B1 quando comparado a A1, no entanto, os índices dos ratos com 30 dias foram mais expressivos, quando comparados aos dos ratos mais novos.

Uma variante da tarefa de Reconhecimento de Objeto é a tarefa de Reconhecimento de Objeto Relacionada ao Contexto. Nesta tarefa, os ratos são expostos a dois pares de objetos idênticos dentro de dois contextos distintos. Após um intervalo, são colocados na arena em um dos contextos já apresentado e com um exemplar de cada objeto já explorado. Os ratos preferencialmente exploram o objeto desajustado para o contexto de teste (novo alvo) com base nas combinações de objeto e contexto anteriores (Dix & Aggleton, 1999; Ramsaram, Westbrook & Stanton, 2015).

Ramsaram *et al.* (2015) analisaram o perfil ontogenético de ratos adolescentes para a memória de reconhecimento de objetos relacionada ao contexto. Estes animais estavam sob um ciclo CE de 24h e foram divididos em 4 grupos etários: 17, 21, 26, 31 dias. Os resultados obtidos mostraram que a exploração dos objetos aumenta com o avançar da idade. Mas, os ratos com 17 dias, já podem aprender informação contextual e recuperar esses traços de memória depois de um intervalo de retenção curto.

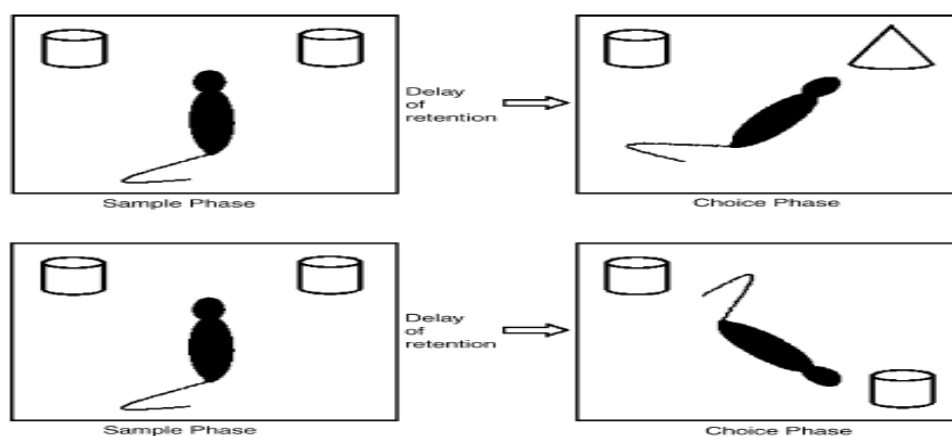
Para enriquecer os achados obtidos através da tarefa RON, Ainge e Langston (2012) examinaram a ontogenia dos circuitos neurais para representações espaciais através de um protocolo previamente publicado para memória de Reconhecimento

Espacial Associativo (localização do objeto). A tarefa de Reconhecimento Espacial Associativo foi realizada no mesmo dia da tarefa RON com os mesmos sujeitos, contudo no horário da tarde e utilizando objetos diferentes. Os animais foram colocados na arena contendo dois objetos C1 e D1 durante 2 minutos. Após um intervalo de 2 minutos, o rato era posto novamente na arena com um objeto D1 no mesmo local e outro objeto idêntico a D1 (D2) no local de C1. Nessa tarefa é esperado que o animal explore mais o D2, pois este objeto, apesar de ser igual a D1, está em um local diferente (Figura 3). Foi observado que os animais com 24 dias exploraram os objetos ao acaso, sugerindo que eles não tinham uma representação em pleno funcionamento do espaço externo, já os com 30 dias demonstraram uma preferência de exploração significativa para o objeto D2, mostrando uma memória clara para a associação entre o objeto e a localização espacial.



**Figura 3.** Representação da Tarefa de Reconhecimento Espacial Associativo. Extraído de Ainge e Langston (2012).

Ennaceur *et al.* (2005) realizaram o teste de ansiedade e as tarefas de reconhecimento de objetos e localização de objeto para avaliar se há diferenças entre os fatores emocionais e cognitivos em ratos das linhagens Lister e Wistar. As medidas examinadas foram: a latência da primeira abordagem; a frequência da abordagem; latências média e total entre as abordagens; duração média de uma abordagem; duração total das abordagens. Os sujeitos foram submetidos ao ciclo CE de 24h e estavam com 2 meses de idade no momento do experimento. A habituação serviu como avaliação da ansiedade. Em seguida ocorreu a tarefa RON e 48 horas após o término de RON, a tarefa localização do objeto. Durante a fase amostral desta tarefa os ratos foram expostos a dois objetos idênticos e na fase de escolha um deles foi movido para um novo local na arena (figura 4).



**Figura 4.** Representação esquemática da Tarefa de Reconhecimento do Objeto (acima) e da Tarefa de Localização do Objeto (parte inferior). Extraído de Ennaceur *et al.*, (2005).

Com base nos resultados dos dois testes, foi possível observar que os ratos Lister foram capazes de discriminar em ambos os testes. Já os ratos Wistar, apresentaram-se mais ansiosos na habituação e discriminaram os objetos apenas no teste de memória espacial. Também foi apontada uma diferença na sensibilidade entre as tarefas, e a possível explicação seria a diferença no processamento cognitivo da informação na memória espacial e não-espacial.

Ruby *et al.* (2008), utilizaram a tarefa RON para avaliar a função cognitiva de hamsters Siberianos arrítmicos, porém neurologicamente intactos. Eles observaram que estes animais, ao contrário do grupo controle, não conseguiram discriminar os objetos, apenas 20 ou 60 minutos após o treino.

### 1.3 Memória e ritmo circadiano

Além das propriedades já apresentadas, a memória também exibe ritmicidade. Entende-se por ritmicidade biológica os fenômenos que ocorrem em seres vivos de uma maneira mais ou menos estável e periódica (Araújo & Marques, 2002). Conforme Halberg, em 1959, os ritmos biológicos são classificados em: infradianos, quando seu período é superior a vinte e quatro horas; ultradianos, quando é inferior à vinte e quatro horas; e circadianos, quando a duração do período é de aproximadamente vinte e quatro horas (Abreu, 2011).

Um crescente corpo de evidências demonstra a influência dos ritmos circadianos na memória, assim como na aprendizagem e no desempenho cognitivo. Os animais possuem a capacidade de lembrar tanto a hora do dia, como a localização que condições nocivas e potencialmente perigosas ocorrem e adaptam seu comportamento para o mesmo horário na aparente expectativa da condição ser recorrente nos dias

subsequentes (Malik, Kondratov, Jamasbi & Geusz, 2015; Ralph *et al.*, 2002; Cain & Ralph, 2004, 2009; Cain, McDonald & Ralph, 2008). Peixes podem ser treinados para aprenderem em que parte do aquário irá encontrar alimento em determinada fase do dia, assim como roedores rapidamente aprendem associações espaciais dos alimentos específicas para a hora do dia (Smarr, Jennings, Driscoll & Kriegsfeld, 2014). A capacidade de aprender, lembrar e responder de acordo com o momento específico dos eventos tem um enorme significado adaptativo. Assim, além de associações de aprendizagem entre a hora do dia e de recursos, há pronunciadas mudanças diárias na capacidade de adquirir novas memórias (Ralph *et al.*, 2002; Cain & Ralph, 2009; Malik, Kondratov, Jamasbi & Geusz, 2015).

Em uma revisão sobre a interação entre o sistema circadiano e a memória, Smarr *et al.* (2014) observaram que ratos treinados em um labirinto aquático de Morris (LAM), não mostram déficit na aquisição após vários dias de avanços de fase, mas a retenção dia a dia sofre impactos negativos. Porém, à medida que os avanços de fase persistem por semanas, prejuízos na aquisição também começam a ocorrer, especialmente em tarefas espaciais (Craig & McDonald, 2008).

Segundo Karatsoreosa, Bhagata, Blossb, Morrisonb, e McEwena (2011) durante a neurogênese adulta, as células granulares recém-fabricadas e produzidas no giro denteado do hipocampo formam sinapses funcionais que parecem proporcionar um melhor desempenho das tarefas de memória espacial e reparação neural. Como o aumento da neurogênese está associado a habilidades cognitivas aprimoradas em roedores, o controle circadiano ótimo da divisão celular, que introduz novos neurônios no circuito do hipocampo, também pode aumentar o desempenho (Karatsoreosa *et al.*, 2011; Malik *et al.*, 2015).

Em linhas gerais, é possível observar as influências dos ritmos circadianos na memória, aprendizagem e desempenho cognitivo. Primeiramente, a interrupção dos ritmos circadianos tem sido associada a deficiências da função cognitiva. Em seres humanos essa condição é observada com o envelhecimento, trabalho em turnos, *jet lag* e doenças. Em segundo lugar, numerosos estudos afirmam que os processos subjacentes ao desempenho cognitivo mostraram alternâncias ao longo do dia. Roedores exibem déficits de retenção em inúmeras tarefas em intervalos periódicos, sugerindo que a recordação da memória está sujeita à modulação temporal separadamente da aquisição e da formação da memória. Em terceiro lugar, a hora do dia ou a fase do ciclo circadiano podem apresentar sugestões contextuais (estampa temporal), que são aprendidas juntamente com características do ambiente do organismo (Ralph *et al.*, 2002; Cain, Chou & Ralph, 2004;

Cain, McDDonald & Ralph, 2008). Em hamsters (Cain, *et al.*, 2004) e ratos (Garren, Sexauer & Page, 2013), quando a fase circadiana atua como estampa temporal a recordação e o desempenho são melhores com 24 horas de intervalo.

Em humanos, dados apontam que a modulação circadiana na memória de reconhecimento parece ocorrer de pelo menos duas formas: em relação ao horário da aquisição/consolidação, tendo o horário da tarde uma superioridade em relação ao da manhã; e de acordo com o horário em que ocorre a evocação (estampa temporal), onde os matutinos que foram treinados e testados no mesmo horário tiveram um melhor desempenho do que os fizeram em horários diferentes (Barbosa, 2007).

#### **1.4 Sincronização**

A adaptação temporal das espécies ao ambiente é de fundamental importância para garantir a sobrevivência. Isso é possível graças à presença do sistema de temporização circadiana, que é endógeno e originário de osciladores internos ou relógios biológicos (Golombek & Rosenstein, 2010; Dibner *et al.*, 2010). Estes relógios são autônomos e geram o ritmo circadiano, necessitando estar sincronizados ao ambiente a fim de lidar com as mudanças periódicas na disponibilidade de alimentos, exposição à luminosidade ou riscos predatórios. Para que haja a integração do tempo interno com o tempo geofísico, o organismo necessita captar os sinais de marcação temporal, os chamados Zeitgebers (Golombek *et al.*, 2013).

O termo zeitgeber foi criado por Aschoff em 1951 e significa "doador de tempo" ou "sincronizador" para se referir aos estímulos externos, pistas ambientais, como a temperatura e o ciclo claro/ escuro (ou dia/noite), que proporcionam o fenômeno de sincronização dos ritmos de diversas espécies.

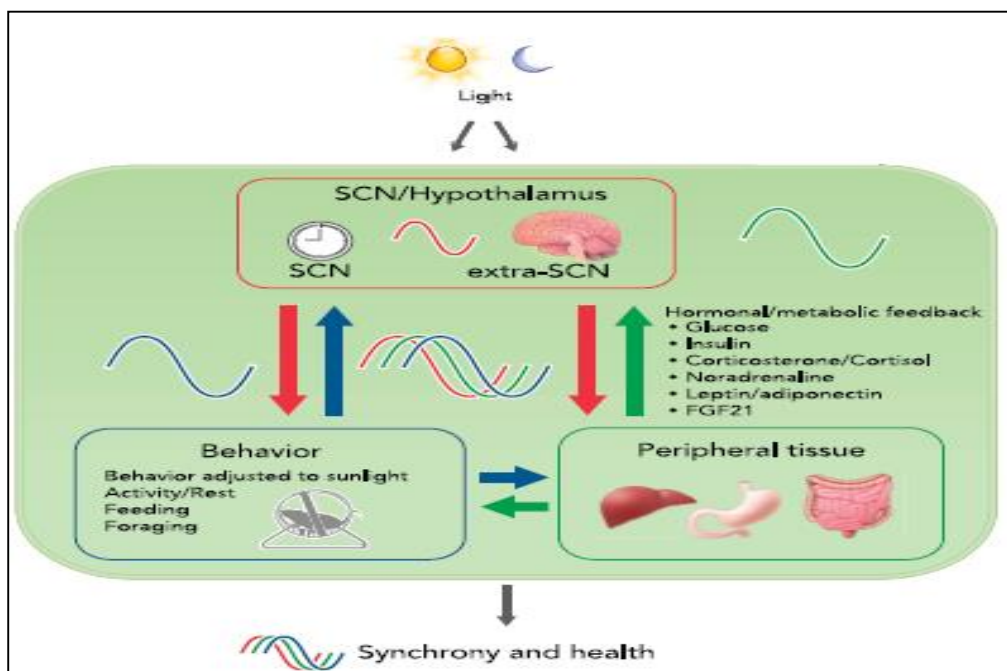
A sincronização pode ser estabelecida pelos mecanismos de arrastamento ou mascaramento. No arrastamento, os zeitgebers atuam diretamente sobre o funcionamento do oscilador endógeno, promovendo o ajuste da fase e do período do ritmo endógeno ao do ciclo ambiental, estabelecendo uma relação de fase estável. Este ajuste ocorre de forma progressiva ao longo de ciclos transitórios e envolve modificações funcionais no sistema de temporização. Os mascaradores atuam sobre as eferências do oscilador endógeno de forma transitória e independente, dessa forma alteram a expressão do ritmo biológico sem interferir no funcionamento do oscilador. Quando o elemento mascarador é suspenso, cessa o mecanismo (Folkard 1990; Marques & Menna-Barreto, 2003; Bueno, 2011).

O ciclo claro-escuro é o zeitgeber mais importante para a sincronização circadiana. Em mamíferos, para que a informação luminosa chegue a todas as células deve ser processada no núcleo supraquiasmático (NSQ), que corresponde a uma estrutura bilateral, localizada na porção anterior do hipotálamo, acima do quiasma óptico (Carneiro & Araújo, 2009; Carneiro, 2010; Engelberth *et al.*, 2013; Golombek *et al.*, 2013; Bonmati-Carrion *et al.*, 2014). É subdividida nas regiões ventrolateral (vINSQ) e dorsomedial (dmNSQ), com base na divisão anatômica e funcional. A região ventrolateral recebe o estímulo luminoso e arrasta o ritmo de dmNSQ ao CE ambiental, já a região dorsomedial expressa o ritmo endógeno do animal (Van den Pol, 1980; Moore, 1983, 1995; Rocha, 2010; Bujis *et al.*, 2016; Koike, 2013; De La Iglesia, Cambras, Schwartz e Díez-Noguera, 2004).

Desde a década de 70 é reconhecido que os NSQs são os relógios circadianos centrais de mamíferos (Hendrickson, Wagoner & Cowan, 1972; Moore & Lenn, 1972; Garcia, Rosen, & Mahowald, 2001; Engelberth *et al.*, 2013), sendo por meio destas estruturas que os organismos ajustam sua fisiologia e comportamento pró-ativamente às mudanças ambientais diárias, ao invés de apenas responderem reativamente. Esta antecipação é altamente funcional, pois leva à preparação das mais distintas funções (Bonmati-Carrion *et al.*, 2014; Krishnan & Lyons, 2015; Herrero *et al.*, 2015; Dibner *et al.*, 2010).

Existem, três aferências para os NSQs: o tracto retinohipotalâmico (TRH), tracto geniculohipotalâmico (TGH) e as terminações serotoninérgicas dos núcleos dorsal da rafe (NDR) e mediano da rafe (NMR). O TRH tem origem nas células ganglionares fotossensíveis da retina, que contém o fotopigmento melanopsina, e transmite informação fótica aos NSQs. As fibras monossinápticas deste tracto percorrem o nervo óptico e terminam na região vINSQ contralateral. Este tracto também se projeta para o folheto intergeniculado (FIG), que, recebe a informação luminosa e, após o processamento, também envia a informação fótica para o vINSQ, através do TGH. O FIG recebe também estímulos do NDR, havendo, portanto, uma integração de sinais luminosos e não-luminosos neste nível. As fibras serotoninérgicas provenientes do NDR e do NMR que terminam no núcleo supraquiasmático participam da sua regulação não-luminosa, a porção ventrolateral do NSQ está relacionada com a sincronização do NSQ, pois os neurônios presentes nesta região transmitem informação de claro e escuro para a porção dorsomedial (Dibner *et al.*, 2010; Abreu, 2011; Mohawk, Green & Takahashi, 2012; Engelberth *et al.*, 2013; Bujis *et al.*, 2016).

Após o processamento, os neurônios presentes nos NSQs transmitem a informação para relógios periféricos de diversos órgãos, como cérebro, coração e os músculos esqueléticos, de forma a sincronizar todos os ritmos individuais endógenos. Esta transmissão ocorre através de uma variedade de saídas como hormônios, metabólitos e por controle direto dos Sistemas Nervoso Autônomo e Neuroendócrino, além dos sinais indiretos, provocados por comportamento oscilante (figura 5) (Dibner *et al.*, 2010; Mohawk *et al.*, 2012; Silver & Kriegsfeld, 2014; Buijs *et al.*, 2016).



**Figura 5. Sincronização entre o sistema circadiano e a periferia.** O ciclo claro-escuro sincroniza a atividade e o ritmo do NSQ (SCN), que transmite este ritmo à periferia através do Sistema Nervoso Autônomo (seta vermelha) para sincronizar o comportamento e as funções dos órgãos periféricos. Por sua vez, a periferia envia feedback ao cérebro via metabólitos, hormônios e vias sensoriais autonômicas (seta verde) e, através da liberação de hormônios e metabólitos em conjunto com a sinalização autonômica, também afeta a atividade motora e o comportamento alimentar (seta verde). Através da atividade motora ou comportamento alimentar há retroalimentação para a periferia e o cérebro (setas azuis), ampliando a ritmicidade circadiana e sincronia (Adaptado de Kazemi *et al.*, 2016).

A melatonina, hormônio produzido pelas células da glândula pineal, é uma das vias de informação circadiana que contribuem para a sincronização entre organismo e meio externo. Durante a noite os seus níveis aumentam gradualmente, mas declinam até o início do dia, quando a sua síntese é suprimida pela luz. Estudos demonstram que até mesmo as lâmpadas de 200-300 lux podem produzir um efeito supressivo na sua produção (De La Iglesia *et al.*, 2009; Kalsbeek, Perreau-Lenz & Buijs, 2006; Crowley, Acebo & Carskadon, 2007). Um dos seus papéis mais importantes é o de transmitir informação acerca da duração do dia para o restante do organismo, de modo a organizar as funções fisiológicas sazonais, como a reprodução, o apetite, o peso corporal e o sono

(Abreu, 2011), além de exercer atividade nos ritmos circadianos da temperatura corporal, da homeostase da glicose, do sistema imunitário e da função cardiovascular (Kalsbeek *et al.*, 2006).

O alimento também é uma importante pista sincronizadora. Uma vez que a alimentação é uma necessidade indispensável à sobrevivência do organismo, estes lançam estratégias para aperfeiçoar a aquisição e a ingestão dos alimentos. Quando a disponibilidade de alimento é limitada temporalmente, os mamíferos alteram rapidamente os ritmos diários de fisiologia e comportamento, como a atividade motora, a temperatura corporal e a secreção de corticosterona, para correlacionar com o ritmo de disponibilidade alimentar (Carneiro & Araújo, 2009; Dibner *et al.*, 2010; Bujis *et al.*, 2016).

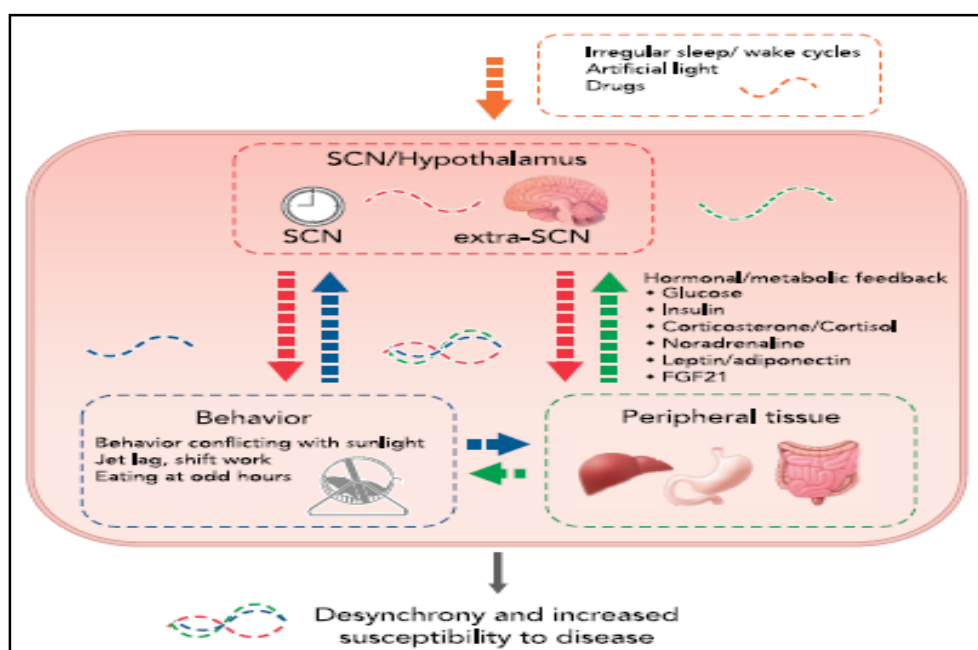
Os estímulos sociais também podem atuar como zeitgebers. Em várias espécies, incluindo os ratos e hamsters siberianos, os sinais maternos são zeitgebers primários, ocorrendo ainda intraútero e até o desmame (Mistlberger & Skene, 2004). Um dos mecanismos que podem arrastar o relógio circadiano fetal é a entrada aparentemente redundante de melatonina para as células no NSQ. No entanto, já no final da primeira semana de vida há sensibilidade do NSQ aos sinais fóticos (El-Henmany, Mateju, Bendová, Sosniyenko & Sumová, 2008; Mistlberger & Skene, 2004). Para a espécie de saguis *Callithrix jacchus*, encontrada em regiões de vegetação densa, como no nordeste brasileiro, as vocalizações co-específicas são os meios de comunicação mais eficientes para o contato entre os animais, mesmo em distâncias maiores, o que pode modular o sistema de sincronização circadiano, levando à sincronização do ritmo de atividade (Silva, Pontes, Cavalcante & Azevedo, 2014). Em humanos, a melhor evidência para o arrastamento social ocorreu com alguns indivíduos cegos que sincronizaram seu ciclo de sono-vigília para perto de 24 h em condições laboratoriais (Mistlberger & Skene, 2004).

### **1.5 Dessincronização**

Quando o sistema circadiano está em harmonia, os ritmos circadianos gerados nos NSQs sincronizam os osciladores periféricos em praticamente todas as células e tecidos (Herrero *et al.* 2015). Contudo, pode haver uma quebra do equilíbrio em diferentes níveis, tanto entre o NSQ e os relógios periféricos, quanto entre o NSQ e o tempo geofísico (figura 6). Alguns fatores, patológicos ou não patológicos, endógenos ou exógenos, podem levar à dessincronização dos ritmos circadianos e alterar o seu período, ficando maior ou menor do que às 24 horas esperada (Engelberth *et al.*, 2013; Wirz-Justice, 2008).

Mesmo na presença dos zeitgebers naturais, ao longo do tempo o indivíduo pode apresentar uma dessincronização interna, ou seja, exibir diferenças na duração dos seus ritmos internos. A desagregação entre os ciclos circadianos e o dia/noite pode resultar na dissociação de vários ritmos internos, todavia nem todos são afetados igualmente (Abreu, 2011).

O trabalho em turnos e o *Jet Lag* são exemplos de fatores que interferem na sincronização entre o organismo e o ambiente. O trabalho em turno compreende um horário diferente do habitual, ou seja, antes das 7 horas e depois das 18 horas (Kazemi *et al.*, 2016). O *Jet Lag* está presente quando um indivíduo viaja para diferentes longitudes e sofre uma dessincronização transitória dos ciclos circadianos, sendo que estes se recompõem quando se ajustam à hora local. Outro exemplo é o *Jet Lag* social, que corresponde à mudança no cronograma entre os dias úteis e os dias livres dos indivíduos, sendo uma medida de desalinhamento entre a agenda do indivíduo para o trabalho e seu ritmo endógeno (Abreu, 2011; Baron & Reid, 2014; Krishnan & Lyons, 2015).



**Figura 6. Dessincronização entre o sistema circadiano e a periferia.** A dessincronização assim como o desenvolvimento de doenças podem ocorrer em longo prazo, quando o ciclo claro-escuro, o comportamento e os sinais periféricos não se alinham com o SCN (NSQ) ou o hipotálamo (setas quebradas) (Adaptado de Kazemi *et al.*, 2016).

O trabalho em turnos pode interromper o ciclo do sono, levando a uma redução na quantidade de sono. Esta privação pode levar a distúrbios do desempenho cognitivo, como redução da capacidade de concentração e diminuição da capacidade de aprender e recordar novos fatos; além do comprometimento nas habilidades motoras;

irritabilidade; falta de adaptação às necessidades emocionais no local de trabalho (Kazemi *et al.*, 2016).

O *Jet Lag* social demonstra relação com um maior índice de massa corpórea (IMC) e duração do sono insuficiente em indivíduos com sobrepeso (Roenneberg, Wirz-Justice, & Mellow, 2003; Roenneberg *et al.*, 2007; Roenneberg, Allebrandt, Mellow & Vetter, 2012). Além do que, há uma forte associação com o tabagismo, consumo de álcool e cafeína (Wittmann, Paulus, & Roenneberg, 2010).

O Transtorno *Jet Lag* se enquadra na categoria de perturbações do ritmo circadiano do sono na Classificação Internacional de Distúrbios do Sono (CIDS-2) e os possíveis sintomas são: dificuldade em dormir, sonolência diurna excessiva, função diurna prejudicada, desconforto gastrointestinal, ansiedade, transtorno de humor, queixas cardiovasculares, alteração da função metabólica, diabetes, tonturas e irregularidade menstrual em mulheres (Bonmati-Carrion *et al.*, 2014; Baron & Reid, 2014). Para considerar que um indivíduo sofra com o transtorno não é necessário que haja um número mínimo de ocasiões ou uma duração específica de sintomas. O comprometimento funcional resulta da combinação do desalinhamento circadiano e a perda de sono associada (Baron & Reid, 2014).

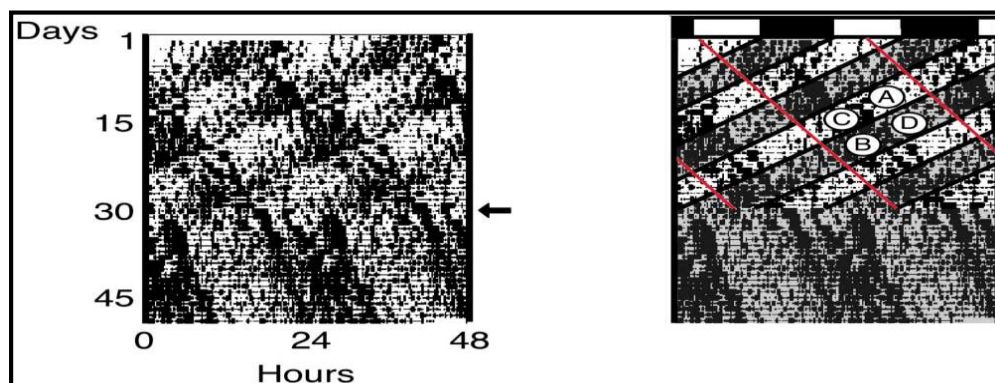
A perturbação no ciclo claro/escuro é responsável por um ritmo de melatonina diminuído. Estudos epidemiológicos têm demonstrado riscos aumentados de câncer de mama, próstata, colorretal e endometrial. Estes dados epidemiológicos foram explicados por uma interrupção do oscilador circadiano, bem como pela exposição à luz artificial durante a noite e a subsequente diminuição dos níveis de melatonina. Uma vez que o oscilador circadiano está envolvido nas principais vias celulares da divisão celular, a sua ruptura pode estar ligada a perturbações no controle do ciclo celular, que tem sido associado com o câncer (Bonmati-Carrion *et al.*, 2014).

### **1.5.1 Dessincronização forçada - Modelo T22**

Campuzano, Vilaplana, Cambras e Díez-Noguera (1998), desenvolveram um modelo de dessincronização forçada interna em que os ratos ao serem submetidos a um ciclo claro/escuro menor que um período de 24h apresentavam dois ritmos de atividade motora.

Sob um ciclo CE de 22h simétrico (11:11) os ratos demonstram dois ritmos de atividade motora de maneira estável e simultânea, sendo: um arrastado pelo CE exibe período de 22 horas (T22), nomeado componente sincronizado pela luz (CSL); outro

dissociado do ciclo CE apresenta período superior a 24 h ( $\tau > 24$ ), nomeado componente não sincronizado pela luz (CNSL), (figura 7). Ao longo do tempo, os períodos alternam entre fases alinhadas, em que a fase de atividade do CNSL ocorre durante a fase escura do ciclo CE (sobrepondo-se à fase de atividade do T22), e fases desalinhadas, em que a fase de atividade do CNSL ocorre durante a fase de luz (sobrepondo-se com a fase de repouso T22) (Campuzano *et al.*, 1998; De La Iglesia *et al.*, 2009).



**Figura 7. Atividade motora de um rato mantido sob CE com período de 22 horas (T22) (11h claro, 11 h escuro), exibido pelos actogramas.** O actograma à direita evidencia a diferença entre os dois ritmos da atividade motora. As bandas branca e cinza representam, respectivamente, as fases de claro e escuro do ritmo arrastado pela luz. Já a linha vermelha demonstra o ritmo não arrastado pela luz, que exibe um período maior que 24 horas, ou seja, encontra-se em livre curso. A, B, C e D indicam se os animais encontravam-se ou não em coincidência com a fase ambiental (Adaptado de De La Iglesia *et al.*, 2004).

De acordo com o actograma (**figura 7**, à direita), a fase representada pela letra A remete à coincidência da fase de baixa atividade motora dos dois componentes rítmicos; ambos se encontram na fase dia, coincidindo o dia biológico com o dia ambiental (claro); B retrata quando há coincidência da fase de alta atividade motora em ambos os componentes rítmicos, coincidindo então a noite biológica com a noite ambiental (escuro); C representa a fase em que os dois componentes rítmicos estão em não coincidência, o animal apresenta atividade motora correspondente à noite biológica, mas encontra-se na fase clara, ou seja, no dia ambiental; D é o inverso de C, o animal apresenta atividade motora correspondente ao dia biológico (repouso), mas está na noite ambiental, ou seja, na fase escura (De La Iglesia *et al.*, 2004).

Campuzano *et al.*, (1998) observaram que quando o ciclo é próximo ao período endógeno, por exemplo, de 23,5h, há uma sincronização entre o sistema interno e o externo, ou seja, o sistema é completamente arrastado por pistas externas, apresentando um único ritmo de atividade motora.

A partir do experimento de De La Iglesia *et al.*, (2004), que submeteu ratos com 2 meses de vida ao protocolo de dessincronização forçada, modelo T22, foi possível entender as mudanças que ocorrem nos NSQs que justificam os dois ritmos de atividade motora. Sob este protocolo, há um desacoplamento entre as regiões ventrolateral e dorsomedial dos NSQs. A região vlNSQ permanece em consonância com o ciclo CE de 22h, enquanto a dmNSQ exibe o período maior que 24h, ou seja, em livre-curso, mesmo quando submetidos ao escuro constante.

Para avaliar o padrão de liberação de melatonina sob dessincronização forçada De La Iglesia *et al.*, (2009) expuseram ratos ao ciclo CE de 22 horas. Os animais apresentaram uma dessincronização interna dos ritmos da temperatura corporal, da atividade motora, do sono e da melatonina. A liberação desta última passou a ser controlada por osciladores distintos, o ciclo claro/escuro (CE) e os ritmos endógenos, refletindo a assimetria do acoplamento entre eles. O resultado da dissociação é um padrão recorrente de compressão sucessiva de liberação de melatonina seguido por um atraso de fase. Diferente do período CE de 24 horas, no modelo T22, a região vlNSQ não consegue exercer influência sob a região dmNSQ, desta maneira, não consegue arrastar a região dmNSQ ao ciclo CE externo.

Ribeiro (2011) avaliando o ritmo de atividade- repouso e ciclo sono-vigília de ratos adultos sob ciclo CE de 22h, tanto em noite de coincidência, quanto em não coincidência com o ambiente observou que em coincidência, os animais apresentam maior atividade motora e menor tempo de vigília do que os animais em ciclo claro-escuro de 24h. Já os animais do grupo T22 não coincidência mostraram inversão no padrão de atividade motora e ciclo sono-vigília.

Neto, Carneiro, Valentinuzzi & Araújo (2008) submeteram ratos adultos ao modelo T22 e analisaram o efeito da dissociação do ritmo no desempenho da atividade motora nas tarefas esquivas passiva e reconhecimento de objetos. Eles concluíram que a dissociação do ritmo circadiano compromete o desempenho na tarefa de esquivas passiva e dessa forma pode afetar seletivamente alguns componentes emocionais, relacionado ao medo e à avaliação de risco.

De La Iglesia *et al.*, (2016) demonstraram que ratos em fase adulta, 60 dias de vida, submetidos ao modelo T22, apresentam fenótipos tipo depressivo, incluindo anedonia, disfunção sexual e aumento da imobilidade no teste de nado forçado durante a fase escura (ativa), mas diminuindo a imobilidade durante a fase de luz (repouso), sugerindo uma diminuição da amplitude da oscilação diária normal nesta manifestação comportamental da depressão. Tais resultados suportam a hipótese de que o

desalinhamento interno prolongado dos ritmos circadianos induzidos pelo desafio ambiental ao marcapasso circadiano central pode constituir parte da etiologia da depressão.

### **1.5.2 Dessincronização em adolescentes**

A neurogênese dos NSQs em ratos ocorre ainda na fase embrionária, entre os dias 14 e 18, mas o amadurecimento só ocorre no 10º dia após o nascimento, quando atingem um padrão similar ao de animais adultos, através do acoplamento intercelular (El-Henmany *et al.*, 2008).

Em seres humanos, o sistema de temporização modifica-se durante o desenvolvimento, com mudanças no seu funcionamento endógeno e na sua relação com o ambiente (Bueno, 2011). Durante a gestação, a liberação de cortisol e melatonina pelo organismo materno contribui para o arrastamento do ritmo circadiano fetal (Garcia, Rosen & Mahowald, 2001), sendo observado ritmo circadiano a partir das 29 semanas pós-concepção (Bueno, 2011). Após o nascimento, os recém-nascidos mostram uma perda notável, não havendo quase nenhum ritmo circadiano nas primeiras semanas. Sono e vigília são extremamente variáveis neste tempo, começando a demonstrar uma relação no segundo mês de vida (Kleitman e Engelman, 1953). Parmelee em 1961 conseguiu perceber um padrão de sono/vigília de 24 horas a partir da 6ª semana de vida e consolidação após a 12ª semana, com característica de evolução não linear.

Diferente da infância, durante a adolescência humana, o NSQ pode se tornar mais sensível aos efeitos retardantes da fase da luz, apresentando um atraso de fase. Nesta fase do desenvolvimento é observado que o período circadiano (o comprimento interno do dia) torna-se mais longo (Carskadon, 2011; Hagenauer, Perryman, Lee & Carskadon, 2009; McGinnis, *et al.*, 2007; Carskadon *et al.*, 1999; Weinert, Eimert, Erkert & Schneyer, 1994).

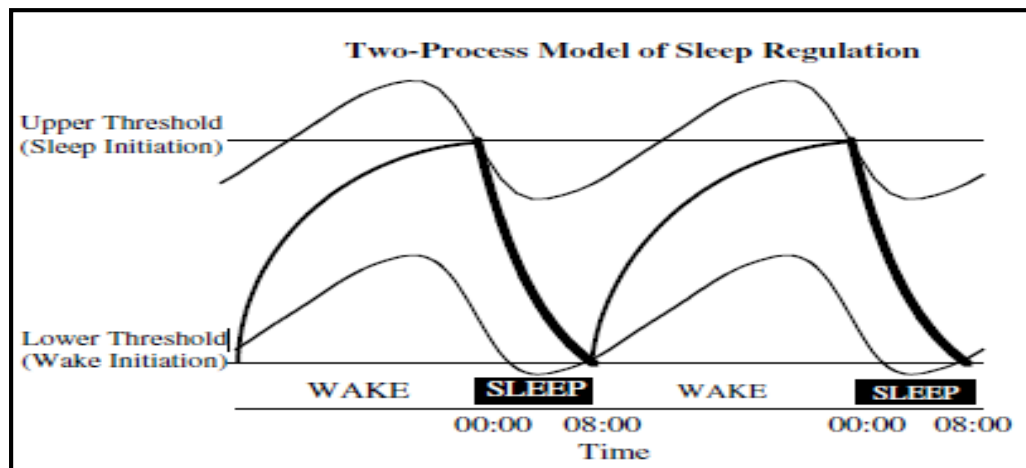
Pesquisas demonstram que os padrões de sono/vigília durante a adolescência passam por transformações. O tempo de início do sono tende a ser adiado quando os adolescentes envelhecem, há uma diminuição na qualidade e duração do sono. No contexto social atual também é percebido que os adolescentes são submetidos a deslocamentos de fase semanal por questão do hábito de dormir mais tarde. Essa mudança mostra relação com uma série de fatores ambientais, incluindo redução da influência dos pais nas horas de dormir, aumento do dever de casa e das atividades extracurriculares, como esportes, além do uso de aparelhos eletrônicos e digitais

(Andrade, Benedito-Silva, Domenice, Arnhold & Menna-Barreto, 1993; Albert *et al.*, 2013; Crowley *et al.*, 2007).

Estes desvios de fase não são encontrados na natureza e podem implicar em modificações do comportamento circadiano e, na maioria dos casos, também em alterações fisiológicas tais como alterações no sistema imunitário (Albert *et al.*, 2013), transtornos de humor, em especial a depressão, que diminuem a socialização (Touitou, 2013; Abreu, 2011; Koike, 2013). Além do mais, tais desvios são tolerados de maneira diferente conforme a faixa etária, os sujeitos mais velhos têm mais dificuldades em se ajustar a mudanças de fase, o que pode ser devido ao comprometimento do sistema circadiano que ocorre em idade avançada (Albert *et al.*, 2013).

Uma vez que o atraso de fase está presente não somente no sono de adolescentes de diferentes culturas, mas em diferentes espécies de mamíferos, e como parece estar relacionado ao estágio puberal e não à idade os mecanismos biológicos estão fortemente envolvidos (Saxvig, Pallesen, Wilhelmsen-Langeland, Molde & Bjorvatn, 2012). Conforme Borbély (1982) e seu “Modelo de dois processos do regulamento do sono” há uma relação entre a homeostase do sono/vigília e o sistema de tempo circadiano.

De acordo com este modelo o sono é favorecido por meio da diferença entre os processos S e C. O processo C compreende o componente circadiano (originado no NSQ) e o processo S ao componente homeostático do sono/vigília. O sono ocorre quando o processo S atinge um limite superior e o despertar ocorre quando o processo S está abaixo do limite inferior. O processo C controla os limiares e foi denominado "somnostato", uma analogia com um termostato. Ainda conforme o modelo, o sono e o despertar são iniciados em fases circadianas diferentes, como consequência a frequência do ciclo sono/vigília depende da distância entre os dois limiares ou fases (figura 8). Alterações no processo S e C favorecem o atraso da fase do sono, deslocando o período de sono principal para uma fase posterior do ritmo circadiano (Crowley *et al.*, 2007; Carskadon, 2011; Saxvig *et al.*, 2012).



**Figura 8. Esquema do Modelo de dois processos do regulamento do sono.** As linhas em negrito representam o processo S: a pressão do sono se acumula durante o despertar e se dissipa durante o sono. O processo C regula o tempo de sono para que, quando a pressão do sono ultrapasse um limiar superior, o sono é iniciado e, quando a pressão do sono cai abaixo de um limite mais baixo, o despertar ocorre. O Processo S e o Processo C se alinham para que o sono seja programado a partir da meia-noite até às 0800 h, horário de sono adulto típico. (Retirado de Crowley *et al.*, 2007).

O desalinhamento entre o ritmo de sono-vigília e as demandas diárias obrigam os adolescentes com uma fase de sono atrasada a realizar as atividades na faixa em que os processos C e S promovem o sono. Assim, estes adolescentes acordam antes de dormirem o necessário (Saxvig *et al.*, 2012). Assim, a redução gradual do tempo de sono com o horário de dormir progressivamente retardado, resulta em um deslocamento circadiano crônico (Crowley *et al.*, 2007; Saxvig *et al.*, 2012; Touitou, 2013).

Um estudo longitudinal com 66 adolescentes foi realizado para estudar os parâmetros do ciclo sono/vigília e as influências biológicas e sociais sobre os padrões do sono, em mudança nessa população. Após avaliação, foi observado que: 53% referiram despertares noturno (6% acordaram todas as noites, 17% ocasionalmente a cada semana e 30% ocasionalmente a cada mês no primeiro semestre); cerca de 60% relataram sonolência diurna nos dias escolares, coincidindo a sonolência matinal com o horário do sono em dias não escolares. Como os fatores sociais mantiveram-se constantes durante a pesquisa, sugeriu-se que as mudanças observadas representavam uma tendência ontogênica da puberdade (Andrade *et al.*, 1993).

Hashler e Clark (2013) revisaram como as mudanças no desenvolvimento do sono e ritmos circadianos, que ocorrem durante a adolescência, podem contribuir para disfunção cerebral relacionada ao sistema de recompensa, e, conseqüentemente, aumentar o risco de transtornos por uso de álcool. Na análise de estudos feitos com humanos eles observaram que adolescentes com cronotipo mais noturno mostram semelhantes indicadores de desalinhamento circadiano, atividade cerebral alterada em áreas envolvidas no processamento de recompensa, maior desregulação psicológica e

envolvimento com álcool e outras substâncias psicoativas. Assim, evidências crescentes indicam que os ritmos circadianos modulam o sistema de recompensa e sua dessincronização pode prejudicar o controle inibitório e outros processos cognitivos relevantes.

Shochat *et al.*, (2014) realizaram uma revisão sistemática para avaliar a associação entre o sono inadequado (perda de sono, perturbações do sono e insônia) e as deficiências em várias medidas de saúde (somático e psicossocial) e atividades diurnas (desempenho escolar e comportamentos de risco) em púberes, concluíram que o sono inadequado tem efeito negativo sobre as demais variáveis, podendo persistir durante a idade adulta. Eles ressaltaram que por essa condição ser passível de prevenção e tratamento é de extrema necessidade a continuação da investigação.

## 2. JUSTIFICATIVA

O ritmo da sociedade moderna cada vez mais induz o indivíduo a dessincronizar seus ritmos biológicos, seja por viagens, *Jet Lag* social ou trabalho em turno ou noturno. Os adolescentes, em particular, para cumprir com as demandas acadêmicas, realizar atividades extracurriculares e manter um convívio social, adotam o hábito de dormir mais tarde, mesmo nos dias da semana (Colrain & Baker, 2011; Crowley *et al.*, 2007; Albert *et al.*, 2013).

O sono é fundamental, dado o seu papel no desenvolvimento físico, comportamental, emocional e intelectual, além de restaurar funções do organismo, evitar a fadiga diurna e promover a aprendizagem e memória (Shochat *et al.*, 2014; Touitou, 2013; Tzischinsky & Shochat, 2011).

Albert *et al.*, (2013) ressaltam a importância em estudar o efeito dos atrasos e avanços de fase de forma crônica sobre a fisiologia e comportamento dos jovens, visto que é crescente o número dos que alteram o sono por condições de iluminação. Os autores sugerem o rato como um bom modelo animal para este tipo de estudo, visto que atinge a maturidade sexual na fase adulta, em torno dos 60 dias de vida, e podem ser desmamados já aos 21 dias de vida, fase que inicia a adolescência (Koolhaas, 2010).

Outra vantagem dos ratos como modelo animal é que o seu sistema de temporização tem sido o mais bem estudado até o momento, com evidências de que as influências ambientais podem interferir na organização das estruturas do sistema de temporização durante seu desenvolvimento e, conseqüentemente, na posterior manifestação da ritmicidade circadiana no animal adulto (Bueno e Wey, 2012).

Conforme o estudo de Albert *et al.*, (2013) ratos adolescentes submetidos a deslocamentos de fase de forma crônica são capazes de desenvolver um único e estável ritmo circadiano. Isto indica que o sistema circadiano durante a adolescência deve desenvolver algumas adaptações para lidar com a alteração dos padrões de iluminação que pode ser o aumento do acoplamento interno do relógio circadiano, o que não foi visto nos animais adultos da mesma pesquisa. Sugerindo que os jovens respondam diferentemente a luz e que esta capacidade adaptativa pode induzir a um efeito permanente do sistema circadiano. Embora a plasticidade seja considerada uma característica positiva do sistema circadiano de adultos jovens, pode também acontecer que, no caso de animais adolescentes o sistema circadiano irá ser permanentemente influenciado.

O presente trabalho traz uma grande contribuição sobre os prováveis prejuízos na memória causados pela frequente exposição a mudanças de fase crônicas que provocam distúrbios na ritmicidade circadiana. Apesar de haverem evidências sobre as consequências da dessincronização interna, pouco se sabe sobre seus efeitos principalmente na memória de mamíferos adolescentes.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral**

Caracterizar os efeitos de um ciclo claro-escuro de 22 horas na memória e expressão do ritmo circadiano da atividade motora de ratos adolescentes.

#### **3.2 Específicos**

- Avaliar a expressão da ritmicidade circadiana da atividade motora dos ratos submetidos a um ciclo claro-escuro de 22 horas durante a adolescência.
- Investigar os efeitos de um ciclo claro-escuro de 22 horas sobre a memória de reconhecimento de ratos adolescentes, por meio da tarefa de reconhecimento de objetos novos.
- Investigar os efeitos de um ciclo claro-escuro de 22 horas sobre a memória espacial de ratos adolescentes, por meio da tarefa espacial associativa.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar (n= 42), sendo 12 animais pertencentes ao grupo controle e 30 aos grupos experimentais.

Os animais foram provenientes do Biotério Professor Thomas George da UFPB e foram tratados conforme as diretrizes da legislação brasileira para a utilização dos animais em pesquisa (Lei Arouca, nº 11.794/08). Todos os procedimentos foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal da Paraíba, CEUA/UFPB, nº 070713. Os animais recebiam água e ração *ad libitum* e eram mantidos em gaiolas de propileno (30 cm de comprimento x 37 cm de largura x 16 cm de altura) dentro de cabines de CE feitas em angelim pedra (figura 9). Cada cabine era iluminada por duas tiras de 1,5m de LEDs de luz branca, com 60 LEDs/m, conferindo a luminosidade média de  $56 \pm 25$  lux na fase de claro e de 0 lux na fase de escuro. As medições da luminosidade foram realizadas no centro acima de cada gaiola. As tiras ficavam sobre uma haste de madeira no centro da cabine, com os LEDs direcionados para o teto para evitar danos à retina dos animais pela incidência da luz direta nos olhos.

As cabines ficavam em uma sala com atenuação acústica, controle de temperatura ( $23,17^{\circ}\text{C} \pm 1,39^{\circ}\text{C}$ ) e umidade ( $42,08\% \pm 8,14\%$ ) A temperatura era controlada por um aparelho de ar-condicionado programado para manter a temperatura de  $24^{\circ}\text{C}$  na sala. Também havia exaustor de ar permanentemente ligado para renovação do ar.

O estado de saúde de todos os sujeitos experimentais foi monitorado por meio de medidas dos pesos corporais e da observação dos padrões de atividade motora e comportamentais.



**Figura 9.** Cabines de angelim pedra. Os ratos eram mantidos isoladamente em cada gaiola. À direita é possível visualizar três coolers pretos, utilizados para renovação do ar dentro das cabines. Além disso, cada Cabine tinha duas tiras de 1,5 m de LEDs de luz branca sobre uma haste de madeira acima das gaiolas, com os LEDs voltados para cima, fornecendo iluminação em torno de  $56 \pm 25$  lux dentro de cada gaiola. Acima de cada gaiola há um sensor de movimento por infravermelho. Cada sensor capta a atividade de um único animal, pois há um anteparo de isopor, coberto por papel madeira, entre cada gaiola e sensor.

## 4.2 Delineamento experimental

Machos e fêmeas genitores foram transferidos para a cabine sob ciclo CE (12:12) invertido, com as luzes acendendo às 19h e apagando às 07h. Eram acasalados 10 dias depois por ser o tempo necessário para sincronização ao novo ciclo. Dessa forma, foi excluída a influência da dessincronização temporária dos ritmos circadianos, que ocorre durante a ressincronização, sobre o desenvolvimento dos fetos.

Da prole resultante do acasalamento dos ratos acima, 44 machos foram randomicamente selecionados aos 21 dias de idade (dia 1 do experimento), no início da adolescência, sendo desmamados, pesados (média de  $41,8 \text{ g} \pm 13,14$ ), isolados em gaiolas e alocados nas cabines de CE de acordo com a seguinte divisão:

- Grupo Controle: 12 animais sob CE de 24h (12:12 h).
- Grupo Adolescentes Dessincronizados (adolescentes D): 30 animais sob CE de 22h (11:11 h).

Todos os animais passaram por tarefas comportamentais para avaliação dos efeitos da dessincronização forçada sobre a memória e emoção. As tarefas sempre ocorriam no meio da fase de escuro, sendo que para 16 dos Dessincronizados ocorreram no meio da noite de coincidência (quando é noite no ambiente e o rato está em sua noite

biológica) e para 14 ocorreram no meio da noite de não coincidência (quando é noite no ambiente, mas o rato está em seu dia biológico).

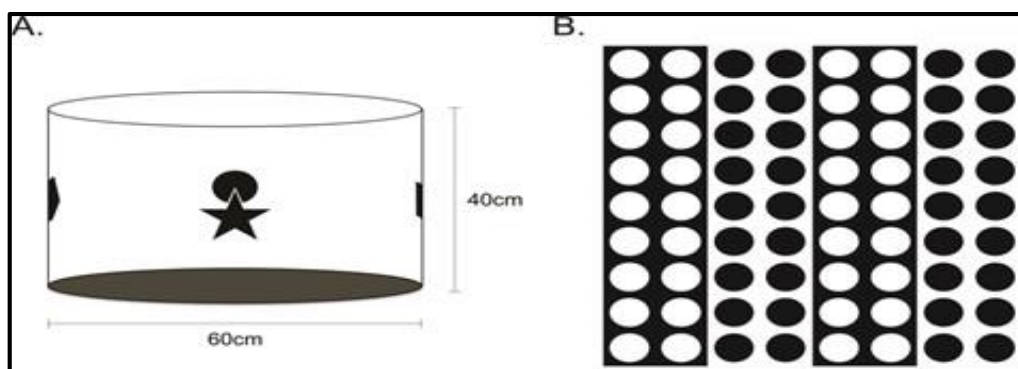
As tarefas comportamentais foram iniciadas aos 40 dias de idade dos ratos, ou seja, em torno do dia 19 do Experimento, e ocorreram em intervalos de aproximadamente 7 dias, que era o tempo necessário para a ocorrência de outra noite de coincidência ou de não coincidência.

As tarefas comportamentais foram realizadas na seguinte sequência: 1) Teste de Campo Aberto (correspondeu à Habituação 1 do protocolo experimental) e Reconhecimento de Objetos (dia 21 do experimento); 2) Tarefa Espacial Associativa; 3) Esquiva Passiva. Neste estudo, só serão apresentados os resultados para o Teste de Reconhecimento de Objetos Novos e a Tarefa Espacial Associativa, os demais resultados foram divulgados na dissertação de Pereira (2017).

Depois de finalizados todos os testes, aproximadamente no 42º dia do experimento, os animais foram encaminhados para eutanásia e os tecidos cerebrais do hipotálamo anterior, córtex pré-frontal e hipocampo foram removidos e armazenados para uma análise posterior.

### 4.3 Aparato experimental e objetos

O aparato utilizado foi um campo aberto em acrílico, medindo 60 cm de diâmetro e 40 cm de altura, com piso preto e parede transparente. Na tarefa de reconhecimento de objetos novos (RON) a arena circular era rodeada por cartolina preta para não haver nenhuma pista espacial. Já na tarefa espacial associativa, havia 4 figuras geométricas diferentes nas paredes da arena, que serviam como pistas proximais (figura 10 A) e pistas distais foram colocadas nas paredes da sala ao redor do campo (figura 10 B).



**Figura 10.** A- Campo aberto circular com pistas proximais. B- Imagem representativa das

pistas distais fixadas na parede da sala de experimento comportamental.

Os objetos utilizados durante as tarefas eram de plástico, mas com alturas, texturas, cores e formatos diferentes. Eles foram preenchidos com gesso para que os animais não os deslocassem durante a exploração (figura 11).



**Figura 11.** Foto ilustrativa dos objetos utilizados durante o experimento.

#### **4.4 Procedimentos experimentais**

Para realização do experimento os animais eram trazidos 30 minutos antes do início das tarefas para a sala de comportamento do LEMCOG, que já se encontrava com o ar-condicionado, ruído branco e iluminação ligados.

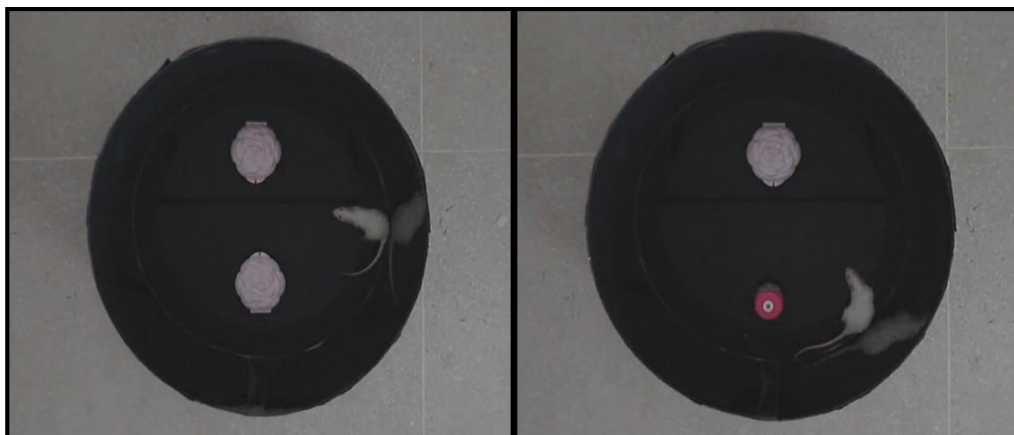
A temperatura do ar-condicionado era programada para manter em torno de 24°C. O ruído branco era reproduzido pelo software Windows Media Player, com o volume do software a 100% e o do notebook a 65%.

A intensidade luminosa era de 8 lux no centro do campo a uma altura de 20 cm e de 15 lux a 40 cm de altura. A iluminação da sala de experimentos era feita por duas luminárias com uma lâmpada de luz branca fria (6500k, 15 w, 50-60 Hz, Lm 815,6). Uma luminária ficava atrás da cortina, em cima da mesa do computador, tendo a luz direcionada para a parede, enquanto outra luminária ficava próxima à parede do ar-condicionado, coberta com folhas de papel A4 para controlar a luminosidade.

Neste protocolo experimental os animais passaram por duas sessões individuais de habituação ao campo aberto, uma sessão de amostra e uma de teste, tanto na tarefa RON, quanto na tarefa espacial associativa (TEA). O intervalo entre cada sessão durou 30 minutos, cada habituação teve a duração de 10 min e a amostra e o teste 5 min cada. Os animais sempre foram posicionados no centro do CA com a cabeça voltada para a parede do ar-condicionado, oposta a cortina. Os objetos também foram direcionados para o centro do campo a uma distância de 10 cm de distância da parede.

A primeira tarefa realizada foi a RON. Neste teste, dois objetos idênticos (A1 e A2) eram apresentados ao animal na fase de amostra e dois objetos distintos (A e B) na

fase de teste, sendo um já previamente apresentado na sessão anterior e o objeto novo no local de um dos objetos familiares (figura 12). Nesta tarefa é esperado que o animal explore mais o objeto B ao invés do A, na sessão de teste, por ser um objeto novo em um espaço familiar.



**Figura 12.** Objetos apresentados durante a sessão de amostra (à esquerda) e teste (à direita) na tarefa RON.

Na fase de amostra da TEA dois objetos distintos (A e B) foram apresentados aos animais, já na sessão de teste dois objetos idênticos (A1 e A2) foram expostos para a exploração dos animais, o objeto A1 encontra-se no mesmo local e outro objeto idêntico a A1 (A2) no local de B (figura 13). Nessa tarefa é esperado que o animal explore mais o objeto A2 ao invés do A1, pois o objeto A2, apesar de ser igual ao A1, está em um local que havia um objeto diferente antes.

Entre as sessões de habituação, amostra e teste o campo era limpo com papel toalha e uma solução de álcool etílico a 5%, com o intuito de diminuir as pistas olfativas entre os animais e após o término do experimento, os objetos e a arena eram limpos com álcool etílico a 70%.



**Figura 13.** Objetos apresentados durante a sessão de amostra (à esquerda) e teste (à direita) tarefa TEA.

Foi observado que 5 animais pertencentes ao grupo T22 e 1 animal do T24 não exploraram os objetos na fase de amostra da tarefa RON, sendo excluídos da análise estatística. Em relação à tarefa TEA, 3 participantes do grupo T22 e 1 do grupo T24 foram excluídos das análises pelo mesmo motivo.

Para a análise estatística foram utilizados os dados apenas dos animais que estavam em total noite de coincidência ou total noite de não-coincidência. Dessa forma, para a análise estatística foram excluídos do grupo T22: 6 animais na tarefa RON e 4 animais na TEA por estarem em noite de não-coincidência parcial. Assim, ao término de todo o experimento, dos 44 sujeitos, somente 31 foram analisados na tarefa RON (T22, n=20; T24, n=11) e 36 na TEA (T22, n=24; T24, n=12).

Todas as sessões foram gravadas pelo *software Debut* utilizando uma *webcam* (modelo *FaceCam 1020, Genius*<sup>®</sup>).

## **4.5 Dados da atividade motora**

### **4.5.1 Coleta de dados**

A atividade motora foi registrada de forma contínua através de sensores de movimento por infravermelho instalados sobre as gaiolas conectados a um computador por uma placa de aquisição de dados da HYTEK Automation Inc. (iUSBDAQ-U120816AO). Os dados foram totalizados e registrados em intervalos de 5 minutos pelo software SAP – Sistema de Acionamento Programado (desenvolvido pelo Laboratório de Cronobiologia – UFRN). O controle do acionamento da iluminação da sala também foi realizado por esse software.

Para caracterização do ritmo circadiano da atividade motora de cada grupo, a atividade de cada rato foi analisada por inspeção visual dos actogramas e pelo cálculo da periodicidade circadiana ao longo da adolescência utilizando o programa *El Temps* (AntoniDíez-Noguera, Universitat de Barcelona, <http://www.el-temps.com>). O periodograma Sokolove-Bushell foi utilizado para o cálculo da periodicidade circadiana.

## **4.6 Análise comportamental e estatística**

A exploração dos objetos foi analisada manualmente através do *software* de rastreamento *EthoWatcher* (UFSC, Brasil) que utilizou os vídeos gravados pelo *software Debut*. Através do comando de teclas o avaliador registra quando o animal explorou o

objeto. Foi considerada exploração o momento em que o animal aproximou-se do objeto com o focinho, em no mínimo 02 cm, e se engajou em explorar o objeto. Não foi considerada exploração quando o animal utilizou o objeto como apoio para explorar o ambiente ou quando fez *grooming* ao estar próximo do mesmo. Os avaliadores eram “cegos” para a condição dos objetos e dos grupos.

Após a análise dos vídeos os dados foram tabulados no software Excel. Foram calculadas a taxa de exploração e o índice de discriminação dos objetos. A taxa de exploração demonstra a exploração de um objeto em relação à exploração de todos os objetos somados, sendo gerado um valor entre 0 e 1, conforme a fórmula  $(X / X+Y+Z)$ . O índice de discriminação mostra quanto um objeto foi explorado em relação a outro, gerando valores que variam entre -1 e 1, segundo a fórmula  $(X-Y / X+Y)$ , em que o sinal negativo indica que a variável escolhida para comparação foi menos explorada do que a variável subtraída. Quando o valor está próximo de 0, considera-se que a exploração ocorreu ao acaso.

Os procedimentos estatísticos foram realizados no programa SPSS para Windows, versão 21.0, sendo consideradas as diferenças estatisticamente significativas para  $p < 0,05$ .

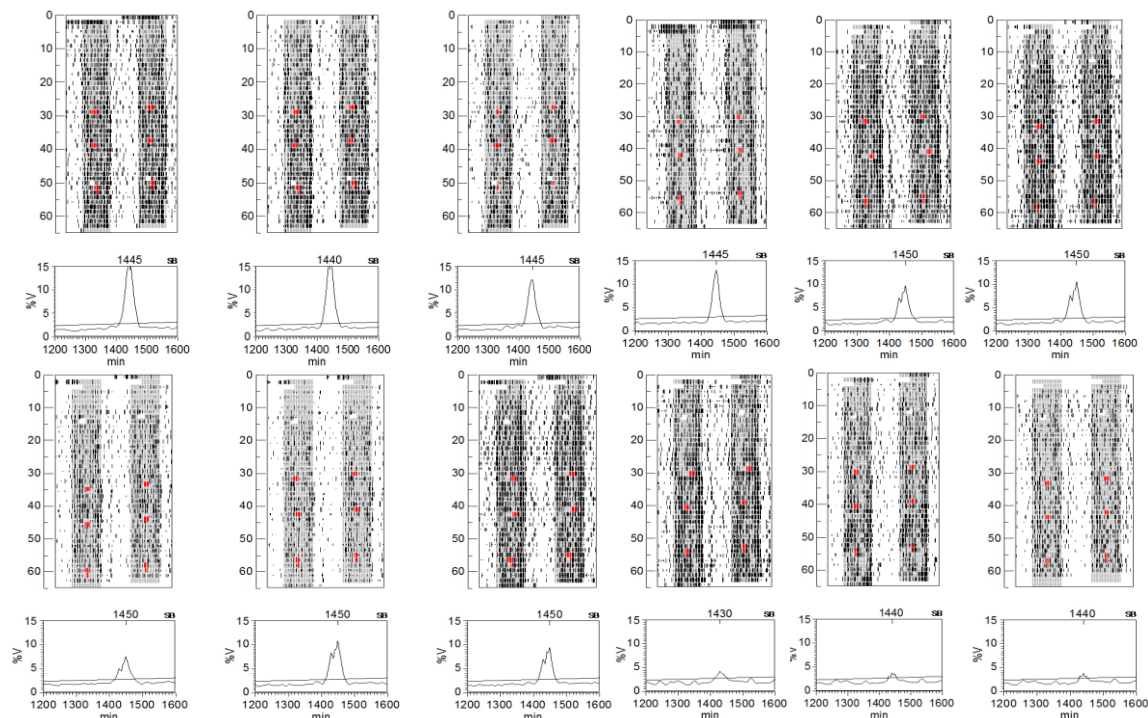
Utilizou-se teste *t* pareado para analisar as taxas de exploração dos objetos em cada grupo. A ANOVA de uma via foi feita para comparar os índices de discriminação entre os grupos. A estatística *t* de uma amostra foi realizada em seguida para analisar os resultados dos índices de discriminação com o acaso. Neste estudo adotou-se o valor do acaso em 0.

## 5. RESULTADOS

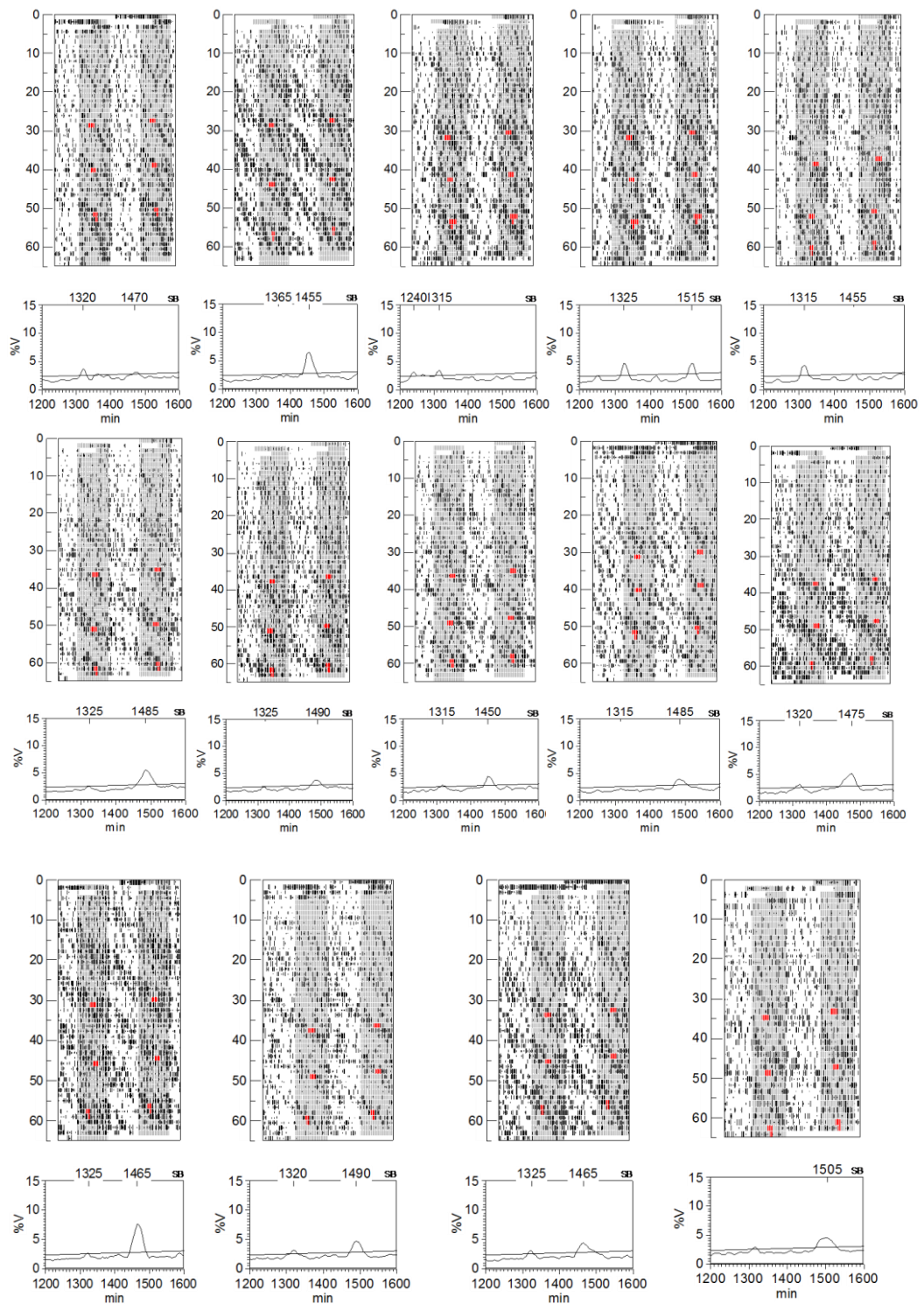
### 5.1 Dados da atividade motora

Pela análise visual dos actogramas observou-se que todos os animais do grupo controle, sob ciclo CE de 24 h, apresentaram um ritmo circadiano de atividade motora com o mesmo período do ciclo CE, com a maior parte da fase ativa ocorrendo na fase de escuro, indicando um processo de sincronização (figura 14). Por outro lado, observou-se que os animais do grupo adolescentes D, sob ciclo CE de 22h, apresentaram dois ritmos circadianos simultâneos na atividade motora, sendo um com o mesmo período do ciclo CE de 22 horas ou período próximo a 22 horas e outro com período maior que 22 horas (figuras 15 e 16).

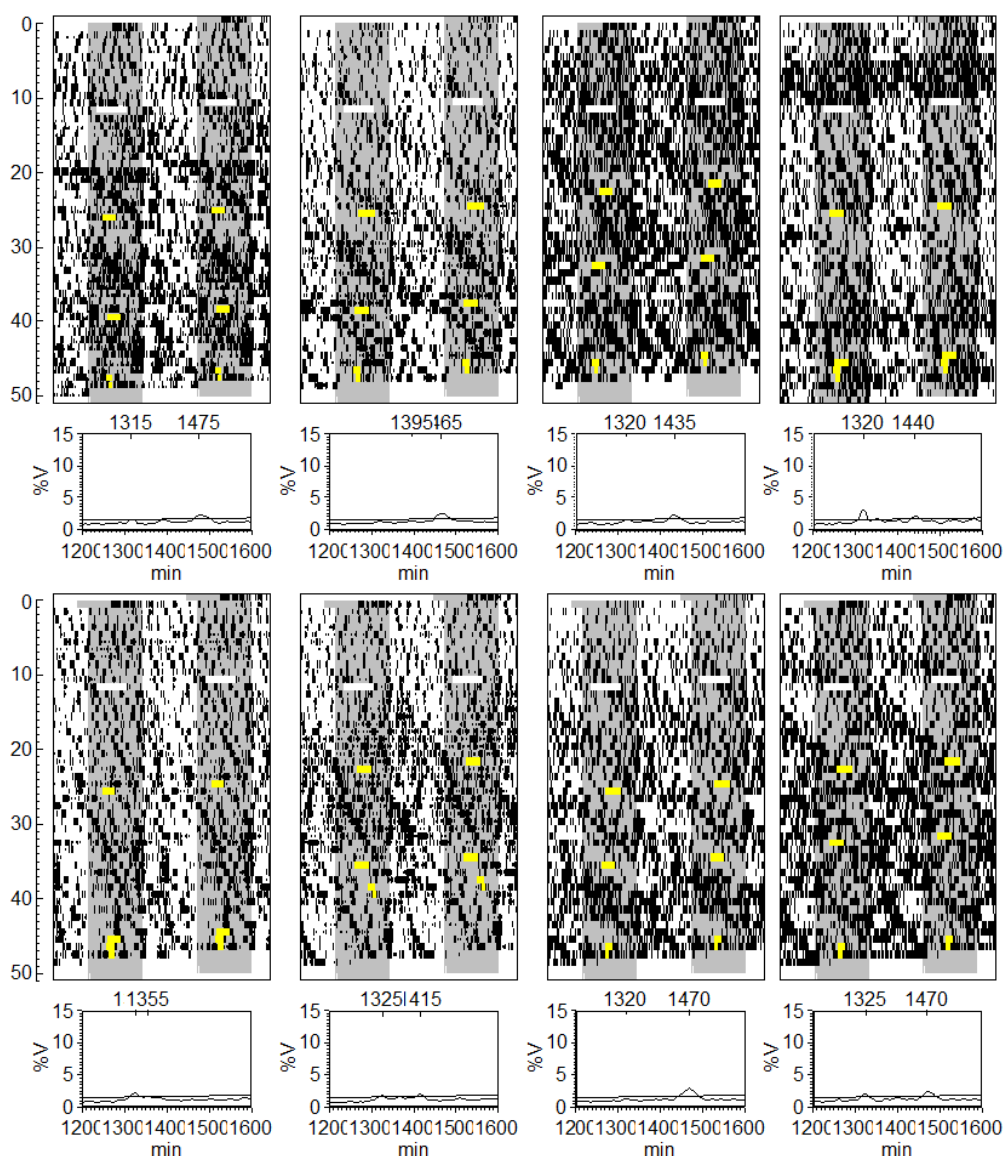
A análise da atividade motora pelos periodogramas corroborou o padrão rítmico com apenas um ritmo circadiano estável no grupo controle, com variância média de  $9,77 \pm 4,34\%$ , e com dois ritmos circadianos simultâneos no grupo adolescentes D: um com o mesmo período do ciclo CE, com variância média de  $4,60 \pm 1,27\%$  e outro com período maior que 24h, com variância média de  $3,49 \pm 0,59\%$ .



**Figura 14.** Actogramas plotados duplamente e periodogramas (Sokolove-Bushell) dos animais em T24. As colunas brancas representam as fases de claro e as cinzas as fases de escuro. Os pontos em vermelho situados verticalmente, de cima para baixo, correspondem aos momentos em que foram realizados os respectivos testes comportamentais: Reconhecimento de Objeto Novo; Tarefa de Reconhecimento Espacial Associativo; Esquiva Passiva. Vale ressaltar que a tarefa Esquiva Passiva não será discutida nesta dissertação.



**Figura 15. Actogramas plotados duplamente e periodogramas (Sokolove-Bushell) dos animais em T22 que realizaram as tarefas em noites de coincidência. As colunas brancas representam as fases de claro e as cinzas as fases de escuro. Os pontos em vermelho situados verticalmente, de cima para baixo, correspondem aos momentos em que foram realizados os respectivos testes comportamentais: Reconhecimento de Objeto Novo; Tarefa de Reconhecimento Espacial Associativo; Esquiva Passiva. Vale ressaltar que a tarefa Esquiva Passiva não será discutida nesta dissertação.**



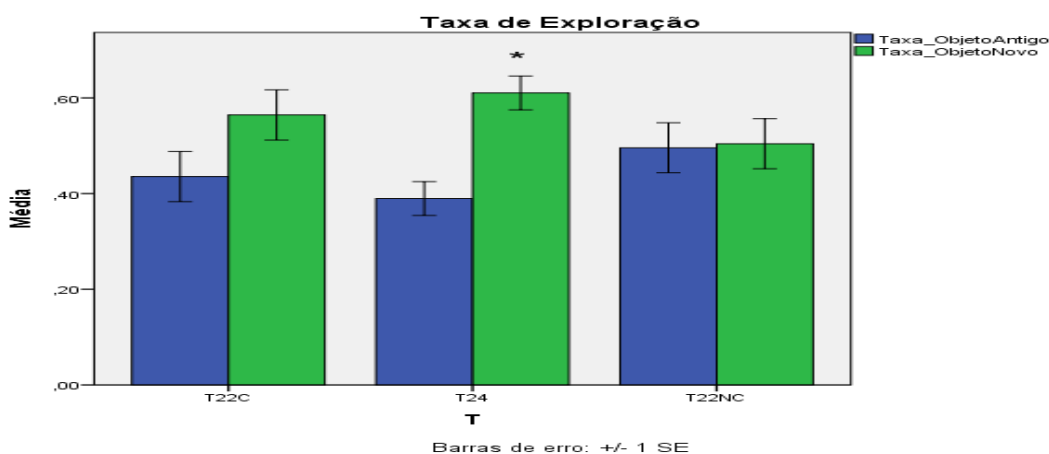
**Figura 16.** Actogramas plotados duplamente e periodogramas (Sokolove-Bushell) de oito animais, representativos, em T22 que realizaram a tarefa na noite de não coincidência. As colunas brancas representam as fases de claro e as cinzas as fases de escuro. Os pontos em amarelo situados verticalmente, de cima para baixo, correspondem aos momentos em que foram realizados os respectivos testes comportamentais: Reconhecimento de Objeto Novo; Tarefa de Reconhecimento Espacial Associativo; Esquiva Passiva. Vale ressaltar que a tarefa Esquiva Passiva não será discutida nesta dissertação.

## 5.2 Parâmetros comportamentais

### 5.2.1 Reconhecimento do Objeto Novo

Foi realizado o teste  $t$  dependente para avaliar a taxa de exploração dos objetos em cada grupo individualmente. O teste evidenciou diferença significativa para o grupo controle T24. Os animais pertencentes a este grupo exploraram mais o objeto novo ( $M=39,42$ ,  $EP=6$ , 31) do que o objeto antigo ( $M=24,40$ ,  $EP= 3,81$ ,  $t(10) = -2,94$ ,  $p =0,02$ ,

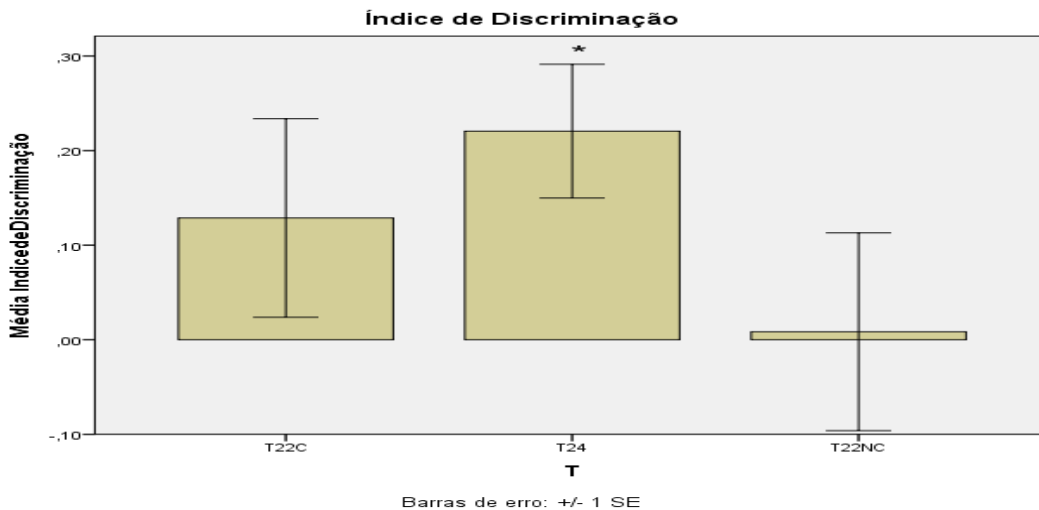
$r=0,68$ ). Os animais que realizaram a tarefa em noite de não coincidência (T22NC), na média exploraram mais o objeto novo ( $M=16,82$ ,  $EP=2,93$ ), em comparação com o objeto antigo ( $M=11,82$ ,  $EP= 1,84$ ,  $t(10) = -1,65$ ,  $p= 0,77$ ,  $r=0,46$ ). Os animais do grupo T22C também exploraram mais o objeto novo ( $M=22,72$ ,  $EP=3,29$ ) do que o objeto antigo ( $M=21,36$   $EP= 2,80$ ,  $t(8) = -0,30$   $p=0,13$ ,  $r=0,11$ ). Contudo em nenhum dos grupos do modelo de dessincronização forçada os resultados obtidos foram significativos.



**Figura 19.** Taxa de exploração dos objetos para os grupos experimentais T 22C (noite de coincidência) e T22NC (noite de não coincidência) e o grupo controle T24 na tarefa de Reconhecimento de Objetos Novos. O gráfico representa à média e o erro padrão.\* resultado significativo ( $p < 0,05$ ).

A ANOVA de uma via para amostras independentes também foi feita nesta tarefa para analisar a discriminação dos objetos pelos grupos. Segundo este teste não houve diferença significativa entre o grupo controle T24 e os grupos experimentais T22 (noite de coincidência e noite de não coincidência) [ $F(2) = 1,23$ ,  $p= 0,31$ ].

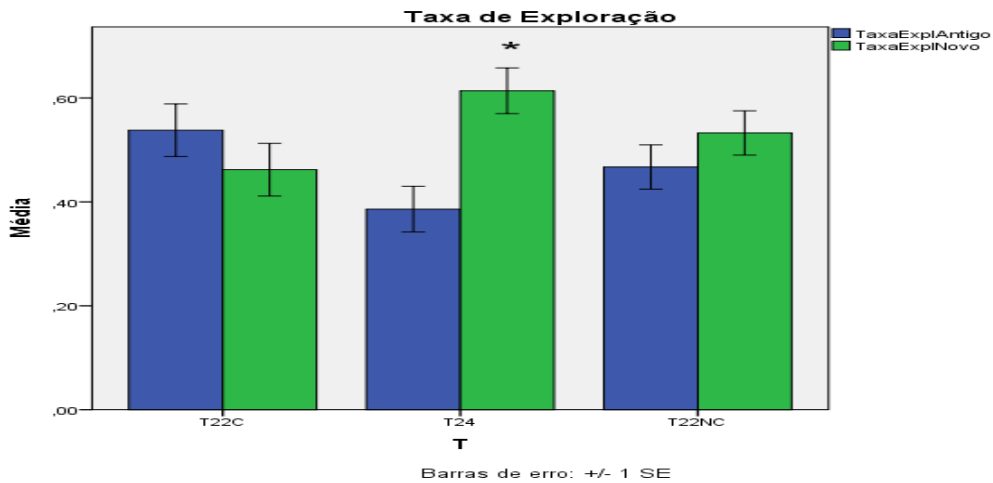
O teste  $t$  de uma amostra foi feito para comparar os resultados dos índices de discriminação ao acaso. Segundo o teste houve diferença significativa para o grupo T24 [ $t(10) = 3,12$ ,  $p=0,01$ ], o que não foi observado para os grupos experimentais T22 C [ $t(10) = 1,23$ ,  $p=0,25$ ] e T22 NC [ $t(8) = 0,08$ ,  $p=0,94$ ], inferindo assim, que os animais pertencentes aos grupos experimentais exploraram os objetos ao acaso.



**Figura 20.** Índice de discriminação entre os objetos antigo e novo para os grupos controle e experimentais T 22C (noite de coincidência) e T22NC (noite de não coincidência). O gráfico representa a média e o erro padrão.

### 5.2.2 Tarefa espacial associativa

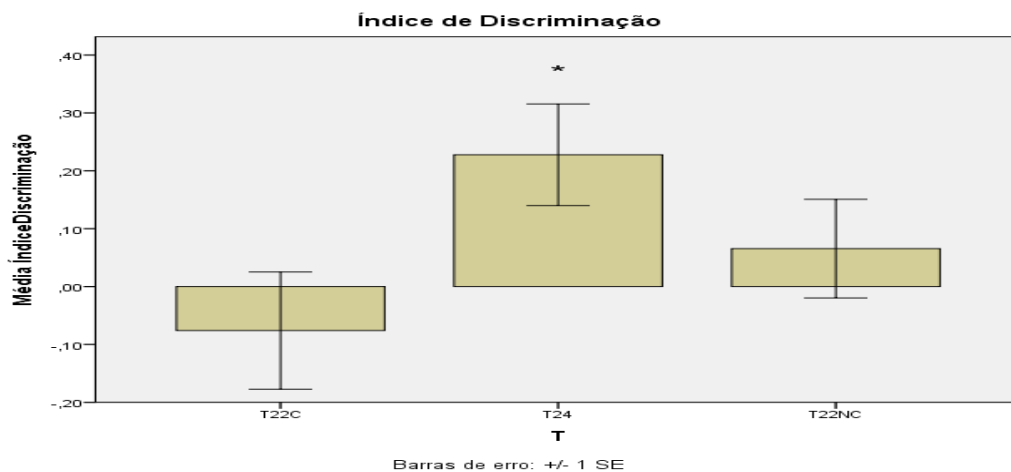
O teste *t* pareado foi empregado para avaliar a taxa de exploração dos objetos de cada grupo separadamente. Os animais pertencentes ao grupo controle T24 exploraram mais o objeto novo deslocado ( $M=0,61$ ,  $EP=0,04$ ) do que o objeto antigo não deslocado ( $M=0,38$ ,  $EP=0,04$ ,  $t(11) = -2,594$ ,  $p=0,03$ ,  $r=0,62$ ). Embora os animais do grupo experimental T22NC (noite de não coincidência), tenham em média explorado mais o objeto novo deslocado ( $M=0,53$ ,  $EP=0,04$ ), em comparação com o objeto antigo não deslocado ( $M=0,47$ ,  $EP=0,04$ ,  $t(10) = -0,77$ ,  $p=0,47$ ,  $r=0,24$ ), seu resultado não foi significativo. Os animais pertencentes ao T22C (noite de coincidência) também não apresentaram resultado significativo e exploraram mais o objeto antigo não deslocado ( $M=0,53$ ,  $EP=0,050$ ) do que o objeto novo deslocado ( $M=0,46$ ,  $EP=0,05$ ,  $t(12) = 0,75$ ,  $p=0,46$ ,  $r=0,21$ ).



**Figura 17.** Taxa de exploração dos objetos antigo não deslocado e novo deslocado para os grupos experimentais T 22C (noite de coincidência) e T22NC (noite de não coincidência) e o controle T24 na Tarefa Espacial Associativa. O gráfico representa à média e o erro padrão.\* resultado significativo ( $p < 0,05$ ).

A ANOVA de uma via para amostras independentes foi feita para analisar se os grupos conseguiram realizar a discriminação dos objetos. Ela demonstrou que não houve diferença significativa entre o grupo controle T24 e os grupos experimentais T22 (noite de coincidência e noite de não coincidência) [ $F(2) = 2,78, p = 0,08$ ].

O teste  $t$  de uma amostra foi utilizado em seguida para comparar os resultados dos índices de discriminação ao acaso. Segundo o teste houve diferença significativa para o grupo T24 [ $t(11) = 2,60, p = 0,03$ ], o que não foi observado para os grupos experimentais T22 C [ $t(12) = -0,75, p = 0,47$ ] e T22 NC [ $t(10) = -0,77, p = 0,46$ ], inferindo assim, que os animais pertencentes a estes grupos experimentais fizeram a exploração dos objetos ao acaso.



**Figura 18.** Índice de discriminação entre o objeto antigo não deslocado e o objeto novo deslocado para os grupos controle e experimentais T 22C (noite de coincidência) e T22NC (noite de não coincidência). O gráfico representa a média e o erro padrão.

## 6. DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou a memória e a expressão da ritmicidade circadiana da atividade motora em ratos adolescentes submetidos a ciclo CE de 22h (T22), um protocolo de dessincronização forçada interna em ratos. Observamos que os ratos sob T22 apresentaram dois ritmos de atividade motora, um sincronizado ao ambiente, exibindo o mesmo período do ciclo CE de 22h e outro que se expressou em livre-curso, exibindo um período maior que 24h.

Por nossos sujeitos experimentais serem adolescentes, partimos do pressuposto do trabalho de Albert *et al.*, (2013), no qual observaram que ratos de mesma faixa etária expostos a atrasos e/ou avanços de fase de forma crônica, comparável ao estilo de vida de adolescentes humanos, apresentaram um único e estável ritmo circadiano na atividade motora. Conforme os autores, a não observação dos dois ritmos de atividade motora é possível pela maior plasticidade dos indivíduos nessa fase, exibido pelo maior acoplamento interno no NSQ, ou seja, entre as regiões ventrolateral e dorsomedial. No mesmo estudo foi possível analisar que os ratos adultos, diferentemente dos adolescentes, apresentaram os dois ritmos de atividade motora. Trabalhos anteriores também demonstraram que ratos adultos expostos a dessincronização forçada, modelo T22, apresentavam dissociação na ritmicidade circadiana da atividade motora (Campuzano *et al.*; 1998, De la Iglesia *et al.*, 2004; Neto *et al.*, 2008). Nossos achados indicam que ratos adolescentes sob o modelo T22 de dessincronização forçada também podem apresentar dissociação na ritmicidade circadiana da atividade motora de forma semelhante a ratos adultos sob o mesmo protocolo. Diante dos nossos resultados podemos sugerir que apesar da plasticidade ser maior em adolescentes, quando comparado a animais adultos, o modelo T22 é forte o suficiente para promover a dessincronização entre o meio interno e o externo.

Em relação às tarefas de memória, os animais sob T22 apresentaram prejuízo em seus desempenhos e durante nossa busca a artigos científicos, constatamos que ainda existem poucos trabalhos na literatura que investiguem o comprometimento mnemônico de animais adolescentes e, principalmente sob protocolos de dessincronização.

Toki *et al.* (2007) analisaram se as condições iniciais de iluminação afetavam o desenvolvimento neurológico de ratos Sprague-Dawley submetidos a avanços ou atrasos de fase. Especificamente em relação à memória, a Tarefa de Reconhecimento de Objetos Novos (RON) foi aplicada durante a fase escura, em dois momentos distintos, durante a adolescência e idade adulta. O teste *t* de uma amostra evidenciou que na

retenção de 1h houve diferença significativa para o índice de discriminação dos grupos adolescentes e adultos submetido ao CE de 24h. Os animais que foram submetidos ao CE de 18/6 h, grupos adolescente e adulto, passaram um tempo menor explorando o objeto novo, dessa forma apresentaram os menores índices de discriminação em comparação aos demais grupos. Em contraste, durante o teste de retenção de 24 h não houve preferência pelo objeto novo em nenhum dos grupos e fases do desenvolvimento.

Através deste trabalho podemos mais uma vez ressaltar que apesar da juventude ser um período de maior plasticidade, condições iniciais de iluminação anormais demonstram exercer também influência sobre a memória de ratos adolescentes de diferentes linhagens. O uso da tarefa de reconhecimento de objetos pode exibir sensibilidade na investigação do comprometimento mnemônico, pois o treinamento é limitado e os requisitos comportamentais desta tarefa tornam-na especialmente adequada para estudar a ontogenia dessa forma de memória no rato, tanto em relação ao desenvolvimento normal, quanto no anormal do cérebro (Ramsaram, Sanders & Stanton, 2016).

Divergindo dos resultados até aqui apresentados, Neto *et al.*, (2008), não observaram prejuízo de ratos adultos sob T22, quando avaliados seus desempenhos através da tarefa de reconhecimento de objetos novos. Tanto os animais do grupo controle, quanto os experimentais, apresentaram índices de reconhecimento semelhantes para frequência e tempo de exploração. Nossos animais do grupo experimental não apresentaram resultados significativos nem quanto à taxa de exploração, nem quanto ao índice de discriminação. Sugerimos que tal discordância, provavelmente, diz respeito à diferença da faixa etária dos animais nos dois estudos.

Estudos apontam que a exploração dos objetos aumenta com o avançar da idade. Sendo visualizado que ratos com 17 dias de vidas sob CE de 24h, já podem aprender informação contextual e recuperar esses traços de memória depois de um intervalo de retenção curto (Ramsaram *et al.*, 2015). Ramsaram, Sanders & Stanton (2016) mostram que em relação à tarefa de localização de objetos o reconhecimento emerge entre os 17 e 21 dias de vida em intervalos de retenção curtos (5-10 min) ou entre 21 e 26 dias de vida, em intervalos de retenção longos (24 horas).

Ainge e Langston (2012) notaram que os ratos Lister sob CE de 24h apresentaram uma taxa de exploração maior para o objeto novo, quando comparado ao antigo. Ao investigarem a memória de reconhecimento e a ontogenia das representações espaciais de ratos jovens (24 e 30 dias de vida), através das tarefas de reconhecimento de objetos novos e de reconhecimento espacial associativo puderam enfatizar que os índices

de exploração dos ratos com 30 dias foram mais expressivos, quando comparados aos dos ratos mais novos, em ambas as tarefas.

Estes achados corroboram com nossos resultados, visto que os animais pertencentes ao nosso grupo controle apresentaram um bom desempenho, tanto na tarefa de reconhecimento de objetos novos, quanto na tarefa espacial associativa.

Trabalhos com humanos e modelos animais demonstram que a capacidade de aprender, lembrar e depois modificar as respostas atuais de acordo com a experiência anterior são atributos fundamentais do comportamento animal e podem ser influenciados diferencialmente pelos ritmos circadianos do animal (Ralph *et al.*, 2002; Cain & Ralph, 2004, 2009; Cain, McDonald & Ralph, 2008; Garren, Sexauer & Page, 2013).

Os ritmos cerebrais flutuam periodicamente, refletindo a atividade sincronizada de um grande número de neurônios, o que é relevante para a cognição, como no caso da memória. Acredita-se que os ritmos cerebrais tenham um papel fundamental na formação da memória, sincronizando e, assim, coordenando, a atividade dos neurônios distribuídos durante as operações de memória (Colgin, 2016). Em se tratando de memória, sabe-se que o hipocampo é uma estrutura essencial. Nele ocorre a associação das informações “o que”, e “onde” (Ranganath *et al.*, 2004; Cohen & Stachman, 2015). Sendo assim, a tarefa associativa está mais associada à função hipocampal, enquanto que ainda existe discordância quanto a tarefa de reconhecimento de objetos novos, apesar de que o córtex perirrinal está claramente associado a esta função.

Durante a neurogênese adulta, as células granulosas recém-fabricadas produzidas dentro do giro denteado do hipocampo formam sinapses funcionais que parecem proporcionar melhor desempenho nas tarefas de memória espacial e reparação neural. Como o aumento da neurogênese está associado a habilidades cognitivas aprimoradas em roedores, o controle circadiano ótimo da divisão celular, que introduz novos neurônios no circuito do hipocampo, também pode aumentar o desempenho dos mesmos em tarefas que envolvam a memória (Karatsoreosa *et al.*, 2011; Malik *et al.*, 2015). Como também o comprometimento do ritmo circadiano, através de alterações na fase do relógio circadiano, pode prejudicar a atividade normal desta estrutura e suprimir a neurogênese (Malik *et al.*, 2015).

Os déficits de desempenho nas tarefas de memória nos ratos pertencentes aos grupos experimentais T22 evidenciam que a dessincronização forçada interna compromete o funcionamento do hipocampo e, por conseguinte, a memória destes animais, apesar de estarem em uma fase do desenvolvimento de maior plasticidade neuronal. Os nossos achados mostram-se importantes para a temática em questão, pois

demonstra resultados diferentes dos conhecidos até o presente momento, assim devem servir como base para novos estudos que visem avaliar os efeitos deste protocolo ao longo do desenvolvimento.

Sugerimos a realização de novos estudos utilizando o modelo T22 ao longo da ontogênese para que possa ser mais bem entendido os efeitos deste protocolo na memória não só a curto, mas em longo prazo, no intuito de que as lacunas ainda existentes possam ser esclarecidas.

## 7. CONCLUSÃO

Nossos resultados reportam que o modelo de dessincronização forçada T22 é suficientemente capaz de promover dois ritmos de atividade motora, bem como prejudicar o desempenho de ratos adolescentes submetidos a este protocolo nas tarefas de Reconhecimento de Objetos Novos e Espacial Associativa. Diante destes resultados, este trabalho torna-se mais um indicador das possíveis complicações futuras de adolescentes humanos que se submetem a processos de dessincronização forçada no seu cotidiano.

## 8. REFERÊNCIAS

- Abreu, T.A.C. (2011). Perturbação afetiva bipolar e ciclos circadianos. Dissertação de mestrado, Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, Porto, Portugal.
- Ainge, J.A., & Langston, R.F., (2012). Ontogeny of neural circuit underlying spatial memory in the rat. *Frontiers in Neural Circuits*, 6(8), 1-10. <http://doi:10.3389/fncir.2012.00008>
- Albert, N., da Silva C, Díez-Noguera A, Cambras, T. (2013). Different adaptation of the motor activity rhythm to chronic phase shifts between adolescent and adult rats. *Behav Brain Res.*, 252, 347–55. <http://doi:10.1016/j.bbr.2013.06.025> PMID: 23792134.
- Andrade, M.M.M., Benedito-Silva, A.A., Domenice, S., Arnhold, I.J.P. & Menna-Barreto, L. (1993). Sleep Characteristics of a Longitudinal Study. *Journal of adolescent health*, 14, 401-406.
- Araújo, J. F. & Marques, N. (2002). Cronobiologia: uma multidisciplinaridade necessária. *Margem*, 15, 95-112.
- Aschoff, J. (1951). Die 24-Stunden-Periodik der Maus unter konstanten Umweltbedingungen. *Naturwissenschaften*, 38, 506—507.
- Barbosa, F.F. (2007). Estampa temporal na memória de reconhecimento em estudantes universitários. Dissertação de Mestrado em Psicobiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brasil.
- Baron, K. G. & Reid, K. J. (2014). Circadian Misalignment and Health. *Int Rev Psychiatry*, 26(2), 139–154. <http://doi:10.3109/09540261.2014.911149>.
- Bonmati-Carrion, M.A., Arguelles-Prieto, R., Martinez-Madrid, M.J., Reiter, R., Hardeland, R., Rol, M.A. & Madrid, J.A. (2014). Protecting the Melatonin Rhythm through Circadian Healthy Light Exposure. *Int. J. Mol. Sci*, 15, 23448-23500, <http://doi:10.3390/ijms151223448>.
- Borbély, A.A. (1982). A two process model of sleep regulation. *Hum Neurobiol*, 1, 195–204.
- Brown, M.W. & Banks, P.J. (2015). In search of a recognition memory engram. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 50, 12–28.
- Bueno, C. (2011). Estudo da ontogênese dos ritmos biológicos em neonatos humanos e ratos. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.
- Bueno, C. & Wey, D. (2012). Gênese e ontogênese do ritmo de sono/vigília em humanos. *Revista da Biologia*, 9, 62–67.
- Buijs, F.N., León-Mercado, L., Guzmán-Ruiz, M., Guerrero-Vargas, N.N., Romo-Nava, F. & Buijs, R.M. (2016). The Circadian System: A Regulatory Feedback Network of Periphery and Brain. *PHYSIOLOGY*, 31, 170–181, 20. <http://doi:10.1152/physiol.00037.2015>.
- Cain, S.W., McDonald, R.J. & Ralph, M.R. (2008). Time stamp in conditioned place avoidance can be set to different circadian phases. *Neurobiol Learn Mem*, 89(4), 591-4.
- Cain S.W., Chou T. & Ralph, M.R (2004). Circadian modulation of performance on an aversion-based place learning task in hamsters. *Behavioural brain research*, 150 (1-2). <http://doi:10.1016/j.bbr.2003.07.001> [PubMed: 15033293].
- Cain S.W. & Ralph, M.R (2009). Circadian modulation of conditioned place preference in hamsters does not require the suprachiasmatic nucleus. *Neurobiology of Learning and Memory*, 91, 81–84.
- Cain, S.W., Yoon, J., Shrestha, T.C. & Ralph, M.R. (2014). Retention of a 24-hour time memory in Syrian hamsters carrying the 20-hour short circadian period mutation in casein kinase-1 $\epsilon$  (ck1 $\epsilon$ /tau). *Neurobiology of Learning and Memory*, 114, 171–177.

- Campuzano, A., Vilaplana, J., Cambras, T. & Díez-Noguera, A. (1998). Dissociation of the rat motor activity rhythm under *T* cycles shorter than 24 hours. *Physiology & Behavior* 63(2), 171-176.
- Carneiro, B.T.S. & Araújo, J.F. (2009). The food-entrainable oscillator: a network of interconnected brain structures entrained by humoral signals? *Chronobiol Int.*, 26(7), 1273–1289. [http://doi: 10.3109/07420520903404480](http://doi:10.3109/07420520903404480).
- Carneiro, B.T.S. (2010). Sincronização dos ritmos de atividade locomotora e temperatura central à disponibilidade de glicose em ratos. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brasil.
- Carskadon, M. A., Labyak, S. E., Acebo, C. & Seifer, R. (1999). Intrinsic circadian period of adolescent humans measured in conditions of forced desynchrony. *Neuroscience Letters*, 260(2), 129–132.
- Carskadon, M.A. (2011). Sleep in Adolescents: The Perfect Storm. *Pediatr Clin North Am.*, 58(3): 637–647. <http://doi:10.1016/j.pcl.2011.03.003>.
- Clark, R.E. & Martin, S.J. (2005). Interrogating rodents regarding their object and spatial memory. *Current Opinion in Neurobiology*, 15,593–598.
- Colrain, I.M. & Baker, F.C. (2011). Changes in sleep as a function of adolescent development. *Neuropsychol Rev*, (21), 5–21. [http://doi 10.1007/s11065-010-9155-5](http://doi:10.1007/s11065-010-9155-5).
- Cohen, S. J., Stackman Jr., R. W. (2015). Assessing rodent hippocampal involvement in the novel object recognition task. A review. *Behavioural Brain Research*, 285,105-117. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2014.08.002> 0166-4328/© 2014.
- Craig, L.A. & McDonald, R.J. (2008). Chronic disruption of circadian rhythms impairs hippocampal memory in the rat. *Brain Research Bulletin*, 76(1-2), 141–151. [10.1016/j.brainresbull.2008.02.013](http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresbull.2008.02.013) [PubMed: 18395623].
- Crowley, S.J., Acebo, C., & Carskadon, M. A. (2007). Sleep, circadian rhythms, and delayed phase in adolescence. *Sleep Medicine* 8, 602–612.
- Crystal, J.D (2010). Episodic-like memory in animals. *Behavioural Brain Research*, 215, 235–243.
- Cruz-rodriques, C. & Lima, E. M (2012). Apresentação do instrumento de avaliação de memória para crianças e adolescentes: Children's memory scale. *Cadernos de Pós-Graduação em Distúrbios do Desenvolvimento*, 12 (1), 56-64.
- De La Iglesia, H.O., Cambras, T., Schwartz, W.J. & Díez-Noguera, A. (2004). Forced Desynchronization of Dual Circadian Oscillators within the Rat Suprachiasmatic Nucleus. *Current Biology*, 14, 796–800. [http:// DOI 10.1016/j.cub.2004.04.034](http://DOI:10.1016/j.cub.2004.04.034).
- De La Iglesia, H.O., Schwartz, M.D., Wotus, C., Liu, T., Friesen, W.O., Borjigin, J. & Oda, G.A. (2009). Dissociation of circadian and light inhibition of melatonin release through forced desynchronization in the rat. *PNAS*, 106 (41), 17540–17545.
- Dere, E., Huston, J.P., De Souza Silva, M.A. (2007). The pharmacology, neuroanatomy and neurogenetics of one-trial object recognition in rodents. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 31, 673–704. [10.1016/j.neubiorev.2007.01.005](http://doi:10.1016/j.neubiorev.2007.01.005)
- Dibner, C., Schibler, U. & Albrecht, U. (2010). The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annu Rev Physiol*, 72(72), 517-49.
- Dickerson, B.C. & Eichenbaum, H. (2010). The Episodic Memory System: Neurocircuitry and Disorders. *Neuropsychopharmacology*, 35, 86–104. <http://doi:10.1038/npp.2009.126>.
- Dix, S.L. & Aggleton, J.P. (1999). Extending the spontaneous preference test of recognition: evidence of object-location and object-context recognition. *Behavioural Brain Research*, 99, 191–200.
- Eacott, M. J., & Norman, G. (2004). Integrated memory for object, place, and context in rats: a possible model of episodic-like memory? *J Neurosci.*, 24(8),1948-53. <http://doi:10.1523/jneurosci.2975-03.2004>.

- Eichenbaum, H., Yonelinas, A.P. & Ranganath, C. (2007). The medial temporal lobe and recognition memory. *Annu Rev Neurosci.*, 30, 123-52. <http://doi:10.1146/annurev.neuro.30.051606.094328>.
- El-henmany, R., Mateju, K. Bendová, Z., Sosniyenko, S. & Sumová, A. (2008). Maternal control of the fetal and neonatal rat suprachiasmatic nucleus. *Journal of biological rhythms*, 23(5), 435-444.
- Ennaceur, A. (2010). One-trial object recognition in rats and mice: Methodological and theoretical issues. *Behavioural Brain Research*, 215, 244–254.
- Ennaceur, A. Michalikova, S., Bradford, A. & Ahmed, S. (2005). Detailed analysis of the behavior of Lister and Wistar rats in anxiety, object recognition and object location tasks. *Behavioural Brain Research*, 159, 247–66.
- Ennaceur, A. & Delacour, J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behavioural Brain Research*, 31, 47-59.
- Engelberth, R.C.G.J., Pontes, A.L.B. de, Fiuza, F.P., Silva, K.D. de A., Resende, N. da S., Azevedo, C.V. de M., Costa, M. S. M. O., Cavalcante, J. C., Nascimento Jr, E.S., Gavioli, E.C., & Cavalcante, J.S. (2013). Changes in the suprachiasmatic nucleus during aging: implications for biological rhythms. *Psychology & Neuroscience*, 6(3), 287–297. <http://doi:10.3922/j.psns.2013.3.07>.
- Fallone, G., Owens, J.A. & Deane, J., (2002). Sleepiness in children and adolescents: clinical implications. *Sleep Med Rev*, 6, 287-306.
- Folkard, S. (1990). Circadian performance rhythms: some practical and theoretical implications. *Phil Trans R Soc Lond*, 327, 543-553.
- Garcia, J., Rosen, G. & Mahowald, M. (2001). Circadian Rhythms and Circadian Rhythm Disorders in Children and Adolescents. *Seminars in Pediatric Neurology*, 8(4), 229-240.
- Garren, M.V., Sexauer, S.B. & Page, T.L. (2013). Effect of circadian phase on memory acquisition and recall: operant conditioning vs. classical conditioning. *PloS one*, 8(3):e58693. [10.1371/journal.pone.0058693](http://doi:10.1371/journal.pone.0058693) [PubMed: 23533587].
- Gazzaniga, M.S., Ivry, R.B. & Mangun, G.R. (2002). The biology of the mind. *Cognitive neuroscience*, 2(8), 301-350.
- Golombek, D.A. & Rosenstein, R.E. (2010). Physiology of circadian entrainment. *Physiol Rev*, 90(3), 1063-102. <http://doi:10.1152/physrev.00009.2009>.
- Golombek, D.A., Casiraghi, L.P., Agostino, P.V., Paladino, N., Duhart, J.M., Plano, S. A., Chiesa, J. J. (2013). The times they're a-changing: Effects of circadian desynchronization on physiology and disease. *Journal of Physiology*, 310–322.
- Hagenauer, M.H., Perryman, J.I, Lee, T.M. & Carskadon, M.A. (2009). Adolescent changes in the homeostatic and circadian regulation of sleep. *Dev Neurosci*, 31(4), 276-84. <http://doi:10.1159/000216538>.
- Hasler, B.P. & Clark, D.B. (2013). Circadian Misalignment, Reward-Related Brain Function and Adolescent Alcohol Involvement. *Alcohol Clin Exp Res*, 37(4). <http://doi:10.1111/acer.12003>.
- Hendrickson, A. E., Wagoner, N., & Cowan, W. M. (1972). An autoradiographic and electron microscopic study of retino-hypothalamic connections. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, 135(1), 1-26.
- Herrero, L., Valcarcel, L., Silva, C.A. da., Albert, N., Diez-Noguera, A., Cambras, T., Serra, D. (2015). Altered Circadian Rhythm and Metabolic Gene Profile in Rats Subjected to Advanced Light Phase Shifts. *PLoS ONE*, 10(4), e0122570. <http://doi:10.1371/journal.pone.0122570>.
- Hoener, A. J. & Doeller, C. F. (2017). Plasticity of hippocampal memories in humans. *Science Direct*, 43, 102-109. <http://dx.doi.org/10.1016/j.conb.2017.02.004>.
- Izquierdo, I. A. (2011). *Memória*. 2ª Ed. Porto Alegre: Artmed.

- Izquierdo, I. A., Myskiw, J.C., Benetti, F. & Furini, C.R.G. (2013). Memória: tipos e mecanismos- achados recentes. *Revista USP*, 98, 9-16.
- Kalsbeek, A., Perreau-Lenz, S. & Buijs, R.M. (2006). A network of (autonomic) clockoutputs. *Chronobiol Int.* 23(3), 521-35.
- Karatsoreosa, I.N., Bhagata, S., Blossb, E.B., Morrisonb, J.H. & McEwen, B.S. (2011). Disruption of circadian clocks has ramifications for metabolism, brain, and behavior. *PNAS*, 108(4), 1657-1662. <http://www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1018375108/-/DCSupplemental>.
- Kazemi, R., Haidarimoghadam, R., Motamedzadeh, M., Golmohamadi, R., Soltanian, A. & Zoghipaydar, M.R. (2016). Effects of Shift Work on Cognitive Performance, Sleep Quality, and Sleepiness among Petrochemical Control Room Operators. *Journal of Circadian Rhythms*, 14(1), 1, 1–8. <http://dx.doi.org/10.5334/jcr.134>.
- Kleitman, N. & Engelman, G. (1953). Sleep characteristics of infants. *Journal of Applied Physiology*, 6, 269-282.
- Koike, B.D.V. (2013). Avaliação comportamental e neuroquímica de ratos em dessincronização forçada: possíveis implicações para um modelo animal de oscilações no humor. Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brasil.
- Koolhaas, J.M. (2010). The Laboratory Rat. In: Hubrecht R, Kirkwood J, editors. The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory and Other Research Animals. *John Wiley & Sons*, pp. 311-26.
- Krishan, H. C. & Lyons, L.C. (2015). Synchrony and desynchrony in circadian clocks: impacts on learning and memory. *Learning & memory*, (22), 426-437. <http://doi:10.1101/lm.038877.115>.
- Lombroso, P. (2004). Learning and memory. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 26(3), 207–210. <http://doi.org/10.1590/S1516-44462004000300011>.
- Malik, A., Kondratov, R.V., Jamasbi, R.J., Geusz, M.E. (2015). Circadian Clock Genes Are Essential for Normal Adult Neurogenesis, Differentiation, and Fate Determination. *PLoS ONE* 10(10), e0139655. <http://doi:10.1371/journal.pone.0139655>.
- Marques, N. & Menna-Barreto, L.S. (2003). Cronobiologia: Princípios e Aplicações. 3ª ed. *Coleção Acadêmica*. 448p.
- McGaugh, J.L., (2000) Memory- a century of consolidation. *Science*, 287(5451), 248-251. <http://doi:10.1126/science.287.5451.248>.
- McGinnis, M.Y., Lumia, A.R., Tetel, M.J., et al. (2007). Effects of anabolic androgenic steroids on the development and expression of running wheel activity and circadian rhythms in male rats. *Pyysiol Behav*, 92, 1010–18.
- Mistlberger, R.E. & Skene, D. J. (2004). Social influences on mammalian circadian rhythms: Animal and human studies. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.*, 79, 533–556.
- Mohawk, J.A., Green C.B. & Takahashi, J.S. (2012). Central and peripheral circadian clocks in mammals. *Annu Rev Neurosci.* 35(5), 445-62. <http://doi:10.1146/annurev-neuro-060909-153128>.
- Moore, R.Y. & Lenn, N. J. (1972). A retinohypothalamic projection in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 180(1), 1-14.
- Moore, R.Y. (1983). Organization and fuction of a central nervous system circadian oscillator: the suprachiasmatic nucleus. *Fed. Proc. Am. Soc.Exp.Biol.*, 42, 2783-2789.
- Moore, R.Y. (1995). Organization of the mammalian circadian system. *Ciba Found Symp.*, 183, 88-99,100-6.
- Muessig, L., Hauser, J., Wills, T.J., & Cacucci, F. (2016). Place Cell Networks in Pre-weanling Rats Show Associative Memory Properties from the Onset of Exploratory Behavior. *Cerebral Cortex*, 26, 3627–3636. <http://doi:10.1093/cercor/bhw174>

- Nadasdy, Z., Nguyend, T.P., Törökc, A., Sheng, J.Y., Briggsg, D.E., Modurg, P.N., & Buchananb, R.J. (2017). Context-dependent spatially periodic activity in the human entorhinal cortex. *PNAS*. <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1701352114>.
- Nemanic, S., Alvarado, M.C. & Bachevalier, J.(2004). The hippocampal/parahippocampal regions and recognition memory: insights from visual paired comparison versus object-delayed nonmatching in monkeys. *Journal of Neuroscience*, 24(8), 2013–2026.
- Neto, S.P.D., Carneiro, B.T.S., Valentinuzzi, V.S. & Araújo, J.F. (2008). Dissociation of the circadian rhythm of locomotor activity in a 22 h light–dark cycle impairs passive avoidance but not object recognition memory in rats. *Physiology & Behavior*, 94, 523–527.
- Parmelee, A. H., (1961). Sleep patterns in infancy. A study of one infant from birth to eight months of age. *Acta Paediatrica*, 50,160-170.
- Paul, C.M., Magda, G. & Abel, S. (2009). Spatial memory: Theoretical basis and comparative review on experimental methods in rodents. *Behav Brain Res.*, 203(2), 151-64. <http://doi: 10.1016/j.bbr.2009.05.022>.
- Pause, B. M., Zlomuzica, A., Kinugawa, K., Mariani, J., Pietrowsky, R., & Dere, E. (2013). Perspectives on Episodic-Like and Episodic Memory. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 7. <http://doi.org/10.3389/fnbeh.2013.00033>.
- Pereira, J.C. (2017). A dissociação do ritmo circadiano da atividade motora em um ciclo claro-escuro de 22 horas não induz o comportamento do tipo ansioso, nem prejudica a memória aversiva de ratos Wistar adolescentes Dissertação de Mestrado em Psicologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB,Brasil.
- Plumert, J.M., Franzen, L.J., Mathews, M.M. & Violante, C. (2017). Linking "what" and "where" information: How the strength of object categories influences children's memory for object locations. *J Exp Child Psychol*, 157, 95-110 <http://doi: 10.1016/j.jecp.2016.12.012>.
- Ramsaran, A.I., Westbrook, S.R. & Stanton, M.E. (2015). Ontogeny of object-in-context recognition in the rat. *Behav Brain Res*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2015.04.011>.
- Ralph, M.R., Ko, C.H., Antoniadis, E.A., Seco, P., Irani, F., Presta, C., & McDonald, R.J. (2002). The significance of circadian phase for performance on a reward-based learning task in hamsters. *Behavioural brain research*, 136(1), 179–184. [PubMed: 12385803].
- Ribeiro, J.M.G. (2011). Caracterização do perfil sono- vigília em ratos sob dessincronização forçada. Dissertação de Mestrado em Psicobiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brasil.
- Richter CP. (1922). A behavioristic study of the activity of the rat. *Comp. Psychol. Monogr.* 1, 1–54.
- Rocha, V.A. (2010). Caracterização química do Núcleo Supraquiasmático do primata *Cebus paella*. Dissertação de mestrado Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- Roenneberg, T., Allebrandt, K.V., Merrow, M. & Vetter C. (2012). Social jetlag and obesity. *Current Biology*, 22(10):939–943. [PubMed: 22578422].
- Roenneberg T., Kuehnle, T., Juda, M., Kantermann, T., Allebrandt, K., Gordijn, M. & Merrow, M. (2007). Epidemiology of the human circadian clock. *Sleep Medicine Reviews*, 11(6), 429–438. [PubMed: 17936039].
- Roenneberg, T., Wirz-Justice, A. & Merrow, M. (2003). Life between clocks: daily temporal patterns of human chronotypes. *Journal of Biological Rhythms*, 18(1), 80–90. [PubMed: 12568247]
- Ruby, N.F., Hwang, C.E., Wessells, C., Fernandez, F., Zhang, P., Sapolsky, R., & Heller, H.C. (2008). Hippocampal-dependent learning requires a functional circadian system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(40):15593–15598. [10.1073/pnas.0808259105](http://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.0808259105) [PubMed: 18832172].

- Saxvig, I. W., Pallesen, S., Wilhelmsen-Langeland, A., Molde, H. & Bjorvatn, B. (2012). Prevalence and correlates of delayed sleep phase in high school students. *Sleep Medicine*, 13, 193–199. [http:// doi:10.1016/j.sleep.2011.10.024](http://doi:10.1016/j.sleep.2011.10.024).
- Schoemaker., D., Mascret, C., Collins, D.L., Yu, E., Gauthier, S. & Pruessner, J.C. (2017). Recollection and familiarity in aging individuals: Gaining insight into relationships with medial temporal lobe structural integrity. *Hippocampus*, 27(6), 692–701. doi: 10.1002/hipo.22725. Epub 2017 Apr 10.
- Scoville, W.B., Milner, B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatr*, 20, 11–21. [PubMed: 13406589].
- Shochat, T., Cohen-Zion, M. & Tzischinsky, O. (2014). Functional consequences of inadequate sleep in adolescents: A systematic review. *Sleep Medicine Reviews*, 18, 75–87.
- Silva, C. A., Pontes, A.L.B., Cavalcante, J. S. & Azevedo, C.V.M. (2014). Conspecific vocalisations modulate the circadian activity rhythm of marmosets. *Biological Rhythm Research*, DOI: 10.1080/09291016.2014.939441.
- Silver, R. & Kriegsfeld, L.J. (2014). Circadian rhythms have broad implications for understanding brain and behavior. *Eur J Neurosci.*, 39(11), 1866–1880. doi:10.1111/ejn.12593.
- Smarr, B.L., Jennings, K.J., Driscoll, J.R. & Kriegsfeld, L.J. (2014). A Time to Remember: The Role of Circadian Clocks in Learning and Memory. *Behav Neurosci.*, 128(3), 283–303. <http://doi:10.1037/a0035963>.
- Souza, I. B. M. B. (2015). Prejuízo de memória do tipo episódica induzido pela Cetamina: diferenças funcionais na expressão de c-Fos em sub-regiões do hipocampo. Dissertação de Mestrado em Psicologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brasil.
- Squire, L. R., & Kandel, E.R. (2002). *Memória: da mente às moléculas*. Porto: Porto Editora.
- Squire, L.R. & Wixted, J.T. (2011). The Cognitive Neuroscience of Human Memory Since H.M. *Annu Rev Neurosci.*, 34, 259–288. [http:// doi: 10.1146/annurev-neuro-061010-113720](http://doi:10.1146/annurev-neuro-061010-113720).
- Squire, L. R., & Zola, S. M. (1996). Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(24), 13515–13522.
- Tan, H., M., Wills, T.J. & Cacucci, F. (2017). The development of spatial and memory circuits in the rat. *WIREs Cogn Sci*, 8, 1424. [http:// doi: 10.1002/wcs.1424](http://doi:10.1002/wcs.1424).
- Touitou, Y. (2013). Adolescent sleep misalignment: a chronic jet lag and a matter of public health. *Journal of Physiology*, 107, 323–326.
- Toki, S., Morinobu, S., Imanaka, A., Yamamoto, S., Yamawaki, S., & Honma, K. (2007). Importance of early lighting conditions in maternal care by dam as well as anxiety and memory later in life of offspring. *European Journal of Neuroscience*, 25, 815–829, <http://doi:10.1111/j.1460-9568.2007.05288.x>.
- Tulving, E. (2002). Episodic Memory: From Mind to Brain. *Annual Review of Psychology*, 53(1), 1–25. <http://doi.org/10.1146/annurev.psych.53.100901.135114>.
- Tzischinsky, O. & Shochat, T. (2011). Eveningness, sleep patterns, daytime functioning, and quality of life in Israeli adolescents. *Chronobiol Int*, 28, 338–43.
- Van den Pon. A.N. (1980). The hypothalamic suprachiasmatic nucleus of rat: intrinsic anatomy. *J Comp Neurol.*, 191(4), 661–702.
- Vanssay-Maigne, A., Noulhiane, M., Devauchelle, A.D., Rodrigo, S., Baudoin-Chial, S., Meder, J.F., Oppenheim, C., Chiron, C. & Chassoux, F. (2011). Modulation of Encoding and Retrieval by Recollection and Familiarity: Mapping the Medial Temporal Lobe Networks. *Neuroimage*, 58 (4), 1131–1138.

- Warburton, E.C. & Brown, M.W. (2015). Neural circuitry for rat recognition memory. *Behav Brain Res.*, 15 (285), 131-9. . [http:// doi: 10.1016/j.bbr.2014.09.050](http://doi:10.1016/j.bbr.2014.09.050).
- Weinert, D., Eimert, H., Erkert, H.G. & Schneyer, U. (1994). Resynchronizatin of the circadian corticosterone rhythm after a light/dark shift in juvenile and adult mice. *Chronobiol Int*, 11, 222–31.
- Winters, B.D., Saksida, L.M., & Bussey, T.J. (2008). Object recognition memory: neurobiological mechanisms of encoding, consolidation and retrieval. *Neurosci Biobehav Ver*, 32, 1055–70.
- Wittmann, M., Paulus, M., Roenneberg, T. (2010). Decreased psychological well-being in late ‘chronotypes’ is mediated by smoking and alcohol consumption. *Substance Use and Misuse*, 45(1–2), 15–30. [PubMed: 20025436].
- Wirz-Justice A. (2008). Diurnal variation of depressive symptoms. *Dialogues Clin Neurosci*. 10(3), 337–343. [PubMed: 18979947]
- Yonelinas, A.P. & Levy, B. J. (2002). Dissociating familiarity from recollection in human recognition memory: Different rates of forgetting over short retention intervals. *Psychonomic Bulletin & Review*, 9 (3), 575–582.
- Yonelinas, A.P., Cohen, M.X., Dy, C.J., Tom, S.M. & D’Esposito M. (2004). Dissociable correlates of recollection and familiarity within the medial temporal lobes. *Neuropsychologia*, 42, 2–13.

## 9. ANEXOS

### 9.1 Artigo para submissão

Revista Chronobiology International (Classificação Qualis CAPES para Psicologia A2)  
**Memória e ritmicidade circadiana em ratos adolescentes submetidos a um protocolo de dessincronização forçada- modelo T22**

Kathlyn Kamoly Barbosa Cavalcanti; Jeane Constantino Pereira; Crhistine Andressa da Silva; Flávio Freitas Barbosa.

#### Abstract

The temporal adaptation of the species to the environment is of fundamental importance to ensure survival. However, the rhythm of modern society increasingly induces the individual to desynchronization, both internal and external, as a result of abrupt phase changes such as night shift or shift work and in the social Jet Lag. The same is also observed in adolescent individuals who, in order to comply with the curricular and extracurricular demands, adopt the habit of sleeping late and waking up early that leads to sleep deprivation and irregular hours of sleep and awakening. Thus, it is important to study the effects of these chronic phase shifts on the physiology and behavior of young mammals. In this work we attempt to characterize the effects of the 22h EC cycle, which is a model of internal forced desynchronization, on the recognition memory of objects and space and the expression of the circadian rhythmicity of adolescent rats. For this purpose, 44 male Wistar rats were used, divided into 2 groups: T24, n = 13 (LD 12:12 h) and T22, n = 31 (LD 11:11 h). The T22 group was subdivided into two groups that performed the tests, respectively: in the middle of the night coincidence between the environment and the biological night of each T22 mouse (n=16) and in the middle of the night of non-coincidence (n=15). The tasks New Object Recognition and Associative Spatial Task were used. The locomotor activity of these animals was recorded continuously and totalized at 5 min intervals. Later it was analyzed by visual inspection of the plot and the calculation of the circadian periodicity using the program *El Temps*. We conclude that the 22h LD cycle promotes dissociation in the circadian rhythm of locomotor activity in adolescent rats, impairing their performance in the mnemonic tasks evaluated.

**Keywords:** biological rhythm; circadian timing system; desynchronization.

#### Introdução

A evidência da memória como uma função cerebral, separada de outras habilidades cognitivas e perceptivas, foi possível graças aos achados obtidos no caso do paciente Henry Molaison (H.M.) (Scoville & Milner, 1957; Squire & Wixted, 2011).

A memória pode ser classificada, conforme a taxonomia clássica, levando em consideração o tempo em que pode permanecer retida (curto prazo e longo prazo), bem como considerando o seu conteúdo (explícito/declarativo e implícito/não-declarativo). Entende-se por memória de curto prazo aquela que pode perdurar por até poucos minutos, enquanto a de longo prazo pode ser revivenciada por horas ou a vida toda. A distinção entre as memórias declarativa e não-declarativa pode ser feita não apenas em termos de

anatomia, mas em termos de características operacionais, o tipo de informação processada e o propósito de cada sistema (Izquierdo 2011, 2013; Pause *et al.*, 2013; Squire & Zola, 1996; Cohen & Stachman, 2015).

A memória também exibe ritmicidade. Entende-se por ritmicidade biológica os fenômenos que ocorrem em seres vivos de uma maneira mais ou menos estável e periódica (Araújo & Marques, 2002).

Em linhas gerais é possível observar as influências dos ritmos circadianos na memória, aprendizagem e desempenho cognitivo. Primeiramente, a interrupção dos ritmos circadianos tem sido associada a deficiências da função cognitiva. Em seres humanos essa condição é observada com o envelhecimento, trabalho em turnos, *jet lag* e doenças. Em segundo lugar, numerosos estudos afirmam que os processos subjacentes ao desempenho cognitivo mostraram alternâncias ao longo do dia. Roedores exibem déficits de retenção em inúmeras tarefas em intervalos periódicos, sugerindo que a recordação da memória está sujeita à modulação temporal separadamente da aquisição e da formação da memória. Em terceiro lugar, a hora do dia ou a fase do ciclo circadiano podem apresentar sugestões contextuais (estampa temporal), que são aprendidas juntamente com características do ambiente do organismo (Ralph *et al.*, 2002; Cain, Chou & Ralph, 2004; Cain, McDdonald & Ralph, 2008). Em hamsters (Cain, Chou & Ralph, 2004) e ratos (Garren, Sexauer & Page, 2013), quando a fase circadiana atua como estampa temporal a recordação e o desempenho são melhores com 24 horas de intervalo.

A adaptação temporal das espécies ao ambiente é de fundamental importância para garantir a sobrevivência. Isso é possível graças à presença do sistema de temporização circadiana, que é endógeno e originário de osciladores internos ou relógios biológicos (Golombek & Rosenstein, 2010; Dibner *et al.*, 2010). Estes relógios são autônomos e geram o ritmo circadiano, necessitando estar sincronizados ao ambiente a fim de lidar com as mudanças periódicas na disponibilidade de alimentos, exposição à luminosidade ou riscos predatórios. Para que haja a integração do tempo interno com o tempo geofísico, o organismo necessita captar os sinais de marcação temporal, os chamados Zeitgebers (Golombek *et al.*, 2013).

Contudo, pode haver uma quebra do equilíbrio em diferentes níveis, tanto entre o NSQ e os relógios periféricos, quanto entre o NSQ e o tempo geofísico. Alguns fatores, patológicos ou não patológicos, endógenos ou exógenos, podem levar à dessincronização dos ritmos circadianos e alterar o seu período, ficando maior ou menor do que às 24 horas esperada (Engelberth *et al.*, 2013; Wirz-Justice, 2008).

Campuzano, Vilaplana, Cambras e Díez-Noguera (1998), desenvolveram um modelo de dessincronização forçada em que os ratos ao serem submetidos a um ciclo claro/escuro menor que um período de 24h apresentam dois ritmos de atividade locomotora. Um é arrastado pelo CE e exibe período de 22 horas (T22), nomeado componente sincronizado pela luz (CSL); outro dissociado do ciclo CE apresenta período superior a 24 h ( $\tau > 24$ ), nomeado componente não sincronizado pela luz (CNSL). Ao longo do tempo, os períodos alternam entre fases alinhadas, em que a fase de atividade do CNSL ocorre durante a fase escura do ciclo CE (sobrepondo-se à fase de atividade do T22), e fases desalinhadas, em que a fase de atividade do CNSL ocorre durante a fase de luz (sobrepondo-se com a fase de repouso T22) (Campuzano *et al.*, 1998; De La Iglesia *et al.*, 2009).

Albert *et al.*, (2013) ressaltam a importância em estudar o efeito dos deslocamentos de fase de forma crônica sobre a fisiologia e comportamento dos jovens, visto que é crescente o número que alteram o sono por condições de iluminação. Defendem que o modelo animal satisfaz o estudo sobre as influências do ambiente no comportamento de adolescentes, pois os ratos podem ser isolados da mãe com 21 dias de vida e atingem a maturidade sexual próximo dos 2 meses.

O presente trabalho traz uma grande contribuição sobre os prováveis prejuízos na memória causados pela frequente exposição a mudanças de fase crônicas que provocam distúrbios na ritmicidade circadiana. Apesar de haverem evidências sobre as consequências da dessincronização interna e do jetlag social, pouco se sabe sobre seus efeitos principalmente na memória de mamíferos adolescentes. Este trabalho teve como objetivo caracterizar os efeitos da dessincronização forçada interna na memória e na expressão da ritmicidade circadiana de ratos adolescentes.

## **1. Métodos**

### **1.1 Animais**

Foram utilizados ratos Wistar machos (N=44), sendo um grupo controle com 13 animais sob ciclo CE simétrico de 24h e um grupo experimental com 31 animais, que foram mantidos em um ciclo claro-escuro (CE) simétrico de 22h, sendo subdivididos em animais que realizaram os testes de memória na noite de coincidência (n=16) e em animais que realizaram as tarefas de memória na noite de não-coincidência (n=15). Os ratos foram mantidos em gaiolas de propileno (30 cm de comprimento x 37 cm de largura x 16 cm de altura), que por sua vez ficavam dentro de cabines de claro-escuro (CE)

(figura 1). Cada cabine era iluminada por fitas de leds de luz branca de 1,5 m. A sala onde eram mantidos, possuía atenuação acústica, controle de temperatura ( $23,17 \pm 1,39$ ), umidade ( $42,08 \pm 8,14$ ) e luminosidade (CE de 24h para o grupo controle e 22h para os grupos experimentais). Os animais recebiam água e ração *ad libitum*.



**Figura 1.** Gaiolas de propileno dentro das cabines de claro-escuro.

Quando os ratos completaram 21 dias de idade (dia 1 do experimento), foram desmamados, pesados (média de  $41,8 \text{ g} \pm 13,14$ ) e isolados em gaiolas, sendo alocados nas cabines de CE. Os animais do grupo experimental tiveram o ajuste do ciclo CE para 22h e teve início o experimento. Após ter sido caracterizada a condição de dissociação para todos os animais sob T22, em torno do dia 19 do Experimento, as tarefas comportamentais foram iniciadas e ocorriam em intervalos de aproximadamente 7 dias, que era o tempo necessário para a ocorrência de outra noite de coincidência ou de não coincidência. As tarefas comportamentais foram realizadas na seguinte sequência: 1) Reconhecimento de Objetos (dia 21 do experimento); 2) Tarefa Espacial Associativa.

Os testes ocorriam no meio da fase escura para o grupo T24, no meio das noites de coincidência e não coincidência para os animais do T22h.

Depois de finalizado todos os testes, aproximadamente no 42º dia do experimento, os animais foram encaminhados para eutanásia e os tecidos cerebrais do hipotálamo anterior, córtex pré-frontal e hipocampo foram removidos e armazenados para análise posterior.

## **1.2 Procedimentos experimentais**

### **1.2.1 Reconhecimento de Objetos Novos**

Para realização do experimento os animais eram trazidos 30 minutos antes do início das tarefas para a sala de comportamento do LEMCOG, que já se encontrava com o ar-condicionado, ruído branco e iluminação ligados.

A temperatura do ar-condicionado era programada para manter em torno de 24°C. O ruído branco era reproduzido pelo software Windows Media Player, com o volume do software a 100% e o do notebook a 65%.

A intensidade luminosa era de 8 lux no centro do campo a uma altura de 20 cm e de 15 lux a 40 cm de altura. A iluminação da sala de experimentos era feita por duas luminárias com uma lâmpada de luz branca fria (6500k, 15w, 50-60hz, Lm 815,6). Uma luminária ficava atrás da cortina, em cima da mesa do computador, tendo a luz direcionada para a parede, enquanto outra luminária ficava próxima a parede do ar-condicionado, coberta com folha de papel A4 para controlar a luminosidade.

Neste protocolo experimental os animais passaram por duas sessões individuais de habituação ao campo aberto, uma sessão de amostra e uma de teste, tanto na tarefa RON, quanto na tarefa espacial associativa (TEA). O intervalo entre cada sessão durou 30 minutos, cada habituação teve a duração de 10 min e a amostra e o teste 5 min cada. Os animais sempre foram posicionados no centro do CA com a cabeça voltada para a parede do ar-condicionado, oposta a cortina. Os objetos também foram direcionados para o centro do campo a uma distância de 10 cm de distância da parede.

A primeira tarefa realizada foi a RON. Neste teste, dois objetos idênticos (A1 e A2) eram apresentados ao animal na fase de amostra e dois objetos distintos (A e B) na fase de teste, sendo um já previamente apresentado na sessão anterior e o objeto novo no local de um dos objetos familiares. Nessa tarefa é esperado que o animal explore mais o objeto B ao invés do A, na sessão de teste, por ser um objeto novo em um espaço familiar.

### **1.2.2 Tarefa Espacial Associativa**

Na fase de amostra da tarefa espacial associativa, dois objetos distintos (A e B) foram apresentados aos animais, já na sessão de teste dois objetos idênticos (A1 e A2) foram expostos para a exploração dos animais, o objeto A1 encontra-se no mesmo local e outro objeto idêntico a A1 (A2) no local de B (**figura 13**). Nessa tarefa é esperado que o animal explore mais o objeto A2 ao invés do A1, pois o objeto A2, apesar de ser igual ao A1, está em um local que havia um objeto diferente antes.

Foi observado que 5 animais pertencentes ao grupo T22 e 1 animal do T24 não exploraram os objetos na fase de amostra da tarefa RON, sendo excluídos da análise

estatística. Em relação à tarefa TEA, 3 participantes do grupo T22 e 1 do grupo T24 foram excluídos das análises pelo mesmo motivo.

Foi observado que 5 animais pertencentes ao grupo experimental, durante a tarefa RON, estavam em noite de não-coincidência parcialmente, sendo excluídos da análise estatística. Já durante a tarefa TEA, 4 animais estavam em noite de não-coincidência parcialmente, sendo também excluídos da análise estatística. Assim, ao término de todo o experimento, dos 44 sujeitos, somente 33 foram analisados na tarefa RON (T22, n=21; T24 n=12) e 36 na TEA (T22, n=24; T24 n=12).

Todas as sessões foram gravadas pelo *software Debut* utilizando uma *webcam* (modelo *FaceCam 1020, Genius®*).

### **1.3 Coleta e análise dos dados da atividade locomotora**

A atividade motora foi registrada de forma contínua através de sensores de movimento por infravermelho instalados sobre as gaiolas conectados a um computador por uma placa de aquisição de dados da HYTEK Automation Inc. (iUSBDAQ-U120816AO). Os dados foram totalizados e registrados em intervalos de 5 minutos pelo software SAP – Sistema de Acionamento Programado (desenvolvido pelo Laboratório de Cronobiologia – UFRN). O controle do acionamento da iluminação da sala também foi realizado por esse software.

Para caracterização do ritmo circadiano da atividade motora de cada grupo, a atividade de cada rato foi analisada por inspeção visual dos actogramas e pelo cálculo da periodicidade circadiana ao longo da adolescência utilizando o programa *El Temps* (Antoni Díez-Noguera, Universitat de Barcelona, <http://www.el-temps.com>). O periodograma Sokolove-Bushell foi utilizado para o cálculo da periodicidade circadiana.

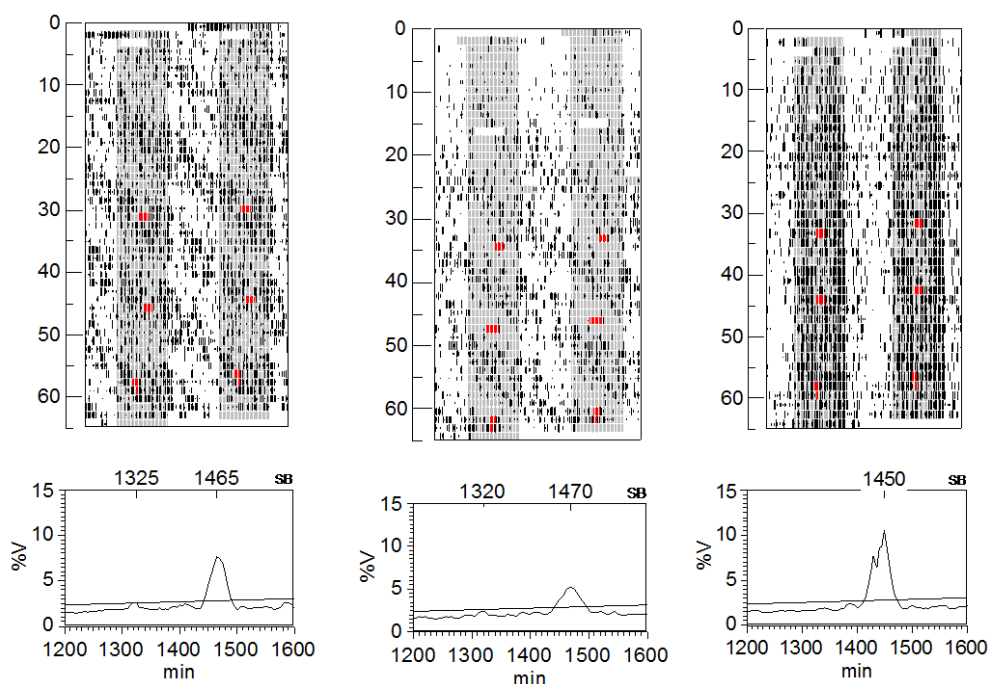
### **1.4 Análise comportamental e estatística**

A exploração dos objetos foi analisada manualmente através do *software* de rastreamento *EthoWatcher* (UFSC, Brasil) que utilizou os vídeos gravados pelo *software Debut*. Através do comando de teclas o avaliador registra quando o animal explorou o objeto. Foi considerada exploração o momento em que o animal aproximou-se do objeto com o focinho, em no mínimo 02 cm, e se engajou em explorar o objeto. Não foi considerada exploração quando o animal utilizou o objeto como apoio para explorar o ambiente ou quando fez *grooming* quando próximo do mesmo. Foram calculadas a taxa de exploração e o índice de discriminação dos objetos. A taxa de exploração demonstra a

exploração de um objeto em relação à exploração de todos os objetos somados, sendo gerado um valor entre 0 e 1. O índice de discriminação mostra quanto um objeto foi explorado em relação a outro, gerando valores que variam entre -1 e 1, o sinal negativo indica que a variável escolhida para comparação foi menos explorada do que a variável subtraída. Quando o valor está próximo de 0 considera-se que a exploração ocorreu ao acaso. Os procedimentos estatísticos foram realizados no programa SPSS, versão 21.0, sendo consideradas as diferenças estatisticamente significativas para  $p < 0,05$ .

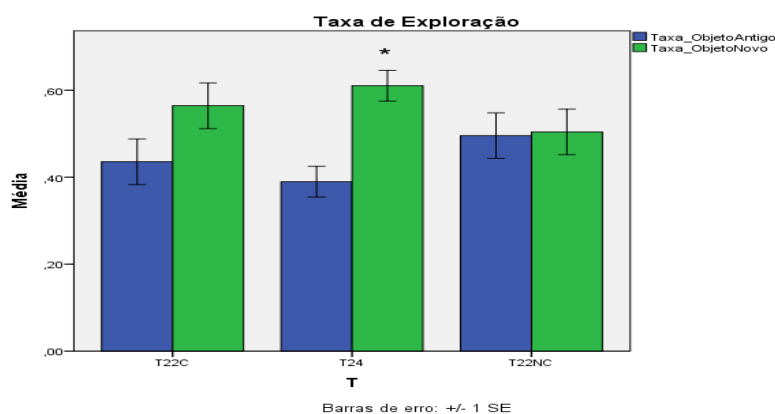
## 2. Resultados

Todos os animais do grupo controle apresentaram um ritmo circadiano estável com período de 24h e variância média de  $9,77 \pm 4,34\%$ , indicando estarem sincronizados ao ciclo CE externo. Por outro lado, todos os animais do grupo experimental, sob CE 11:11, apresentaram dois ritmos circadianos na atividade locomotora: um com período maior que 24h, com variância média de  $3,49 \pm 0,59\%$ , e outro com o mesmo período do ciclo CE, com variância média de  $4,60 \pm 1,27\%$ ). As representações gráficas do ritmo circadiano de atividade locomotora dos animais do grupo experimental T22, que realizaram as tarefas em noites de não-coincidência e noites de coincidência, e do Grupo controle, com seus respectivos periodogramas podem ser vistas abaixo.



**Figura 2.** Actogramas de um animal do grupo T22 – Noite de coincidência (esq.), T22 – Noite de não-coincidência (centro) e Grupo Controle (dir.). Os pontos em vermelho situados verticalmente, de cima para baixo, correspondem aos momentos em que foram realizados os respectivos testes comportamentais: 1) RON; 2) Tarefa de Reconhecimento Espacial Associativo; 3) Esquiva Passiva, apresentada em outro trabalho do grupo.

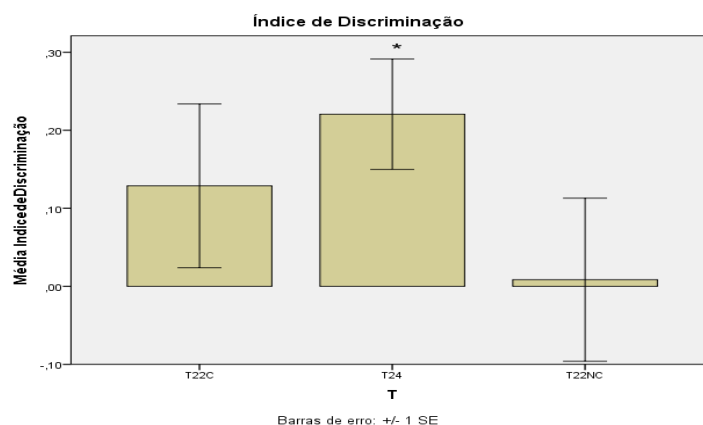
Foi realizado o teste *t* dependente para avaliar a taxa de exploração dos objetos em cada grupo individualmente. O teste evidenciou diferença significativa para o grupo controle T24. Os animais pertencentes a este grupo exploraram mais o objeto novo (M=39,42, EP=6,31) do que o objeto antigo (M=24,40, EP=3,81,  $t(10) = -2,94$ ,  $p = 0,015$ ,  $r = 0,68$ ). Os animais que realizaram a tarefa em noite de não coincidência (T22NC), na média exploraram mais o objeto novo (M=16,82, EP=2,93), em comparação com o objeto antigo (M=11,82, EP=1,84,  $t(10) = -1,65$ ,  $p = 0,0772$ ,  $r = 0,46$ ). Os animais do grupo T22C também exploraram mais o objeto novo (M=22,72, EP=3,29) do que o objeto antigo (M=21,36, EP=2,80,  $t(8) = -0,30$ ,  $p = 0,131$ ,  $r = 0,11$ ). Contudo em nenhum dos grupos do modelo de dessincronização forçada os resultados obtidos foram significativos.



**Figura 3.** Taxa de exploração dos objetos para os grupos experimentais T 22C (noite de coincidência) e T22NC (noite de não coincidência) e o grupo controle T24 na tarefa de Reconhecimento de Objetos Novos. O gráfico representa à média e o erro padrão. \* resultado significativo ( $p < 0,05$ ).

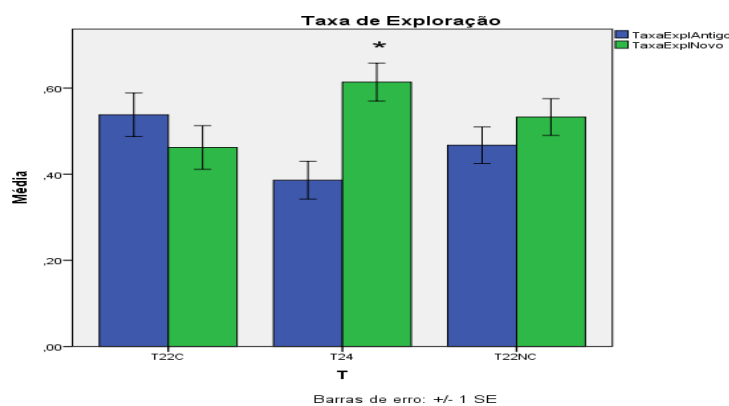
A ANOVA de uma via para amostras independentes também foi feita nesta tarefa para analisar a discriminação dos objetos pelos grupos. Segundo este teste não houve diferença significativa entre o grupo controle T24 e os grupos experimentais T22 (noite de coincidência e noite de não coincidência) [ $F(2) = 1,23$ ,  $p = 0,31$ ].

O teste *t* de uma amostra foi feito para comparar os resultados dos índices de discriminação ao acaso. Segundo o teste houve diferença significativa para o grupo T24 [ $t(10) = 3,12$ ,  $p = 0,01$ ], o que não foi observado para os grupos experimentais T22 C [ $t(10) = 1,23$ ,  $p = 0,25$ ] e T22 NC [ $t(8) = 0,08$ ,  $p = 0,94$ ], inferindo assim, que os animais pertencentes aos grupos experimentais exploraram os objetos ao acaso.



**Figura 3.** Índice de discriminação entre os objetos antigo e novo para os grupos controle e experimentais T 22C (noite de coincidência) e T22NC (noite de não coincidência). O gráfico representa à média e o erro padrão.

Em relação à tarefa TEA, o teste *t* pareado foi empregado para avaliar a taxa de exploração dos objetos de cada grupo separadamente. Os animais pertencentes ao grupo controle T24 exploraram mais o objeto novo deslocado ( $M=0,61, EP=0,04$ ) do que o objeto antigo não deslocado ( $M=0,38, EP= 0,04, t(11)= -2,594, p= 0,025, r=0,62$ ). Embora os animais do grupo experimental T22NC (noite de não coincidência), tenham em média explorado mais o objeto novo deslocado ( $M=0,53, EP=0,04$ ), em comparação com o objeto antigo não deslocado ( $M=0,47, EP= 0,04, t(10)= -0,77, p=0,468, r=0,24$ ), seu resultado não foi significativo. Os animais pertencentes ao T22C (noite de coincidência) também não apresentaram resultado significativo e exploraram mais o objeto antigo não deslocado ( $M=0,53, EP=0,050$ ) do que o objeto novo deslocado ( $M=0,46, EP= 0,05, t(12)=0,750, p= 0,460, r=0,21$ ).

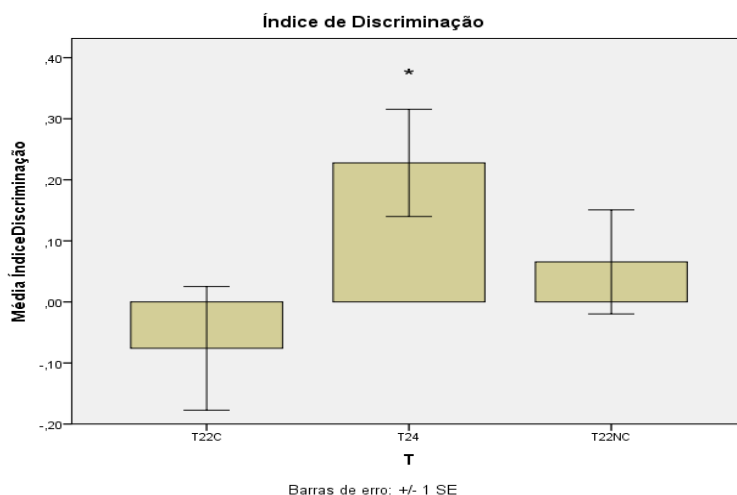


**Figura 4.** Taxa de exploração dos objetos antigo não deslocado e novo deslocado para os grupos experimentais T 22C (noite de coincidência) e T22NC (noite de não coincidência) e o controle T24 na Tarefa Espacial Associativa. O gráfico representa à média e o erro padrão. \* resultado significativo ( $p < 0,05$ ).

A ANOVA de uma via para amostras independentes foi feita para analisar se os grupos conseguiram realizar a discriminação dos objetos. Ela demonstrou que não

houve diferença significativa entre o grupo controle T24 e os grupos experimentais T22 (noite de coincidência e noite de não coincidência) [ $F(2) = 2,78, p = 0,08$ ].

O teste  $t$  de uma amostra foi utilizado em seguida para comparar os resultados dos índices de discriminação ao acaso. Segundo o teste houve diferença significativa para o grupo T24 [ $t(11) = 2,60, p = 0,03$ ], o que não foi observado para os grupos experimentais T22 C [ $t(12) = -0,75, p = 0,47$ ] e T22 NC [ $t(10) = -0,77, p = 0,46$ ], inferindo assim, que os animais pertencentes a estes grupos experimentais fizeram a exploração dos objetos ao acaso.



**Figura 5.** Índice de discriminação entre o objeto antigo não deslocado e o objeto novo deslocado para os grupos controle e experimentais T 22C (noite de coincidência) e T22NC (noite de não coincidência). O gráfico representa a média e o erro padrão.

### 3. Discussão

Observamos que os ratos sob T22 apresentaram dois ritmos de atividade motora, um sincronizado ao ambiente, exibindo o mesmo período do ciclo CE de 22h e o outro que se expressou em livre-curso, exibindo um período maior que 24h.

Por nossos sujeitos experimentais serem adolescentes, partimos do pressuposto do trabalho de Albert *et al.*, (2013), no qual observaram que ratos de mesma faixa etária expostos a atrasos e/ou avanços de fase de forma crônica, comparável ao estilo de vida de adolescentes humanos, apresentaram um único e estável ritmo circadiano na atividade motora. Conforme os autores, a não observação dos dois ritmos de atividade locomotora é possível pela maior plasticidade dos indivíduos nessa fase, exibido pelo maior acoplamento interno no NSQ, ou seja, entre as regiões ventrolateral e dorsomedial. No mesmo estudo foi possível analisar que os ratos adultos, diferentemente dos adolescentes, apresentaram os dois ritmos de atividade locomotora. Trabalhos

anteriores também demonstraram que ratos adultos expostos a dessincronização forçada, modelo T22, apresentavam dissociação na ritmicidade circadiana da atividade motora (Campuzano *et al.*; 1998, De la Iglesia *et al.*, 2004; Neto *et al.*, 2008). Nossos achados indicam que ratos adolescentes sob o modelo T22 de dessincronização forçada também podem apresentar dissociação na ritmicidade circadiana da atividade motora de forma semelhante a ratos adultos sob o mesmo protocolo. Diante dos nossos resultados podemos sugerir que apesar da plasticidade ser maior em adolescentes, quando comparado a animais adultos, o modelo T22 é forte o suficiente para promover a dessincronização entre o meio interno e o externo.

Em relação às tarefas de memória, os animais sob T22 apresentaram prejuízo em seus desempenhos

Toki *et al.* (2007) analisaram se as condições iniciais de iluminação afetavam o desenvolvimento neurológico de ratos Sprague-Dawley submetidos a avanços ou atrasos de fase. Especificamente em relação à memória, a Tarefa de Reconhecimento de Objetos Novos (RON) foi aplicada durante a fase escura, em dois momentos distintos, durante a adolescência e idade adulta. O teste *t* de uma amostra evidenciou que na retenção de 1h houve diferença significativa para o índice de discriminação dos grupos adolescentes e adultos submetido ao CE de 24h. Os animais que foram submetidos ao CE de 18/6 h, grupos adolescente e adulto, passaram um tempo menor explorando o objeto novo, dessa forma apresentaram os menores índices de discriminação em comparação aos demais grupos. Em contraste, durante o teste de retenção de 24 h não houve preferência pelo objeto novo em nenhum dos grupos e fases do desenvolvimento.

Através deste trabalho podemos mais uma vez ressaltar que apesar da juventude ser um período de maior plasticidade, condições iniciais de iluminação anormais demonstram exercer também influência sobre a memória de ratos adolescentes de diferentes linhagens. O uso da tarefa de reconhecimento de objetos pode exibir sensibilidade na investigação do comprometimento mnemônico, pois o treinamento é limitado e os requisitos comportamentais desta tarefa tornam-na especialmente adequada para estudar a ontogenia dessa forma de memória no rato, tanto em relação ao desenvolvimento normal, quanto no anormal do cérebro (Ramsaram, Sanders & Stanton, 2016).

Divergindo dos resultados até aqui apresentados, Neto *et al.*, (2008), não observaram prejuízo de ratos adultos sob T22, quando avaliados seus desempenhos através da tarefa de reconhecimento de objetos novos. Tanto os animais do grupo controle, quanto os experimentais, apresentaram índices de reconhecimento semelhantes

para frequência e tempo de exploração. Nossos animais do grupo experimental não apresentaram resultados significativos nem quanto à taxa de exploração, nem quanto ao índice de discriminação. Sugerimos que tal discordância, provavelmente, diz respeito à diferença da faixa etária dos animais nos dois estudos.

Ainge e Langston (2012) notaram que os ratos Lister sob CE de 24h apresentaram uma taxa de exploração maior para o objeto novo, quando comparado ao antigo. Ao investigarem a memória de reconhecimento e a ontogenia das representações espaciais de ratos jovens (24 e 30 dias de vida), através das tarefas de reconhecimento de objetos novos e de reconhecimento espacial associativo puderam enfatizar que os índices de exploração dos ratos com 30 dias foram mais expressivos, quando comparados aos dos ratos mais novos, em ambas as tarefas.

Estes achados corroboram com nossos resultados, visto que os animais pertencentes ao nosso grupo controle apresentaram um bom desempenho, tanto na tarefa de reconhecimento de objetos novos, quanto na tarefa espacial associativa.

Trabalhos com humanos e modelos animais demonstram que a capacidade de aprender, lembrar e depois modificar as respostas atuais de acordo com a experiência anterior são atributos fundamentais do comportamento animal e podem ser influenciados diferencialmente pelos ritmos circadianos do animal (Ralph *et al.*, 2002; Cain & Ralph, 2004, 2009; Cain, McDonald & Ralph, 2008; Garren, Sexauer & Page, 2013).

Os ritmos cerebrais flutuam periodicamente, refletindo a atividade sincronizada de um grande número de neurônios, o que é relevante para a cognição, como no caso da memória. Acredita-se que os ritmos cerebrais tenham um papel fundamental na formação da memória, sincronizando e, assim, coordenando, a atividade dos neurônios distribuídos durante as operações de memória (Colgin, 2016). Em se tratando de memória, sabe-se que o hipocampo é uma estrutura essencial. Nele ocorre a associação das informações “o que”, e “onde” (Ranganath *et al.*, 2004; Cohen & Stachman, 2015). Sendo assim a tarefa associativa está mais associada à função hipocampal, enquanto que ainda existe discordância quanto a tarefa de reconhecimento de objetos novos, apesar de que o córtex perirrinal está claramente associada a essa função.

Durante a neurogênese adulta, as células granulosas recém-fabricadas produzidas dentro do giro denteado do hipocampo formam sinapses funcionais que parecem proporcionar melhor desempenho nas tarefas de memória espacial e reparação neural. Como o aumento da neurogênese está associado a habilidades cognitivas aprimoradas em roedores, o controle circadiano ótimo da divisão celular, que introduz novos neurônios no circuito do hipocampo, também pode aumentar o desempenho dos

mesmos em tarefas que envolvam a memória (Karatsoreosa *et al.*, 2011; Malik *et al.*, 2015). Como também o comprometimento do ritmo circadiano, através de alterações na fase do relógio circadiano, pode prejudicar a atividade normal desta estrutura e suprimir a neurogênese (Malik *et al.*, 2015).

Os déficits de desempenho nas tarefas de memória nos ratos pertencentes aos grupos experimentais T22 evidenciam que a dessincronização forçada interna compromete o funcionamento do hipocampo e, por conseguinte, a memória destes animais, apesar de estarem em uma fase do desenvolvimento de maior plasticidade neuronal. Sugerimos a realização de novos estudos utilizando o modelo T22 ao longo da ontogênese para que possa ser mais bem entendido os efeitos deste protocolo na memória não só a curto, mas em longo prazo, no intuito de que as lacunas ainda existentes possam ser esclarecidas.

#### 4. Conclusão

Nossos resultados reportam que o modelo de dessincronização forçada T22 é suficientemente capaz de promover dois ritmos de atividade locomotora, bem como prejudicar o desempenho de ratos adolescentes submetidos a este protocolo nas tarefas de Reconhecimento de Objetos Novos e Espacial Associativa. Diante destes resultados, este trabalho torna-se mais um indicador das possíveis complicações futuras de adolescentes humanos que se submetem a um processo de dessincronização forçada.


#### Referências

- Albert, N., da Silva C, Díez-Noguera A, Cambras T.(2013). Different adaptation of the motor activity rhythm to chronic phase shifts between adolescent and adult rats. *Behav Brain Res.*, 252, 347–55. [http:// doi: 10.1016/j.bbr.2013.06.025](http://doi:10.1016/j.bbr.2013.06.025) PMID: 23792134.
- Ainge, J.A., & Langston, R.F., (2012). Ontogeny of neural circuit underlying spatial memory in the rat. *Frontiers in Neural Circuits*, 6(8), 1-10. [http://doi: 10.3389/fncir.2012.00008](http://doi:10.3389/fncir.2012.00008).
- Araújo, J. F. & Marques, N. (2002). Cronobiologia: uma multidisciplinaridade necessária. *Margem*, 15, 95-112.
- Cain S.W., Chou T. & Ralph, M.R (2004). Circadian modulation of performance on an aversion-based place learning task in hamsters. *Behavioural brain research*, 150 (1-2). [http:// 201–205.10.1016/j.bbr.2003.07.001](http://doi:10.1016/j.bbr.2003.07.001) [PubMed: 15033293].
- Cain, S.W., McDonald, R.J. & Ralph, M.R. (2008). Time stamp in conditioned place avoidance can be set to different circadian phases. *Neurobiol Learn Mem*, 89(4), 591-4.
- Cain, S.W., Yoon, J., Shrestha, T.C. & Ralph, M.R. (2014). Retention of a 24-hour time memory in Syrian hamsters carrying the 20-hour short circadian period mutation


- in casein kinase-1 $\epsilon$  (ck1 $\epsilon$ /tau). *Neurobiology of Learning and Memory*, 114,171–177.
- Campuzano, A., Vilaplana, J., Cambras, T. & Díez-Noguera, A. (1998). Dissociation of the rat motor activity rhythm under *T* cycles shorter than 24 hours. *Physiology&Behavior* 63(2):171-176.
- Cohen, S. J., Stackman Jr., R. W. (2015). Assessing rodent hippocampal involvement in the novel object recognition task. A review. *Behavioural Brain Research*, 285,105-117. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2014.08.002> 0166-4328/© 2014.
- Colgin, L. L., (2016). Rhythms of the hippocampal network. *Nature Reviews Neuroscience*. [http:// doi:10.1038/nrn.2016.21](http://doi:10.1038/nrn.2016.21).
- De La Iglesia, H.O., Cambras, T., Schwartz, W.J. & Díez-Noguera, A. (2004). Forced Desynchronization of Dual Circadian Oscillators within the Rat Suprachiasmatic Nucleus. *Current Biology*, 14, 796–800. [http:// DOI 10.1016/j.cub.2004.04.034](http://DOI 10.1016/j.cub.2004.04.034).
- De La Iglesia, H.O.,Schwartz, M.D., Wotus, C., Liu, T., Friesen, W.O., Borjigin, J., & Oda, G.A. (2009). Dissociation of circadian and light inhibition of melatonin release through forceddesynchronization in the rat. *PNAS*, 106(41), 17540–17545.
- Dibner, C., Schibler, U., & Albrecht, U., (2010). The mammalian circadian timing system:organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annu Rev Physiol*, 17(72), 517-49.
- Ennaceur, A. Michalikova, S., Bradford, A. & Ahmed, S. (2005). Detailed analysis of the behavior of Lister and Wistar rats in anxiety, object recognition and object location tasks. *Behavioural Brain Research*, 159,247–66.
- Engelberth, R.C.G.J., Pontes, A.L.B. de, Fiuza, F.P., Silva, K.D. de A., Resende, N. da S., Azevedo, C.V. de M., Costa, M. S. M. O., Cavalcante,J. C., Nascimento Jr, E.S., Gavioli,E.C., & Cavalcante, J.S.(2013). Changes in the suprachiasmatic nucleus during aging: implications for biological rhythms.*Psychology & Neuroscience*, 6(3), 287 –297. <http://doi: 10.3922/j.psns.2013.3.07>.
- Garren, M.V., Sexauer, S.B. & Page, T.L (2013). Effect of circadian phase on memory acquisition and recall: operant conditioning vs. classical conditioning. *PloS one*, 8(3):e58693.10.1371/journal.pone.0058693 [PubMed: 23533587].
- Golombek, D.A. & Rosenstein, R.E. (2010).Physiology of circadian entrainment. *Physiol Rev*, 90(3),1063-102. <http:// doi: 10.1152/physrev.00009.2009>.
- Golombek, D.A., Casiraghi,L.P., Agostino, P.V., Paladino,N., Duhart, J.M., Plano, S. A., Chiesa,J. J. (2013). The times they're a-changing: Effects of circadian desynchronizationon physiology and disease. *Journal of Physiology*, 310–322.
- Hoener, A. J. & Doeller, C. F. (2017). Plasticity of hippocampal memories in humans. *ScienceDirect*, 43, 102-109.<http://dx.doi.org/10.1016/j.conb.2017.02.004>.
- Izquierdo, I. A. (2011). Memória. 2ª Ed. Porto Alegre: Artmed.
- Izquierdo, I. A., Myskiw, J.C., Benetti, F. & Furini, C.R.G. (2013). Memória: tipos e mecanismos- achados recentes. *Revista USP*, 98, 9-16.
- Karatsoreosa, I.N., Bhagata, S., Blossb, E.B., Morrisonb, J.H. & McEwen, B.S. (2011). Disruption of circadian clocks has ramifications for metabolism, brain, and behavior.*PNAS*, 108(4), 1657-1662.<http://www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1018375108/-/DCSupplemental>.
- Malik, A., Kondratov, R.V., Jamasbi, R.J., Geusz, M.E. (2015). Circadian Clock Genes Are Essential for Normal Adult Neurogenesis, Differentiation, and Fate Determination. *PLoS ONE* 10(10): e0 139655. <http://doi: 10.1371/journal.pone.0139655>.
- Muessig, L., Hauser, J., Wills, T.J., & Cacucci, F. (2016). Place Cell Networks in Pre-weanling Rats Show Associative Memory Properties from the Onset of Exploratory Behavior. *Cerebral Cortex*, 26, 3627–3636. <http://doi:10.1093/cercor/bhw174>.

- Neto, S.P.D., Carneiro, B.T.S., Valentinuzzi, V.S. & Araújo, J.F. (2008). Dissociation of the circadian rhythm of locomotor activity in a 22 h light–dark cycle impairs passive avoidance but not object recognition memory in rats. *Physiology & Behavior*, 94, 523–527.
- Pause, B. M., Zlomuzica, A., Kinugawa, K., Mariani, J., Pietrowsky, R., & Dere, E. (2013). Perspectives on Episodic-Like and Episodic Memory. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 7. <http://doi.org/10.3389/fnbeh.2013.00033>.
- Ralph, M.R., Ko, C.H., Antoniadis, E.A., Seco, P., Irani, F., Presta, C., & McDonald, R.J. (2002). The significance of circadian phase for performance on a reward-based learning task in hamsters. *Behavioural brain research*, 136(1), 179–184. [PubMed: 12385803].
- Scoville, W.B., Milner, B., (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatr*, 20:11–21. [PubMed: 13406589].
- Squire, L.R. & Zola-Morgan, J. (1991). The Cognitive Neuroscience of Human Memory Since H.M. *Annu Rev Neurosci.*, 34: 259–288. <http://doi:10.1146/annurev-neuro-061010-113720>.
- Squire, L. R., & Zola, S. M. (1996). Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(24), 13515–13522.
- Toki, S., Morinobu, S., Imanaka, A., Yamamoto, S., Yamawaki, S., & Honma, K. (2007). Importance of early lighting conditions in maternal care by dam as well as anxiety and memory later in life of offspring. *European Journal of Neuroscience*, 25, 815–829, <http://doi:10.1111/j.1460-9568.2007.05288.x>.
- Wirz-Justice A. (2008). Diurnal variation of depressive symptoms. *Dialogues Clin Neurosci*. 10(3), 337–343. [PubMed: 18979947]

## 9.2 Certidão do CEUA



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

**CERTIDÃO**

João Pessoa, 22 de novembro de 2013.  
CEUA Nº 0707/13

Ilmo(a). **Prof. Dr. Flávio Freitas Barbosa**  
Departamento **Psicologia - CCHLA - UFPB**

Orientando(a): **Crhistiane Andressa da Silva, (Pós Doutorado)**

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba em sua reunião ordinária de **22/11/2013** analisou e **APROVOU** a execução do projeto **Efeitos da dessincronização interna e do jet lag social na cognição, memória e ritmicidade circadiana de ratos ao longo da ontogênese.**

Com previsão de empregar **50 Ratos WISTAR - ANIMAIS DO BIOTÉRIO Prof. Thomas George.**

Para serem utilizados no período de **01/10/2013 a 30/09/2016**

Atenciosamente,



Prof. Dr. Luis Cezar Rodrigues  
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animal do CBiotec/UFPB

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA – CBiotec  
Centro de Biotecnologia – Universidade Federal da Paraíba  
<https://sites.google.com/site/ceuaacbiotec/> – [ceua@cbiotec.ufpb.br](mailto:ceua@cbiotec.ufpb.br)