

RAFAEL VITOR DE OLIVEIRA DA SILVA

**MEMÓRIA E RITMICIDADE CIRCADIANA EM RATOS ADULTOS
SUBMETIDOS A UM PROTOCOLO DE DESSINCRONIZAÇÃO FORÇADA
DURANTE AS FASES DE INFÂNCIA E ADOLESCÊNCIA - MODELO T22**

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

João Pessoa

2021

RAFAEL VITOR DE OLIVEIRA DA SILVA

**MEMÓRIA E RITMICIDADE CIRCADIANA EM RATOS ADULTOS
SUBMETIDOS A UM PROTOCOLO DE DESSINCRONIZAÇÃO FORÇADA
DURANTE AS FASES DE INFÂNCIA E ADOLESCÊNCIA - MODELO T22**

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas (Trabalho Acadêmico de conclusão de Curso), como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas da Universidade Federal da Paraíba.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Luiz Carlos Serramo Lopez

COORIENTADOR: Prof. Dr. Flávio Freitas Barbosa

João Pessoa

2021

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S586m Silva, Rafael Vitor de Oliveira da.

Memória e ritmicidade circadiana em ratos adultos submetidos a um protocolo de dessincronização forçada durante as fases de infância e adolescência : Modelo T22 / Rafael Vitor de Oliveira da Silva. - João Pessoa, 2021.

82 p. : il.

Orientação: Luiz Carlos Serramo Lopez.

Coorientação: Flávio Freitas Barbosa.

TCC (Graduação/Bacharelado em Ciências Biológicas)
- UFPB/CCEN.

1. Dessincronização da ritmicidade circadiana. 2. Protocolo T22. 3. Ratos Wistars. 4. Memória associativa. I. Lopez, Luiz Carlos Serramo. II. Barbosa, Flávio Freitas. III. Título.

UFPB/CCEN

CDU 612.821.2(043.2)

RAFAEL VITOR DE OLIVEIRA DA SILVA

**MEMÓRIA E RITMICIDADE CIRCADIANA EM RATOS ADULTOS
SUBMETIDOS A UM PROTOCOLO DE DESSINCRONIZAÇÃO FORÇADA
DURANTE AS FASES DE INFÂNCIA E ADOLESCÊNCIA - MODELO T22**

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas (Trabalho Acadêmico de conclusão de Curso), como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas da Universidade Federal da Paraíba.

Data: 09 de DEZEMBRO de 2021

Resultado: APROVADO

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Luiz Carlos Serramo Lopez, UFPB

Nome do Orientador, Instituição

Prof. Dr. Flávio Freitas Barbosa, UFPB

Nome do Coorientador, Instituição

Rochele Castelo-Branco, Pesquisadora em Pós-Doutorado, UFPB

Nome do Avaliador 1, Título, Instituição

Profa. Dra. Mirian Stiebbe Salvadori, UFPB

Nome do Avaliador 2, Instituição

Agradecimentos

Mais um ciclo se completando e quando olho para trás não consigo parar de me impressionar como tantas coisas na minha vida já mudaram. Mudaram pra melhor. Antes eu não me reconhecia como sou hoje, em muitos aspectos, mas entrar na universidade foi um passo enorme em direção a aceitação e descobrimento. A universidade me permitiu viver bem mais como eu queria, de mostrar bem mais como eu sou, como eu quero ser ou como eu nasci para ser. Espero continuar mudando e moldando cada vez mais meu eu. Assim como a ciências, nós não somos imutáveis, pelo contrário, estamos em constante mudança e renovação.

Dito isso, pode parecer clichê, mas queria agradecer demais a minha família, pessoas bem diferentes entre si, mas sei que tenho um pouquinho de cada uma comigo. As minhas irmãs, Fátima e Ingrid, que me ensinaram muito durante meu crescimento. Ao meu sobrinho, Enzo Gabriel, por apenas existir. A minha avó, Francisca, que me mimou e mima muito até hoje. Ao meu pai, Martinho, por me defender sempre que preciso. E finalmente, a minha mãe, Maria José, que amo imensamente e devo tudo a ela, inclusive o suporte para fazer e estar terminando esta graduação, mulher extremamente forte, que desde pequena enfrenta dificuldades, que perdeu sua mãe muito nova, mas teve que ser e assumir esse papel por mim e pelas minhas irmãs. Te amo demais mãe e te devo tudo que eu sou.

Quero agradecer muito aos meus amigos, amigos de verdade, que eu consegui fazer sem nem esperar. A gente cultivou uma amizade como eu nunca tinha tido antes ao longo desses anos e eu amo muito vocês. Mateus, Ana Clara, Natália e Adriennius, obrigado por estarem próximos de mim durante todo esse tempo, não sei se conseguiria sem o apoio de vocês. Aliás de toda a turma, que se juntava sempre que precisava e que fazia as melhores bagunças, Obrigado turma de ciências biológicas 2016.1. Ao amigo que não fiz na universidade, mas que esteve presente nesse processo, Victor Farias, obrigado por todo apoio.

Por fim, quero agradecer muito as pessoas do Laboratório de Memória de Cognição (LEMCOG) da UFPB, em que faço parte. Eu cheguei lá de repente, mas fui recebido super bem com o máximo de atenção. Sou extremamente grato ao meu orientador, Flavio Freitas Barbosa e a todas as pessoas que fazem o LEMCOG, em um trabalho incrível no mundo da pesquisa e essa coisa essencial que é a ciência. E dentro desse laboratório, eu fui

acolhido pelo núcleo de Cronobiologia que me recebeu de braços abertos. A Karen Pugliane, que praticamente me adotou academicamente, me ensinou e está me ensinando muito sobre como fazer e escrever ciência e me dá suporte sempre que preciso, e ao Júlio Leal e ao Jeanderson Soares, que estiveram juntos comigo em uma importante etapa de experimento.

Resumo

Problemas de aprendizado e memória relacionados a desregulação no sistema circadiano, são evidentes entre crianças e adolescentes com acesso a equipamentos eletrônicos e horários irregulares de vigília e sono. Sendo essencial para o funcionamento e regulação de várias funções metabólicas, fisiológicas e comportamentais, o estudo de possíveis efeitos na desregulação desse sistema tem grande importância para o bem estar dos seres vivos. Esta pesquisa utilizou o protocolo de dessincronização forçada T22 (11h claro e 11h escuro) para induzir a dessincronização da ritmicidade circadiana de atividade locomotora e analisar danos no padrão de atividade locomotora, memória de reconhecimento, memória espacial associativa e analisar comportamento de rearing em animais adultos que passaram por tal protocolo na infância ou na adolescência. Utilizamos 40 ratos *Wistars* machos, separados em 3 grupos: grupo controle (16 animais), que ficou em T24 (12h claro e 12h escuro) durante todo o período experimental; grupo que sofreu dissociação da gestação ao 21º dia do nascimento (*Infância D* - 12 animais); e grupo que sofreu dissociação do desmame ao 61º dia do nascimento (*Adolescência D* - 12 animais). Estes ratos realizaram na fase adulta, sob T24, os testes comportamentais de memória: reconhecimentos de objetos novos (RON) e reconhecimento espacial associativo (REA). Os actogramas nos mostram que o protocolo T22 promoveu a dissociação da ritmicidade locomotora das genitoras do grupo Infância D (ID) e nos animais do grupo adolescência D (AD), ou seja, os animais passaram a exibir dois ritmos. Os testes comportamentais nos mostram prejuízos nas tarefas RON e REA para ID, enquanto que para AD o desempenho em REA é prejudicado. Esse estudo nos mostra que a dessincronização circadiana pode causar danos em estruturas cerebrais envolvidas em diferentes tipos de memória, e que estes impactos podem perdurar até a idade adulta.

Palavras chave: Dessincronização; Protocolo T22.; Ratos *Wistars*; Memória.

Abstract

Learning and memory problems related to disruption of circadian rhythms are evident among children and adolescents with access to electronic devices and irregular hours of wake and sleep. Being essential for the functioning and regulation of several metabolic, physiological and behavioral functions, the study of possible effects on the dysregulation of this system is of great importance for the welfare of living beings. This research used the T22 forced desynchronization protocol (11 light and 11 dark) to induce a disruption of circadian rhythmicity from locomotive activities and to evaluate damage in recognition memory, spatial memory and rearing behavior in adult animals submitted to the protocol in childhood or in adolescence. We used 40 males *Wistar* rats, separated into 3 groups: control group (16 animals), which remained at T24 throughout the experimental period; group that underwent pregnancy dissociation on the 21st day of birth (Childhood D - 12 animals); and group under dissociation from weaning on the 61st day of birth (Adolescence D - 12 animals). These rats performed in adulthood, under T24, behavioral tests of memory: object recognition task (ORT) and associative spatial recognition (ASR). Analysis of the actogram shows that the T22 protocol promotes disruption of the locomotive of progenitress in the Childhood D group and in the animals of the adolescents D group, which means the animals had two rhythms of activity. Behavioral tests showed an impairment in the ORT and ASR tasks for CD, while for AD the performance in ASR is impaired, indicating differential maturation in different brain structures responsible for different types of memory. This study shows that circadian desynchronization can cause damage to different types of memory and these impacts can persist until adulthood.

Keywords: Desynchronization. Protocol T22. Wistars rats. Memory.

SUMÁRIO

1. Introdução	11
2. Objetivos	14
2.1. Objetivo Geral	14
2.2. Objetivos Específicos	14
3. Materiais e Métodos	15
3.1. Animais	15
3.1.1 Critério de exclusão	15
3.2. Condições de manutenção	16
3.3. Procedimentos metodológicos	17
3.3.1. Inversão de ciclo e reprodução	18
3.3.2. Protocolo de dessincronização forçada - Modelo T22	19
3.4. Testes comportamentais	20
3.4.1. Campo aberto	20
3.4.2. Rearing	21
3.4.3. Tarefa de reconhecimento de objetos novos (RON)	22
3.4.4. Tarefa de reconhecimento espacial associativo (REA)	22
4. Análise de dados	24
4.1. Atividade locomotora	24
4.2. Tarefas comportamentais	24
5. Resultados	26
5.1. Ritmicidade da atividade locomotora	26
5.1.1 Grupo Controle	26
5.1.2. Grupo Dessincronizados na Infância (Infância D)	28
5.1.3. Grupo dessincronizado na Adolescência (Adolescência D)	30
5.1.4. Fase adulta	31
5.2. Campo aberto	33
5.3. Rearing	34
5.3.1 Rearing na Tarefa de campo aberto	34
5.3.2. Rearing Amostra RON	35
5.3.3. Rearing Teste RON	37
5.3.4. Rearing Amostra REA	38
5.3.5. Rearing Teste REA	40
5.4. Tarefa de reconhecimento de objetos novos	41
5.4.1. Amostra	41
5.4.2. Teste	44
5.5. Tarefa de reconhecimento espacial associativo	46
5.5.1. Amostra	46

5.5.2. Teste	48
6. Discussão	51
7. Conclusão	57
8. Referências	58
9. Anexos	65
9.1. Gráficos - Infância	65
9.1.1. Pareamento	65
9.1.2. Lactação	67
9.2. Gráficos - Adolescência	70
9.3. Gráficos - Fase Adulta	73
9.3.1. Grupo Controle- Fase Adulta	73
9.3.2. Grupo Infância D- Fase Adulta	76
9.3.3. Grupo Adolescência- Fase Adulta	79
9.4. Certificado CEUA	82

1. Introdução

Vivemos em um planeta em rotação que está em constante mudança de luminosidade e temperatura. Vários estudos apontam que, por meio de pressões evolutivas, quase todas as espécies animais e vegetais desenvolveram sistemas circadianos de temporização, que através de mecanismos endógenos consegue se ajustar a mudanças ambientais diárias e adaptar comportamentos e fisiologia à hora adequada do dia, com período de 24 horas (RIVKEES, 2003). Surgindo primeiro em cianobactérias (HASTING et al., 2019), vários organismos possuem sistemas que além de regularem horários para repouso e vigília, estão diretamente envolvidos com padrões hormonais, regeneração celular, atividade cerebral, entre outras funções (RODRIGUEZ-SANCHEZ, 2016).

Os ritmos são gerados por osciladores internos, sincronizados ao ambiente pela presença ou ausência de luz. A variação de iluminação dentro de 24 horas é considerada o maior arrastador capaz de sincronizar os ritmos circadianos ao claro/escuro ambiental (TAKAHASHI & ZATZ, 1982; VITATERNA et al. 1999). No entanto, ritmos circadianos não são só reações aos ciclos claro/escuro ambiental, sua natureza endógena e inata permite a persistência de ritmos mesmo em ambientes com variáveis constantes, como no caso de animais expostos ao escuro constante (KENNAWAY, 2005; CAMBRAS et al. 1997; CANAL-CORRETGER et al. 2001).

Esse sistema de temporização circadiano é formado por processos moleculares envolvendo um sistema de loop de feedback de transcrição e tradução de importantes conjuntos de genes chamados *genes CLOCK* (FRANKEN & DIJK, 2009). Esses componentes moleculares representam um sistema de ritmicidade endógena que interage com sincronizadores ambientais, os Zeitgebers. De modo simplificado, esse loop se inicia com um feedback positivo, onde CLOCK e BMAL1 (Brain and Muscle Arnt-Like 1) heterodimerizam e iniciam a transcrição de genes alvo de Período (Per1, Per2 e Per3) e Criptocromo (Cry1 e Cry2). O feedback negativo é alcançado por heterodímeros PER:CRY que translocam de volta para o núcleo para reprimir sua própria transcrição, agindo no complexo CLOCK: BMAL1. A retroalimentação desse ciclo acontece quando os níveis de per e cry diminuem, causando a ativação de CLOCK e BMAL1 e, por consequência, mais transcrição de per e cry. (KO & TAKAHASHI, 2006; COX & TAKAHASHI, 2019).

No que se refere ao sistema de temporização de mamíferos, osciladores periféricos são regulados por um marcapasso central, chamado Núcleo Supraquiasmático (NSQ) (PITTENDRIGH, 1960; PANDA, HOGENESCH, & KAY, 2002). O NSQ são dois pequenos conjuntos de neurônios e células gliais (porção ventrolateral e porção dorsomedial), localizados na base do terceiro ventrículo sobre o quiasma óptico, na parte anterior do hipotálamo. A alternância de claro/escuro ambiental consiste na principal oscilação percebida por esse marcapasso, através de células especializadas na retina que transformam as ondas luminosas em sinais químicos que chegam as porções do NSQ pela via retino hipotalâmica e a via genículo-hipotalâmica (HASTING et. al., 2019; ACÚRCIO & RODRIGUES, 2009). Entretanto, o sistema de temporização circadiana de mamíferos é imaturo no momento do seu nascimento, completando seu desenvolvimento nas fases pós-natais. Pesquisas sobre o desenvolvimento de ritmos circadianos em roedores mostram que as oscilações de ritmo acontecem no NSQ durante a vida fetal, antes mesmo que a via retino-hipotalâmica inerva os núcleos. Além disso, uma forma única de comunicação materna coordena o marcapasso circadiano com o ambiente até que a prole possa responder à luz por meio de seus próprios olhos (BROOKS & CANAL, 2013; REPERT et al. 2013).

Sendo essencial para o funcionamento de várias funções no nosso corpo, o estudo de possíveis efeitos na desregulação desse sistema tem grande importância médica e no bem estar dos seres vivos (LIMA, & VARGAS, 2014; CAMPUZANO et. al., 1998). Estudos diversos com modelos animais relatam prejuízos no metabolismo, memória e transtornos de humor quando há desregulação dos ritmos circadianos (GIBSON, 2010). Estudos com humanos não são diferentes, Touitou (2016) relata problemas como perda de sono, fadiga, sonolência noturna e baixo desempenho acadêmico em jovens, associados ao uso excessivo de aparelhos eletrônicos, que demonstram adquirir efeitos nocivos no sono e regulação circadiana. Estudos apontam que o jet lag com duração de vários anos diminui o desempenho cognitivo das tripulações de voo em comparação com as tripulações de voo cruzando menos de três fusos horários (CHO et al. 2000). Em roedores, aquisição de memórias dependentes do hipocampo, como no labirinto aquático de Morris e no condicionamento contextual do medo, é maior durante a noite (HAUBER & BAREI, 2001; VALENTINUZZI et al. 2001).

Além disso, os sistemas circadianos modulam atenção, aprendizado, formação e aquisição de memória, diminuindo significativamente o desempenho da memória quando desreguladas (KIRSHNAN, & LYONS 2015; RUBY et. al., 2013). Um experimento feito com ratos Sprague-Dawley, mostrou que mudanças na iluminação (tanto em fases claras mais longas como em fases escuras mais longas) influenciam no comportamento de cuidado da genitora com seus filhotes, mais tarde afetando a emocionalidade e funcionamento da memória da prole (TOKI et. al., 2007). Com o desenvolvimento de circuitos cerebrais até a adolescência, estudos com ratos mostram que esse momento do desenvolvimento é de grandes mudanças em certas partes do cérebro, como córtex e amígdala, estruturas associadas à memória de reconhecimento e memória aversiva (CRESSMAN et al., 2010; JURASKA & WILLING, 2017)

Uma das várias formas de investigar o efeito da dessincronização circadiana é através da utilização de modelos animais submetidos a protocolos de iluminação diferentes de 24h. No presente estudo o modelo T22 foi utilizado, sendo este capaz de causar dissociação das duas porções do NSQ que pode ser detectado no padrão de atividade locomotora, que passa a exibir dois ritmos estáveis, um arrastado pelo claro/escuro ambiental de 22h e outro ritmo endógeno maior do que 24h (DE LA IGLESIA et. al., 2004; ARAÚJO, 2017; PEREIRA, 2017). Com o passar do tempo, esses ritmos se movem em atrasos e avanços de fase, nas quais o ritmo de 22h (sincronizado ao claro/escuro ambiental) pode ocorrer durante a fase escura do ciclo maior de 24h (ritmo endógeno), ou ocorrer na fase clara no ritmo de 24h. Os ritmos de atividade de 22h e maior que 24h estão correlacionados com oscilações independentes nos genes do relógio nas porções ventrolateral e dorsomedial do NSQ (KRISHNAN & LYONS, 2015).

Considerando-se as evidências relativas aos danos decorrentes da perturbação da ritmicidade circadiana nas funções cognitivas, o presente trabalho busca investigar os efeitos da dessincronização forçada em estágios iniciais da ontogenia na memória de ratos adultos.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Investigar os efeitos da dessincronização forçada da ritmicidade circadiana pelo protocolo T22 durante as fases da infância e adolescência sobre os parâmetros comportamentais associados à ritmicidade circadiana da atividade locomotora, memória e ansiedade de ratos *Wistar* adultos.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o ritmo circadiano da atividade locomotora de ratos adultos após submissão ao ciclo claro-escuro simétrico de duração de 22 h durante a infância ou adolescência;
- Avaliar os efeitos da exposição ao ciclo CE de 22 h na infância e adolescência sobre os seguintes aspectos de ratos adultos:
 - Comportamento do tipo ansioso
 - Desempenho na tarefa de reconhecimento de objetos novos (RON)
 - Desempenho na tarefa de reconhecimento espacial associativo (REA)

3. Materiais e Métodos

3.1. Animais

O experimento foi constituído de duas etapas, sendo realizado uma primeira etapa em 2018 (etapa 1) e uma segunda etapa em 2019 (etapa 2). Em que ratos *Wistars* adultos foram trazidos do biotério prof. Thomas George da UFPB, para o Biotério de Cronobiologia localizado no Laboratório de Estudos em Memória e Cognição (LEMCOG) UFPB. Biotério este, que possui um ambiente controlado, onde podemos monitorar padrões de atividade locomotora e alterar protocolos de luminosidade. Sendo assim, estes animais foram alocados em pares para que a reprodução e nascimento dos filhotes ocorresse dentro das cabines.

Na primeira e segunda etapa foram utilizados 5 e 4 casais de genitores, respectivamente. Após nascimento e desmame, 24 filhotes machos foram selecionados na primeira etapa e 16 filhotes na segunda. Os animais selecionados nas duas etapas foram alocados em gaiolas individuais, seguindo seus respectivos protocolos de luminosidade.

Visando acompanhar o estado de saúde dos animais foi realizado o monitoramento de peso, quantidade de água e alimento ingeridos, que foram oferecidos *ad libitum*. Além disso, foram realizadas observações visuais, se atentando a algumas características que podem indicar algo fora do comum, como pêlos eriçados, coloração do pêlo amarelada e presença de feridas (NEVES et al. 2013). Todos os procedimentos do experimento foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal da Paraíba, no. 047/2017.

3.1.1 Critério de exclusão

Na etapa 1, um dos animais do Grupo Controle teve problemas de saúde, identificados pela inspeção visual, e teve que ser sacrificado antes da realização dos testes. Os demais fatores que determinaram a exclusão de animais foram defeitos nos sensores causando a impossibilidade de captação e análise da ritmicidade locomotora, ocorrendo em 2 animais (um no Grupo Adolescência D da Etapa 1 e um no Grupo Controle da Etapa 2).

Outro critério utilizado foi a não dissociação do ritmo circadiano da atividade locomotora em dois componentes rítmicos. Sendo assim, a amostra final contou com 36 animais.

3.2. Condições de manutenção

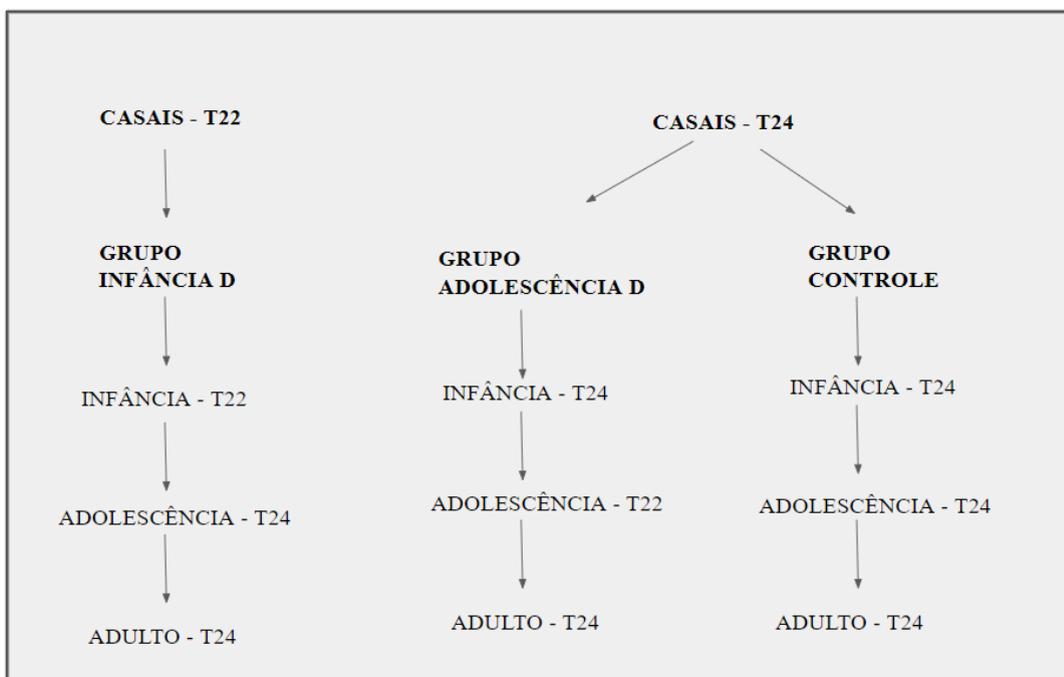
O biotério ficava com temperatura em média $23^{\circ}\text{C} \pm 2$ e umidade em torno de 50%, além de possuir atenuação acústica. Fazíamos medições e registros diários de temperatura e umidade com a ajuda de um termômetro digital, a fim de mantê-las nesse padrão. Os ratos, por sua vez, foram alocados dentro de gaiolas de propileno (40 x 32 x 17 cm) situadas em grandes cabines de madeira que possuem quatro compartimentos, como podemos observar na figura 1A. Cada cabine era iluminada por duas fitas LED de luz branca, medindo 1,5 metros e emitindo em média 150 lux dentro das cabines na fase clara e 0 lux na fase escura. A cabine possui ainda um cooler para circulação do ar e um sensor de movimento acoplado a um Sistema de Acionamento Programado (SAP) desenvolvido na Universidade Federal do Rio Grande do Norte, programa este desenvolvido pelo Laboratório de Neurobiologia e Ritmicidade Biológica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, para registro de atividade locomotora, que era realizada diariamente em intervalos de 5 minutos. Por esse mesmo sistema foi possível alterar o ciclo claro e escuro, permitindo aplicar o protocolo T22 (11h claro/11h escuro) e retornar ao T24 (12h claro/12h escuro) no fim de cada fase, para os grupos experimentais (Infância D e Adolescência D) ou manter o T24 durante todas as fases do experimento no grupo controle. Na figura 1B é possível ver o sensor de movimento que fica bem acima da gaiola



Figura 1. **A.** cabines de madeira. **B.** Gaiolas com ração e garrafa com água dentro das divisões individuais da cabine de madeira. Sensor de movimento e iluminação LED acima da gaiola.

3.3. Procedimentos metodológicos

Os casais genitores, nas duas etapas, foram divididos em dois grupos: casal genitor em T22, que deu origem ao grupo Infância D, e casal genitor em T24, que deu origem aos grupos Adolescência D e grupo Controle. O grupo Controle permaneceu em T24 durante todo o experimento. Já o grupo Infância D, passou as fases que compreendem o pareamento e lactação em T22 e o grupo Adolescência D foi submetido ao T22 somente na fase que compreende a adolescência (Fluxograma 1).



Fluxograma 1. Fluxograma dos grupos experimentais (Infância D, Adolescência D e Grupo Controle) e condições luminosas em cada fase de desenvolvimento dos animais (pareamento, infância, adolescência e vida adulta).

Os procedimentos metodológicos, nas duas etapas, começam desde a chegada dos ratos genitores, passando por eventos como: a inversão de ciclo, reprodução destes e

primeiro estágio de mudança de protocolo de iluminação em um dos casais (infância D); desmame dos filhotes, onde ocorre mais uma mudança na iluminação, desta vez nos dois grupos experimentais (introdução do T24 no grupo Infância D e começo do T22 no grupo Adolescência D); retorno do grupo Adolescência D ao protocolo T24; realização das tarefas comportamentais até o último dia de experimento, onde os animais foram sacrificados e o tecido cerebral colhido para análise. Nomeamos o dia 0 como o nascimento dos filhotes, pois os filhotes constituem os sujeitos experimentais deste estudo (figura 2).

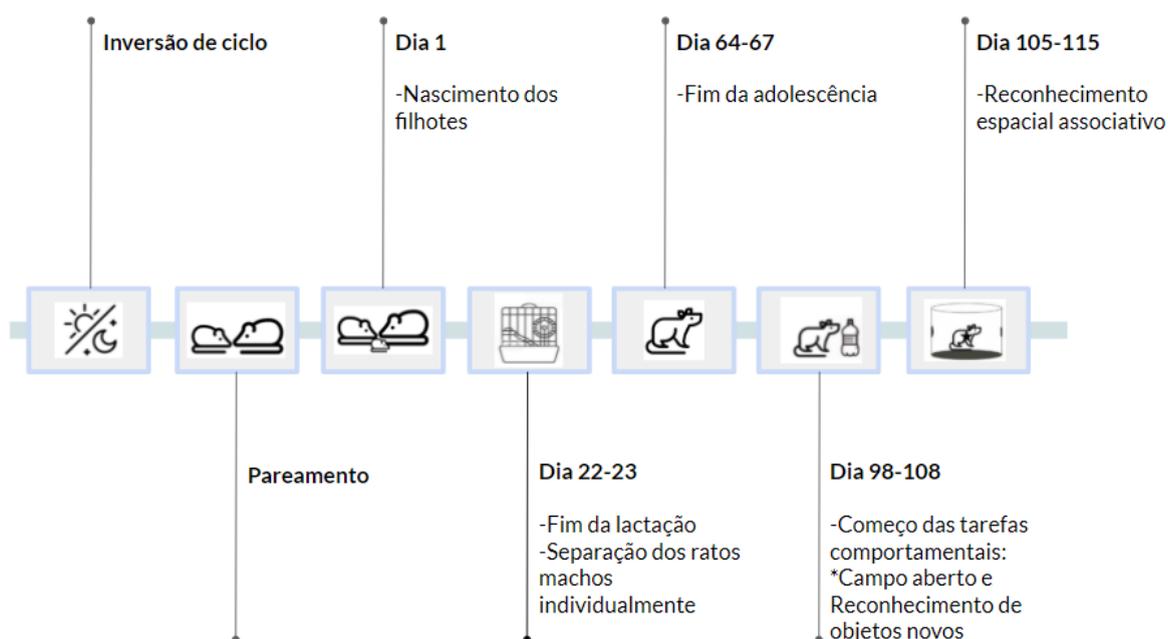


Figura 2. Linha do tempo mostrando uma descrição de cada procedimento e o dia experimental em que ocorreu.

3.3.1. Inversão de ciclo e reprodução

Ao chegarem ao biotério os ratos passaram por uma inversão de ciclo, dentro das cabines, que consistiu em mudar gradualmente o claro pelo escuro e vice-versa, que durou aproximadamente duas semanas. Desse modo, foi possível um monitoramento de forma

mais cômoda conciliando os períodos ativos dos animais aos dos experimentadores, visto que ratos têm hábitos noturnos, permitindo que fossem realizados procedimentos com os animais nas fases ativas deles. Portanto, ao fim da mudança de ciclo, dentro das cabines a fase clara se iniciava às 19 horas acabando as 7 horas, onde a fase escura começava.

Quando o ciclo já estava invertido, os animais foram colocados em pares, para que ocorresse a reprodução. Nesse caso, três casais (dois da primeira etapa e um da segunda etapa), foram submetidos ao T22, para que a gestação e nascimento dos filhotes ocorresse no protocolo de dessincronização no grupo Infância D. Seis casais permaneceram em T24 (três na primeira e três na segunda etapa), dando origem aos animais dos grupos Controle e Adolescência D.

3.3.2. Protocolo de dessincronização forçada - Modelo T22

Após 22 dias do nascimento dos filhotes, realizamos o processo de desmame, separando assim, os filhotes de suas genitoras e alocando-os individualmente. Ao todo, na primeira e segunda etapa, foram utilizados 9 casais de genitores e 40 ratos machos, que foram separados da seguinte forma:

- Grupo controle: Onde os animais ficaram em T24 (12h de claro e 12h de escuro) por todo o experimento. 16 animais pertenciam a este grupo (8 animais na etapa 1 e 8 na etapa 2).
- Grupo experimental T22 Dessincronizado na infância (ID): Para este grupo o T22 foi introduzido desde o pareamento, para que o nascimento dos filhotes ocorresse sob este protocolo, durando até o dia do desmame, que compreende a fase de infância destes animais. Posteriormente ficaram sobre o protocolo T24 até o fim do experimento. 12 animais (8 na etapa 1 e 4 na etapa 2) passaram por este protocolo.
- Grupo experimental T22 Dessincronizado na adolescência (AD): Onde 10 animais (8 na etapa 1 e 4 na etapa 2) nasceram em T24 e permaneceram até o desmame nessa condição luminosa. No período que compreende a adolescência, esses animais foram expostos ao T22, retornando ao T24 após, aproximadamente, 64 dias depois do nascimento, permanecendo assim até a vida adulta.

3.4. Testes comportamentais

A respeito das tarefas comportamentais, os animais foram submetidos a 5 testes, com uma semana entre suas realizações, são eles: campo aberto (CA), reconhecimento de objetos novos (RON), reconhecimento espacial associativo (REA), preferência à sacarose (PS) e esquiva passiva (EP). As tarefas foram realizadas nessa ordem, do teste menos aversivo para o mais aversivo, ficando a esquiva passiva por último para não haver nenhum tipo de influência sobre os outros testes, como traumas ou estresse por envolver uma pequena descarga elétrica. No presente estudo daremos enfoque na tarefa de Campo aberto e nas tarefas de memória, sendo elas: ; Tarefa de reconhecimento de objetos novos e tarefa de reconhecimento espacial associativo.

Para estes testes os animais eram levados à sala de comportamento no LEMCOG. Sala esta que contava com um ambiente preparado para os testes onde a temperatura e umidade eram controlados por meio de ar-condicionado em 24 °C e o lux variava entre 5-7. Os testes foram realizados no meio da fase ativa dos animais (entre 10h e 16h), sendo os ratos levados com meia hora de antecedência, a fim de que se habituassem ao local, também era ligado um ruído branco , que permanecia durante as tarefas, para minimizar interferência de ruídos externos. As tarefas foram gravadas por meio de uma webcam, localizada acima do campo, conectada a um computador. Outro procedimento muito importante ao fim de cada sessão era limpar o aparato (campo) ou objetos usados no RON e REA com álcool a 5% para minimizar pistas olfativas entre os animais. Ao fim do experimento, objetos e campo eram limpos com álcool a 70%.

3.4.1. Campo aberto

A tarefa de campo aberto consiste na habituação ao campo aberto, sendo essa a primeira vez que o animal entrou em contato com o ambiente das tarefas. O aparato para realização desse teste consistiu em uma arena circular, medindo 60 cm de diâmetro e 40 cm de altura, revestida com cartolina preta, a fim de impedir que o animal tivesse contato visual com possíveis pistas espaciais. Nessa tarefa, as variáveis avaliadas foram a o padrão da atividade motora (tempo em que o rato passava no centro do campo e na zona de periferia, velocidade média e distância total percorrida) e o "rearing", a fim de medir

comportamentos tipo ansiosos nesses animais. Os animais passaram 10 minutos livres para exploração, dentro do campo (Pereira, 2017), sendo monitorados e gravados por meio de webcam.

3.4.2. Rearing

Além das tarefas de memória, analisamos o comportamento de rearing (Fig. 3) nos seguintes momentos: tarefa de campo aberto, amostra e testes de REA e amostra e teste de RON. O primeiro momento se deu na tarefa de campo aberto onde o animal foi apresentado ao campo pela primeira vez, livre para explorar, durante 10 minutos. Os demais momentos analisados, aconteceram durante as tarefas de memória, mais precisamente nas sessões de amostra e teste das tarefas de RON e REA, tendo 5 minutos de duração cada. Quando o animal é exposto a um ambiente que não está acostumado, uma série de comportamentos podem ser observados, dentre eles o rearing (LEVER, 2006), com objetivo de mapear tal local, sendo indispensável para o bem estar do animal, aprendendo sobre o local que se encontra, e detecção de possíveis ameaças (ALBERT et al. 2018).

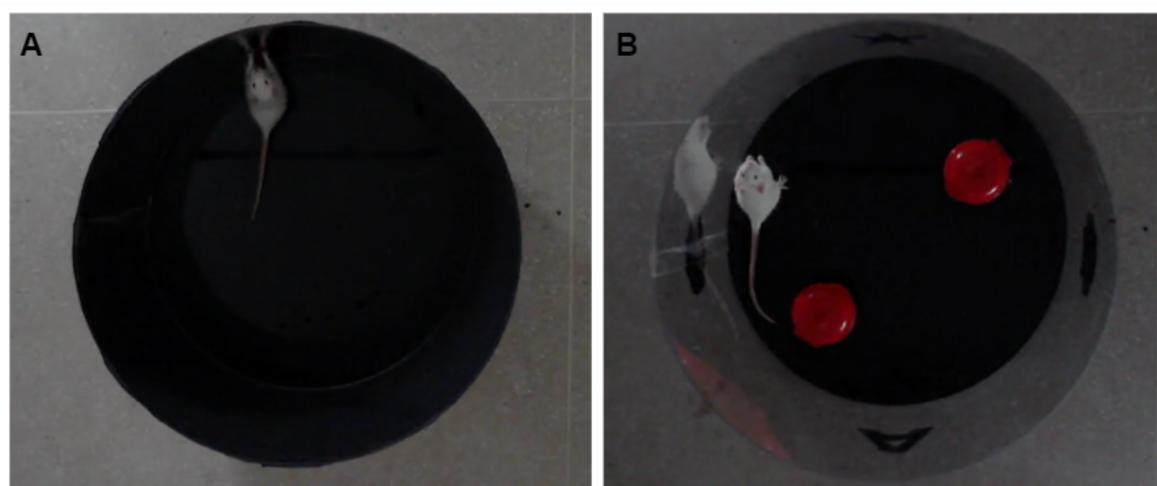


Figura 3. Comportamento de rearing. **A.** Rearing apoiado na tarefa de campo aberto, primeira vez que o animal entra no campo. **B.** Rearing sem apoio na sessão de teste da tarefa REA, última vez que o animal entra no campo.

3.4.3. Tarefa de reconhecimento de objetos novos (RON)

Em 1988, Ennaceur e Delacour, descreveram esse teste pela primeira vez, e até hoje é amplamente usado para avaliar memória. Para realizar esta tarefa o animal passou por quatro sessões, em um campo circular de acrílico coberto por uma cartolina preta para eliminar todas as pistas visuais. Há duas sessões de habituação, (figura 4A e 4B). A terceira sessão consiste em apresentar ao animal dois objetos iguais durante 5 minutos, a fim de que ele explore e se familiarize com os objetos (figura 4C). A quarta é o teste, onde utilizamos o parâmetro de exploração de objetos para avaliar a memória, sendo assim um novo objeto toma o lugar de um dos anteriores, durante 5 minutos o rato é livre para explorá-los (figura 4D). Cada sessão tem um intervalo de 30 minutos. Neste teste a memória de reconhecimento é efetiva quando o rato explora mais o objeto novo, isso se dá por uma tendência natural de roedores a serem atraídos por essa novidade (ENNACEUR, 2010).

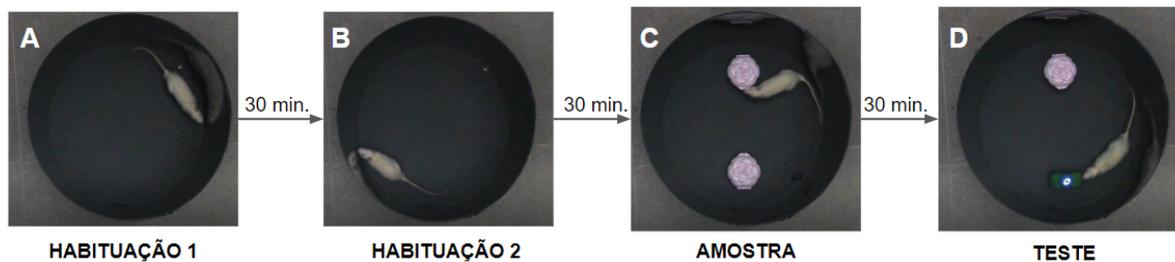


Figura 4. Fluxograma da atividade de reconhecimento de objetos. **A.** Primeira sessão, habituação 1. **B.** Segunda sessão habituação 2. **C.** Sessão de amostra. **D.** Sessão de teste.

3.4.4. Tarefa de reconhecimento espacial associativo (REA)

No teste REA, o campo de acrílico não é mais coberto por cartolina, agora são apresentadas pistas proximais e distais coladas nas paredes do campo e da sala de comportamento, permitindo assim, que o animal pudesse se localizar espacialmente (figura 5). Este teste ocorre da seguinte forma: Há duas sessões de habituação, (figura 6A e 6B), posteriormente, a sessão de amostra contendo dois objetos diferentes (figura 6C) e por último a sessão de teste, onde são apresentados dois objetos iguais a um dos objetos

anteriores e nas mesmas posições (figura 6D). Se houver a memória espacial associativa, o animal irá explorar mais o objeto que, apesar de ser familiar, está localizado no mesmo local do objeto diferente na sessão de amostra, isso acontece pois o animal é capaz de relacionar o objeto e local (EACOTT & NORMAN, 2014; LANGSTON & WOOD, 2010).

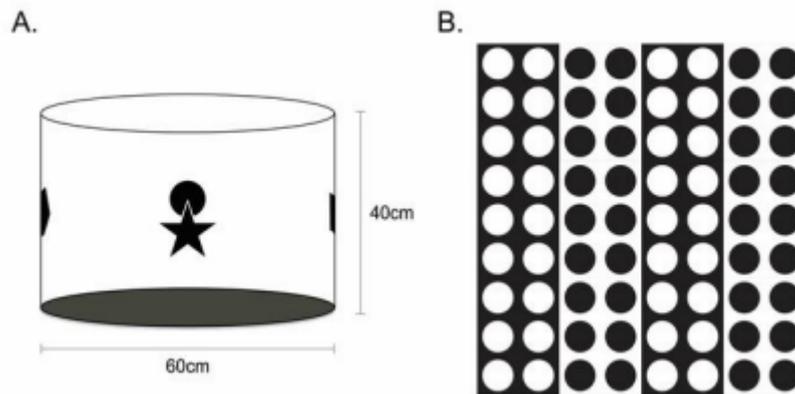


Figura 5. A. Ilustração do campo com pistas proximais. B. Exemplo de pista distal.

Da mesma forma que o teste anterior, as habituações duraram 10 minutos cada e a amostra e teste 5 minutos cada, com intervalo de 30 minutos entre as sessões (figura 5).

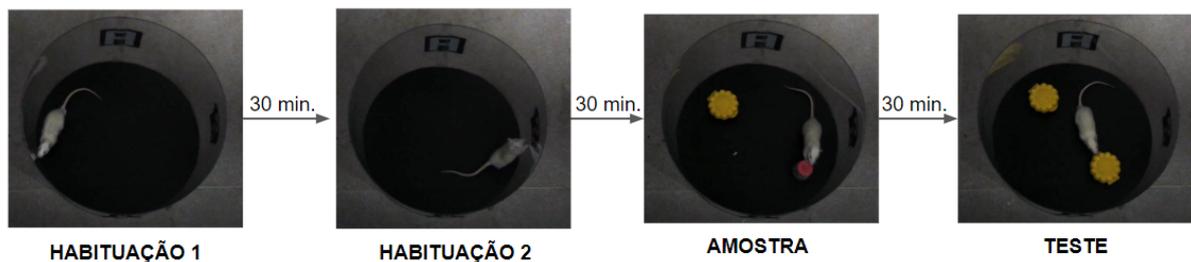


Figura 6. Fluxograma da Tarefa de Reconhecimento Espacial Associativo. A. Primeira sessão, habituação 1. B. Segunda sessão habituação 2. C. Sessão de amostra. D. Sessão de teste.

4. Análise de dados

4.1. Atividade locomotora

Sensores de movimento coletavam a atividade locomotora a cada 5 minutos, de cada animal, que foi monitorada ao longo do experimento através de actogramas e periodogramas (periodograma Sokolove-Bushell). Com isso foi possível observar a ritmicidade circadiana da atividade locomotora de cada animal por meio do programa El Temps (Antoni Díez-Noguera, Universitat de Barcelona, <http://www.el-temps.com>).

4.2. Tarefas comportamentais

Na análise de campo aberto as variáveis foram: tempo no centro e na periferia, velocidade e distância total percorrida dentro do campo.

Para a tarefa de RON, as variáveis dependentes foram, o tempo de exploração, frequência de exploração e latência para exploração do objeto novo e antigo e para REA o tempo de exploração, frequência de exploração e latência para exploração do objeto deslocado e não deslocado. Foi considerado exploração quando o animal se aproximou do objeto com focinho, vibrissas ou patas, sendo desconsiderado a ação de usar o objeto como apoio para exploração do ambiente ou quando o animal ficava imóvel em frente ao objeto (ARAÚJO, 2017; CECHELLA *et. al.*, 2014).

Foi utilizado na análise, o tempo de exploração, frequência de exploração e latência para exploração de cada objeto na sessão de amostra e teste, contabilizada através do software Ethowatcher. Além disso, foram analisadas as durações na exploração de cada objeto, tanto na amostra como no teste das tarefas RON e REA. Essas durações foram transformadas em taxas de exploração, para cada objeto, que variam entre 0 e 1, para realizar a padronização dos dados. Essa taxa foi calculada da seguinte forma: duração de exploração do objeto novo(A) ou objeto antigo (B), dividido pela soma da exploração do objeto novo(A) com a exploração do objeto antigo(B), para o teste RON (A ou $B / A+B$). Para REA foi realizado o mesmo cálculo (A ou $B / A+B$), sendo: duração de exploração do objeto deslocado (A) ou objeto não deslocado (B), dividido pela soma da exploração do

objeto deslocado (A) com a exploração do objeto não deslocado (B). Animais que exploraram somente um objeto ou não exploraram nenhum, foram excluídos. Foram analisados, na tarefa RON e REA, 36 animais: 14 controles, 12 do grupo Infância D e 10 Adolescência D.

Para análise de rearing, ato de explorar o ambiente apoiado nas patas dianteiras, seja apoiado à parede do campo ou livre de apoio (LEVER, 2006), as variáveis dependentes foram: total de exploração, frequência de exploração e latência para exploração. Essas análises foram feitas nas tarefas de campo aberto, amostra e teste de RON e amostra e teste de REA com comparações entre grupos em cada momento.

5. Resultados

5.1. Ritmicidade da atividade locomotora

A análise da ritmicidade da atividade locomotora foi feita através da confecção e examinação de actogramas, confeccionados através do programa El Temps, visando acompanhar efeitos do protocolo de iluminação na movimentação dos animais e possíveis falhas no sistema e quedas de energia. Para análise quantitativa de dados da ritmicidade circadiana da atividade locomotora, foram feitos periodogramas de cada fase (pareamento, infância, adolescência e vida adulta) para cada animal, sendo possível a extração dos dados de período (T) e o percentual de variância explicada pelo ritmo (%V), posteriormente através do software SPSS foi possível uma análise descritiva (média e desvio padrão).

Os actogramas foram feitos para cada grupo experimental (Controle, Infância D e Adolescência D) com todos os dias do experimento, aproximadamente 150 dias. Sendo escolhidos alguns animais representativos para exibição em cada fase, de forma aleatória.

5.1.1 Grupo Controle

Começando com o grupo controle, os animais foram mantidos em T24 (12h claro/12h escuro) durante todo o experimento, com ritmos de atividade locomotora sincronizados ao ciclo claro/escuro ambiental, com picos de atividade em 1440 e sendo visualmente a fase ativa concentrada no escuro, visto que esses animais possuem hábitos noturnos (Fig.7).

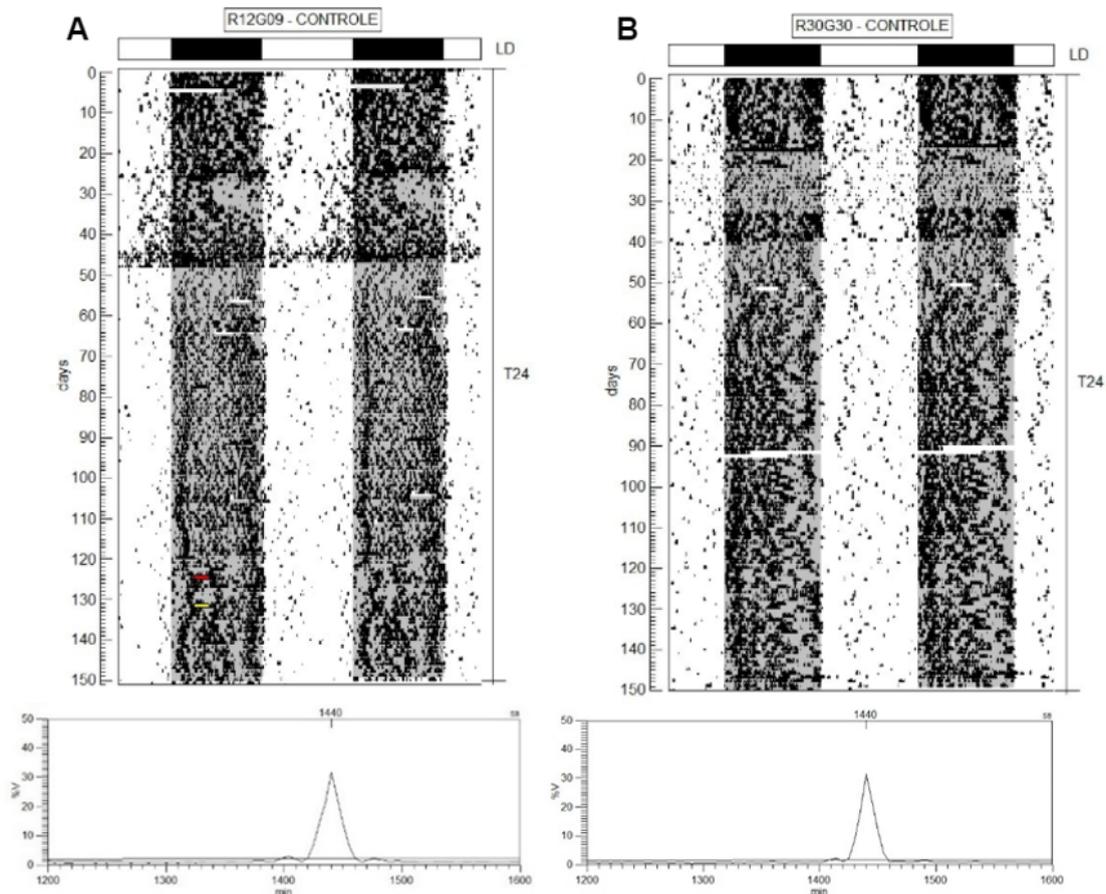


Figura 7. Actogramas e periodogramas dos animais que estavam mantidos em T24 (12h claro/12h escuro). Fase ativa concentrada no escuro e picos de atividade em 1440. **A.** Animal do grupo Controle da etapa 1. **B.** Animal do grupo Controle da etapa 2.

Na fase de pareamento, os casais que estavam no protocolo T24 e deram origem aos animais dos grupos controle de Adolescência D, tiveram ritmos com picos de 1440 e percentual de variância explicada pelo ritmo (%V) com média de $36,04 \pm 3,20$.

Na Infância os animais que estavam em T24 apresentaram período de 1440 com média de percentual de variância $19,04 \pm 5,11$ demonstrando estarem sincronizados ao ciclo claro/escuro de 24h, apesar de ter havido uma diminuição da média do percentual de variância explicada pelo ritmo em relação à fase de pareamento.

Grupo Controle apresentou ritmicidade da atividade locomotora com pico de 1440 e média de %V $22,26 \pm 3,74$, durante a fase de adolescência.

5.1.2. Grupo Dessincronizados na Infância (Infância D)

Os actogramas da fase de pareamento foram confeccionados separadamente, a fim de registrar a atividade locomotora dos animais genitores antes e durante a gravidez das ratas fêmeas. É possível observar animais em T22 (11h claro/ 11h escuro) que deram origem aos animais do grupo Infância D e animais em T24, que deram origem aos animais dos grupos Controle e Adolescência D (Fig. 8).

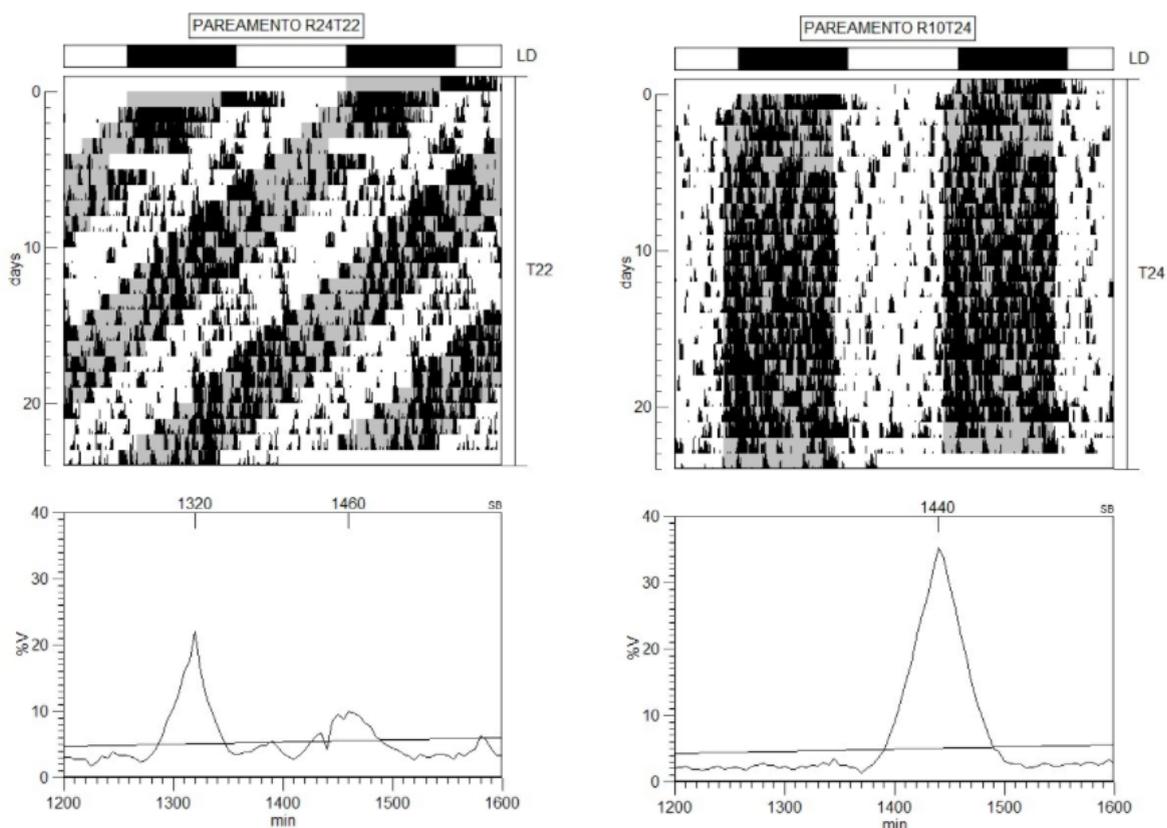


Figura 8. Actogramas e periodogramas dos animais genitores no momento do pareamento até o dia antes ao nascimento dos filhotes. **A.** Momento do pareamento de um dos casais genitores submetidos ao T22 na etapa 1. **B.** Momento do pareamento de um dos casais genitores do grupo submetido ao T24 na etapa 2.

Para confecção dos periodogramas da fase de pareamento, foi utilizado o primeiro dia pós-formação dos casais genitores, até o dia anterior ao nascimento dos filhotes, resultando em séries temporais entre 23 e 25 dias. Os casais que estavam sob o protocolo

T22, apresentaram um ritmo dissociado, ou seja, com um ritmo associado ao claro/escuro (CE) ambiental e outro associado ao ritmo endógeno. Ritmo sincronizado ao ciclo CE 1320, com média de percentual de variância $15,47 \pm 4,28$ e Ritmo Endógeno 1468,33 $\pm 10,40$ min, com média de percentual de variância $13,42 \pm 1,15$.

A fase de lactação foi considerada do dia seguinte ao nascimento até o dia anterior ao desmame, resultando em séries temporais de 20 e 21 dias, com a confecção dos actogramas nessa fase específica, visto que os animais ainda não tinham sido individualizados. Foi analisado o ritmo da mãe e os filhotes que estavam na mesma gaiola. A análise da atividade locomotora coletada nesta fase para o grupo em T22, apresentou uma fêmea e seus filhotes (etapa 1), com três componentes rítmicos no periodograma: ritmo sincronizado ao CE de 1320 com %V 12,19, ritmo de 1440 com %V= 10,34 e ritmo endógeno com período 1450 e %V 10,34. (Fig. 9).

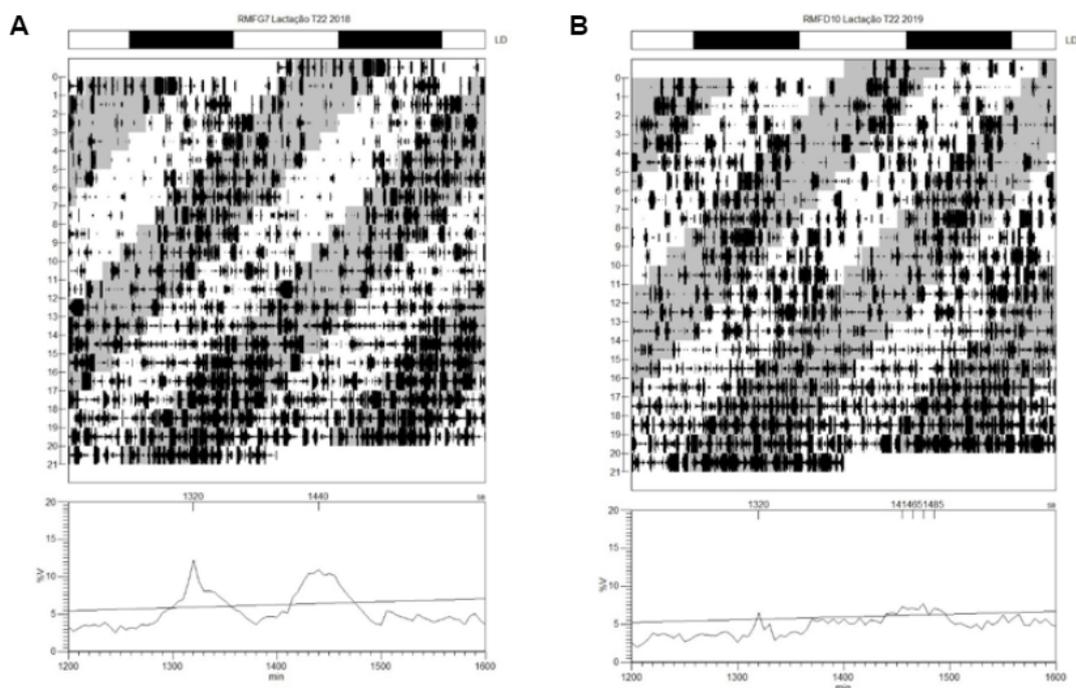


Figura 9. Actogramas e periodogramas dos animais que passaram pelo protocolo de iluminação T22 na fase de infância, passando para T24 e permanecendo nesse protocolo até o fim do experimento **A.** Actograma e periodograma de um animal que passou pelo T22 na infância durante a etapa 1. **B.** Actograma de um animal que passou pelo T22 na infância durante a etapa 2.

5.1.3. Grupo dessincronizado na Adolescência (Adolescência D)

Os actogramas dos animais na fase de Adolescência, mostrando a série temporal de todo o experimento, com a fase de pareamento e lactação de suas respectivas genitoras e ninhadas às quais pertenciam (Fig. 10A e 10B). Os periodogramas representam a fase temporal específica da dessincronização forçada pelo protocolo T22 (Fig. 10C e 10D). É possível observar que os animais estavam sincronizados ao claro/escuro ambiental antes de entrarem no T22, dissociando seus ritmos assim que entraram neste protocolo. Posteriormente, quando saíram do protocolo T22, voltaram a sincronizar o ritmo ao protocolo T24, 12h claro/12h escuro.

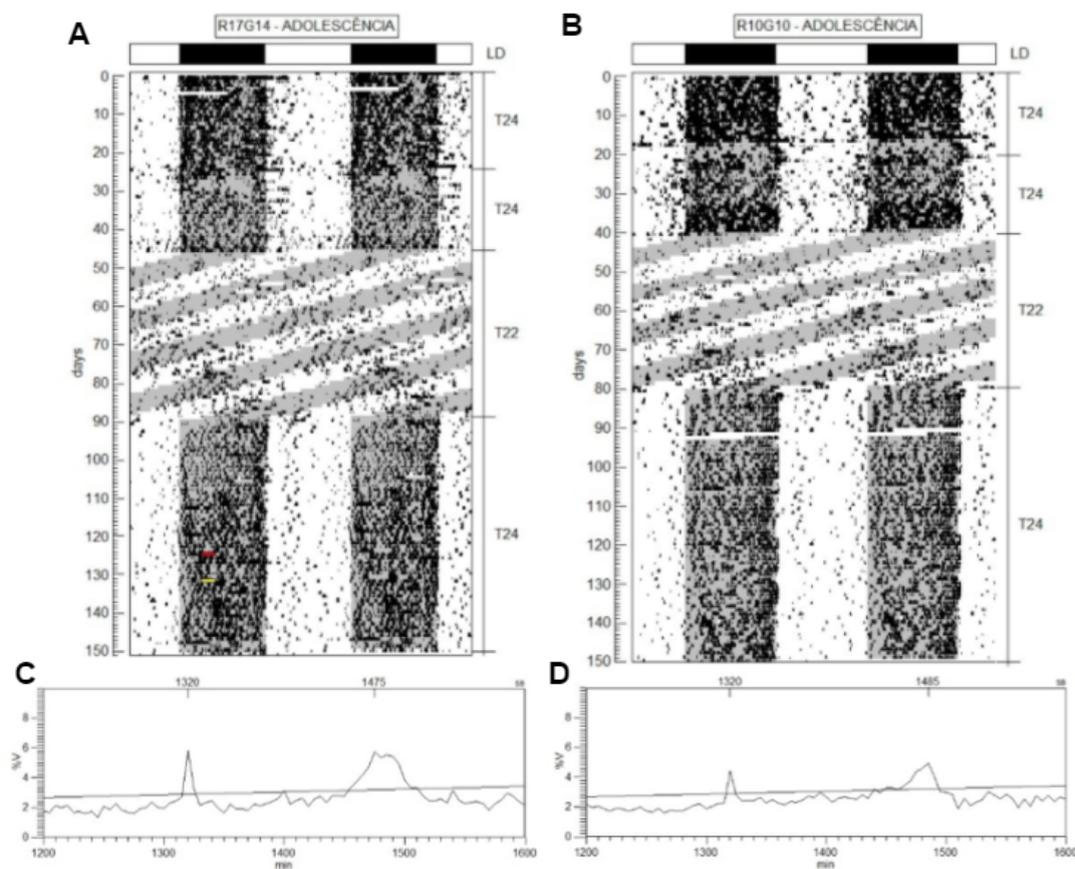


Figura 10. Actogramas e periodogramas dos animais que passaram pelo protocolo de iluminação T22 na fase de adolescência, passando para T24 e permanecendo nesse protocolo até o fim do experimento **A.** Actograma do animal representativo que passou pelo T22 na adolescência durante a etapa 1. **C.** Periodograma da fase específica de dessincronização (Adolescência) do animal representativo da etapa 1. **B.** Actograma do

animal representativo que passou pelo T22 na adolescência durante a etapa 2. **D.** Periodograma da fase específica de dessincronização (Adolescência) do animal representativo da etapa 2.

Essa fase começa a partir do dia do desmame, ou seja, o dia que os animais foram alocados em gaiolas individuais, com os animais do grupo Infância D, que antes estavam em T22, entrando no T24 e os animais que estavam em T24 divididos em grupo controle, que permaneceu em T24 e grupo Adolescência D, entrando em T22. Os animais do grupos Adolescência D apresentaram a dissociação do ritmo de atividade locomotora com um dos componentes sincronizado ao T22, que apresentou período 1320 e média %V $6,68 \pm 1,75$, enquanto para o ritmo endógeno obteve como média de Período $1484,5 \pm 15,53$, com média no %V $5,17 \pm 0,96$.

5.1.4. Fase adulta

Essa fase corresponde a aproximadamente o dia 63 após o nascimento, até o fim do experimento, com os animais de todos os grupos sincronizados ao ciclo claro/escuro 12h/12h. As séries temporais nessa fase possuem de 59 a 76 dias. Os actogramas representativos mostram a série temporal de todo o experimento, com a fase de pareamento e lactação de suas respectivas genitoras e ninhadas às quais pertenciam (Fig. 11 A, B e C). Os periodogramas representam a fase temporal específica da vida adulta onde todos os animais dos grupos experimentais foram resincronizados ao ciclo claro/escuro de 24h (Fig. 11 D, E e F). Em relação a variável percentual de variância explicada pelo ritmo, foi possível fazer a comparação entre grupos já que estes se encontravam todos sincronizados ao mesmo ciclo ambiental. Foi encontrada diferença entre os grupos [$F(2,33) = 4,711$, $p = 0,016$], após a realização do post-hoc para comparação entre pares, com correção de Bonferroni, as diferenças foram sinalizadas entre o grupo Infância D (média = 30,16) e o Grupo Controle (média = 36,34) ($p = 0,046$) e também entre o grupo Infância D (média = 30,16) e Adolescência (média = 37,38) ($p = 0,029$), demonstrando que o grupo Infância D apresentou uma menor estabilidade no ritmo em relação aos outros dois grupos.

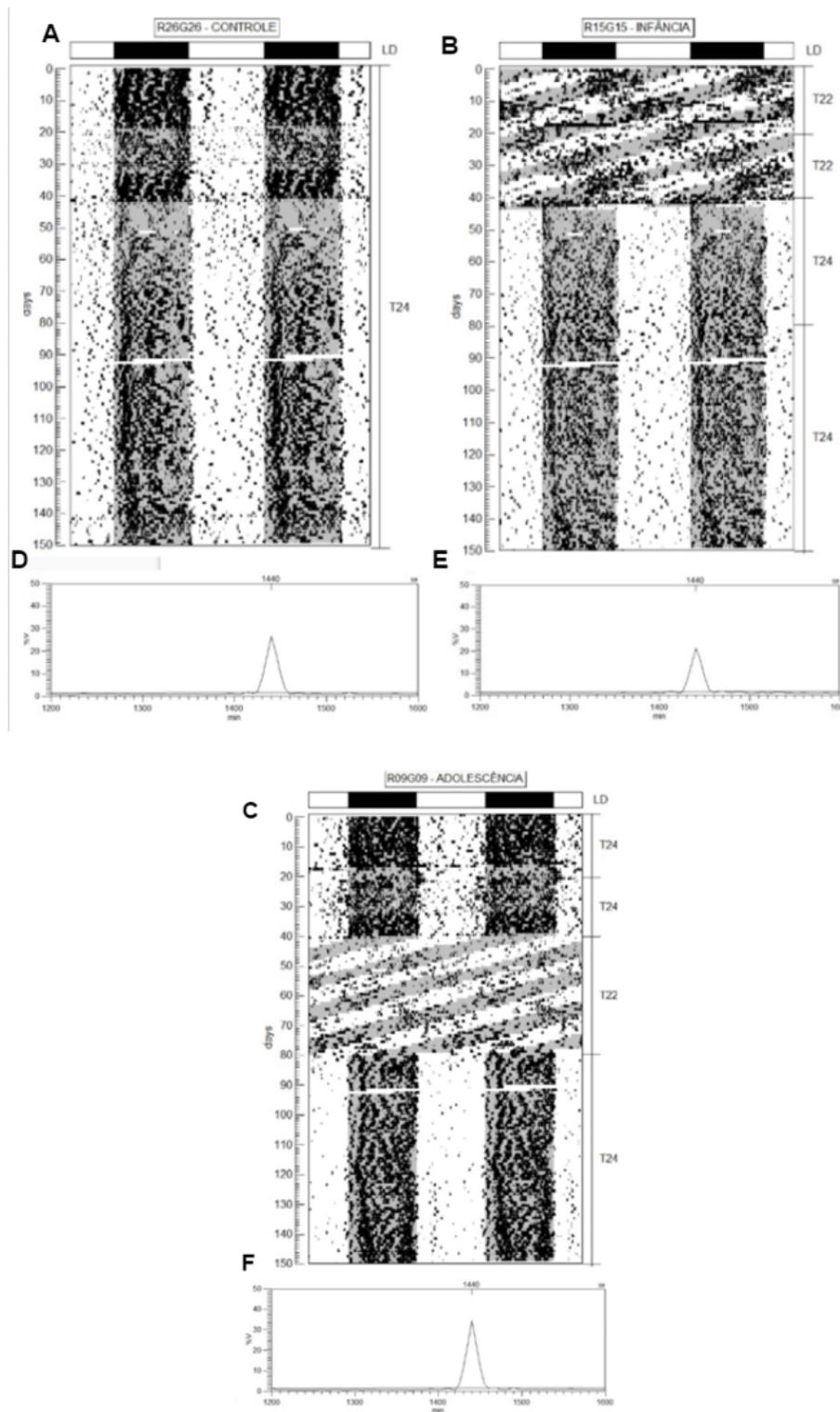


Figura 11. Actogramas e periodogramas dos animais que passaram pelo protocolo de iluminação T22 na fase de adolescência, passando para T24 e permanecendo nesse protocolo até o fim do experimento **A, B e C**. Actogramas dos animais representativos que

foram ressincronizados ao T24 na fase adulta. **D, E e F.** Periodogramas da fase de vida adulta dos três animais representativos mostrando o ritmo endógeno ressincronizado ao claro/escuro de 24h.

5.2. Campo aberto

Utilizando uma Anova de uma via, foi encontrado que o Tempo que os animais passaram no Centro do Campo não apresentou diferença entre os três grupos [$F(2,33)=0,401$, $p=0,673$]. De mesmo modo, a análise de Kruskal-Wallis de Amostras Independentes, nos mostra que também não houve diferenças estatisticamente significativas para as variáveis Tempo na Periferia $H(2)=1,602$, $p=0,449$; Distância Total Percorrida $H(2)=1,648$, $p=0,439$; e Velocidade Média $H(2)=1,437$, $p=0,487$.

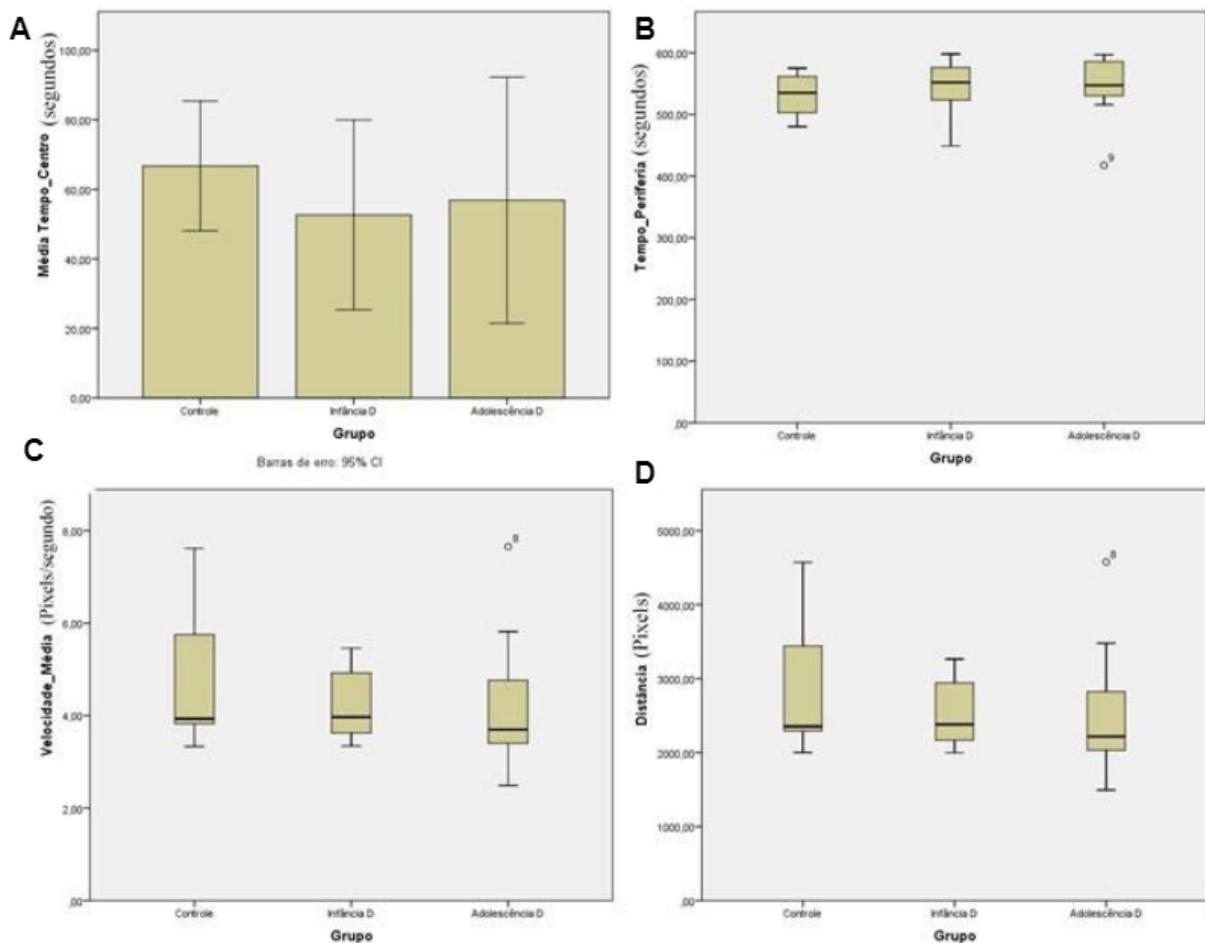


Figura 12. Gráficos com as médias dos dados das variáveis da atividade locomotora durante a tarefa de campo aberto para os grupos Controle, Infância D e Adolescência D: **A.** Média (em segundos) do tempo que os animais passaram no centro do aparato **B.** Média (em segundos) do tempo em que os animais estiveram na periferia do aparato **C.** Velocidade média (pixels/segundos) dos animais de cada grupo durante a tarefa **D.** Média da distância total percorrida (pixels) pelos animais de cada um dos grupos.

5.3. Rearing

5.3.1 Rearing na Tarefa de campo aberto

Foi realizado o teste de Kruskal-Wallis de Amostras Independentes a fim de comparar as variáveis duração de exploração e frequência para o Rearing apoiado e sem apoio entre os dos grupos. Para as variáveis total de duração apoiado $H(2)= 0,842$, $p=0,656$ e frequência do rearing apoiado $H(2)= 1,921$, $p=0,383$, não havendo diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Em relação ao Rearing sem apoio foi encontrada uma tendência para diferenças significativas entre os grupos, tanto para a variável duração $H(2)=5,309$, $p=0,07$, quanto para a variável frequência $H(2)= 5,789$, $p=0,055$. Nesse sentido o grupo Controle apresentou maior duração (Mdn= 32,70) e frequência (Mdn= 21) do rearing sem apoio, seguido pelo grupo Adolescência D com duração (Mdn= 13,73) e frequência (Mdn= 20), enquanto os menores valores de duração (Mdn= 11,66) e frequência (Mdn= 9,5) foram apresentados pelo grupo Infância D (Fig. 13).

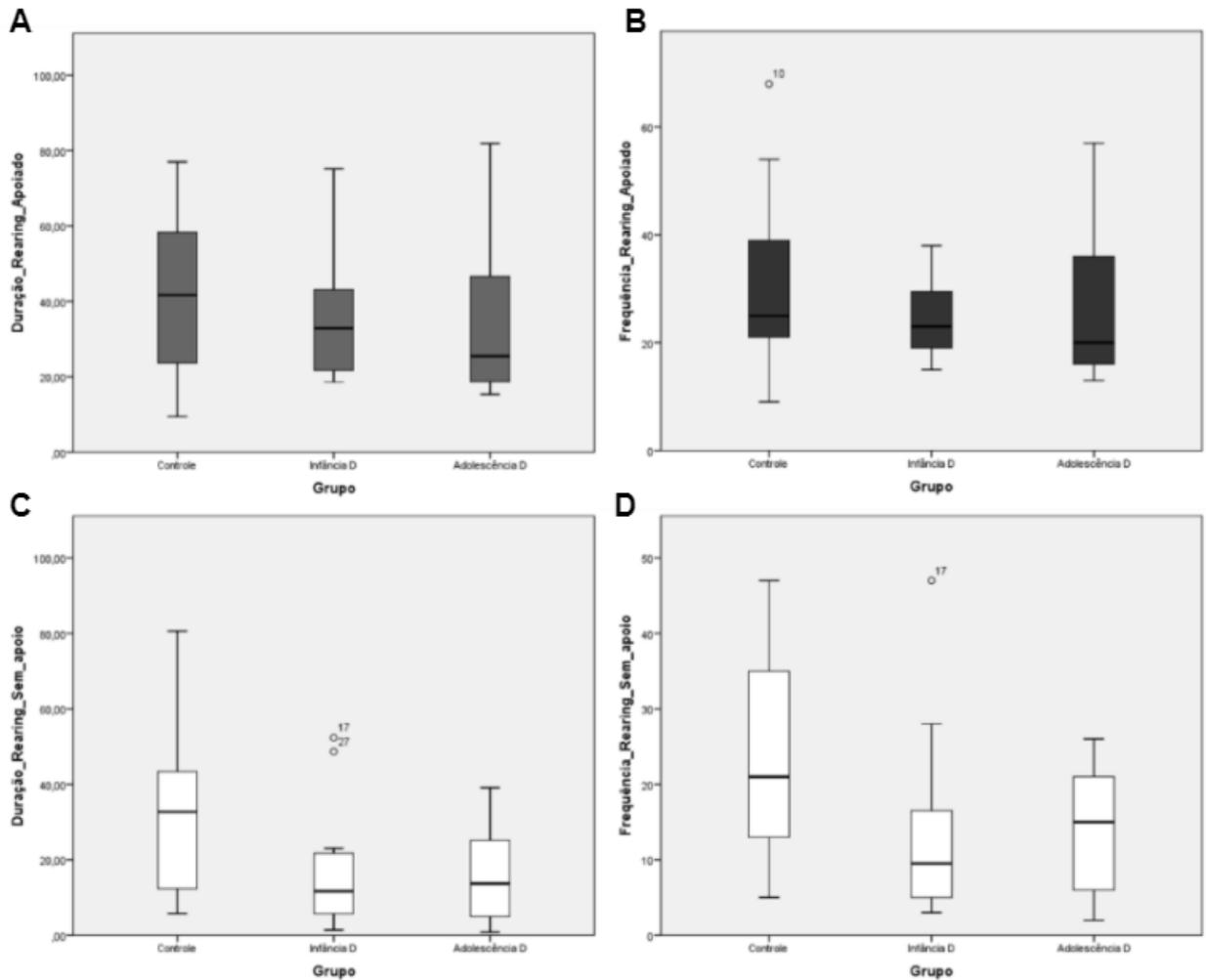


Figura 13. A. Média da duração em segundos do rearing apoiado na tarefa de Campo aberto B. Média da frequência de rearing apoiado C. Média da duração em segundos do rearing sem apoio D. Média da frequência do rearing sem apoio Controle, AD e ID.

5.3.2. Rearing Amostra RON

Na sessão de amostra da tarefa de reconhecimento de objetos novos foi realizado o teste de Kruskal-Wallis de Amostras Independentes a fim de comparar as variáveis duração, frequência e latência para o Rearing apoiado e sem apoio entre os grupos. Na variável duração do rearing apoiado, não houve diferença significativa entre grupos ($H(2) 1,523 p=0,467$) (Fig.14A). Já na variável duração do rearing sem apoio é

possível observar diferença estatisticamente significativa entre os grupos Adolescência D (Md=2,75) e controle (Md=4,55) com $p=0,044$ (Fig.14D).

Para variável Frequência de rearing apoiado não foi apresentado valor estatisticamente significativo entre os grupos $H(2)=2,758$ $p=0,252$ (Fig.14B). Na frequência de exploração de rearing sem apoio não é possível observar diferenças significativas entre os grupos com $H(2)=3,485$ $p=0,175$ (Fig.14E).

Em latência de rearing apoiado não houve diferença estatisticamente significativa $H(2)=1,363$ $P=0,506$ (Fig.14C). Entretanto, a respeito da latência de rearing sem apoio o grupo Adolescência D (Md= 28,88), realizou o rearing mais rapidamente do que os demais grupos: Infância D (122,63) e grupo controle (Md= 99,90). Sendo encontrado um valor estatisticamente significativo, tanto entre o grupo Adolescência D e Infância D ($p=0,033$), como entre os grupos Adolescência e controle ($p= 0,014$) (Fig.14F).

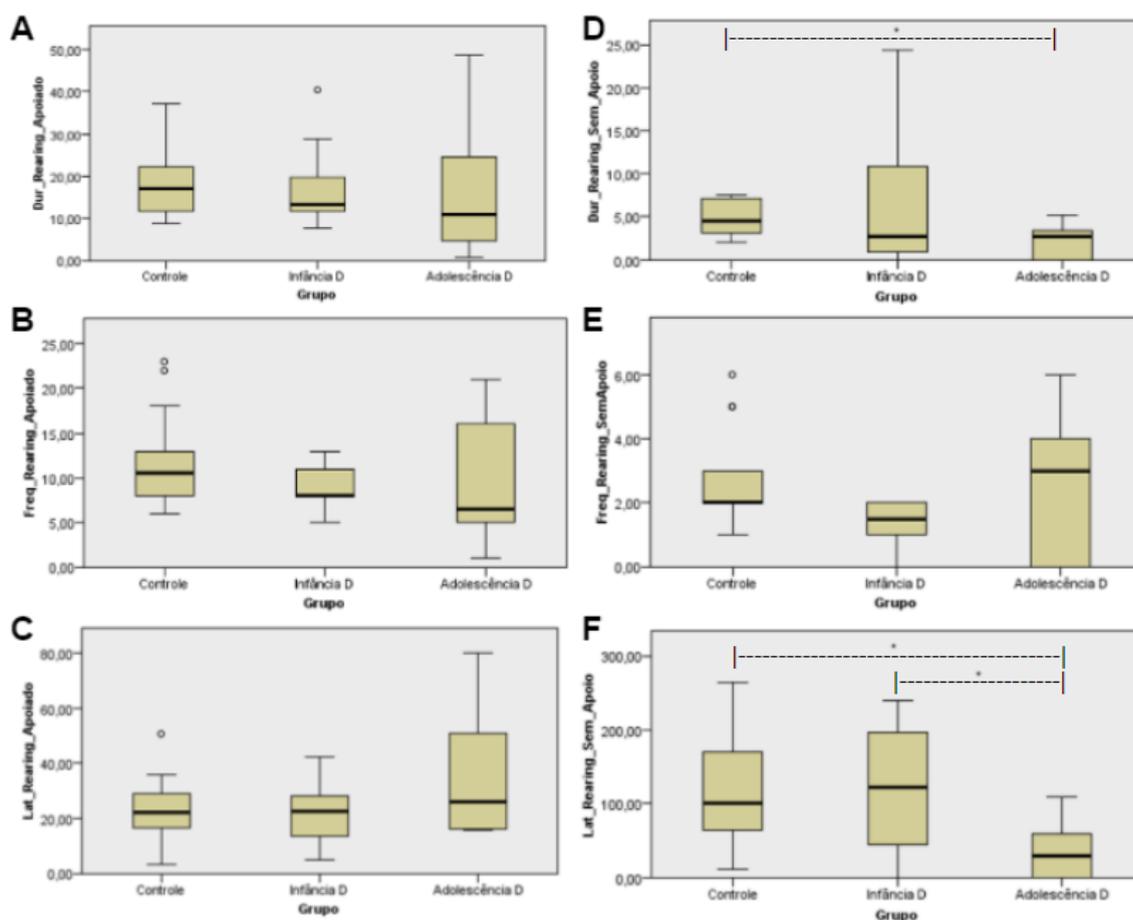


Figura 14. Média das variáveis de rearing na amostra da tarefa de reconhecimento de objetos novos. **A.** Duração de rearing apoiado. **B.** Frequência de rearing apoiado. **C.**

Latência rearing apoiado. **D.** Duração de rearing sem apoio. **E.** Frequência de rearing sem apoio. **F.** Latência rearing sem apoio.

5.3.3. Rearing Teste RON

Na sessão de teste da tarefa de reconhecimento de objetos novos foi realizado o teste de Kruskal-Wallis de Amostras Independentes a fim de comparar as variáveis duração, frequência e latência para o Rearing apoiado e sem apoio entre os grupos. Na variável duração do rearing apoiado não houve diferença significativa entre grupos ($H(2) = 1,360$ $p=0,507$) (Fig.15A). Da mesma forma, na variável duração de exploração do rearing sem apoio não houve diferenças significativas $H(2)=1,406$ $p=0,495$ (Fig.15D).

Para a variável frequência de exploração apoiado, não obtivemos diferenças significativas entre os grupos ($H(2)=0,840$ $p=0,657$) (Fig.15B). Na variável frequência de exploração sem apoio não houveram valores estatisticamente significativos $H(2)= 0,654$ $p=0,721$ (Fig.15E).

Na latência de rearing apoiado os grupos não obtiveram diferenças significativas entre eles $H(2)=3,281$ $P=0,194$ (Fig.15D). E na latência de rearing sem apoio os grupos não divergiram significativamente entre si, $H(2)=0,789$ $p=0,674$ (Fig.15F).

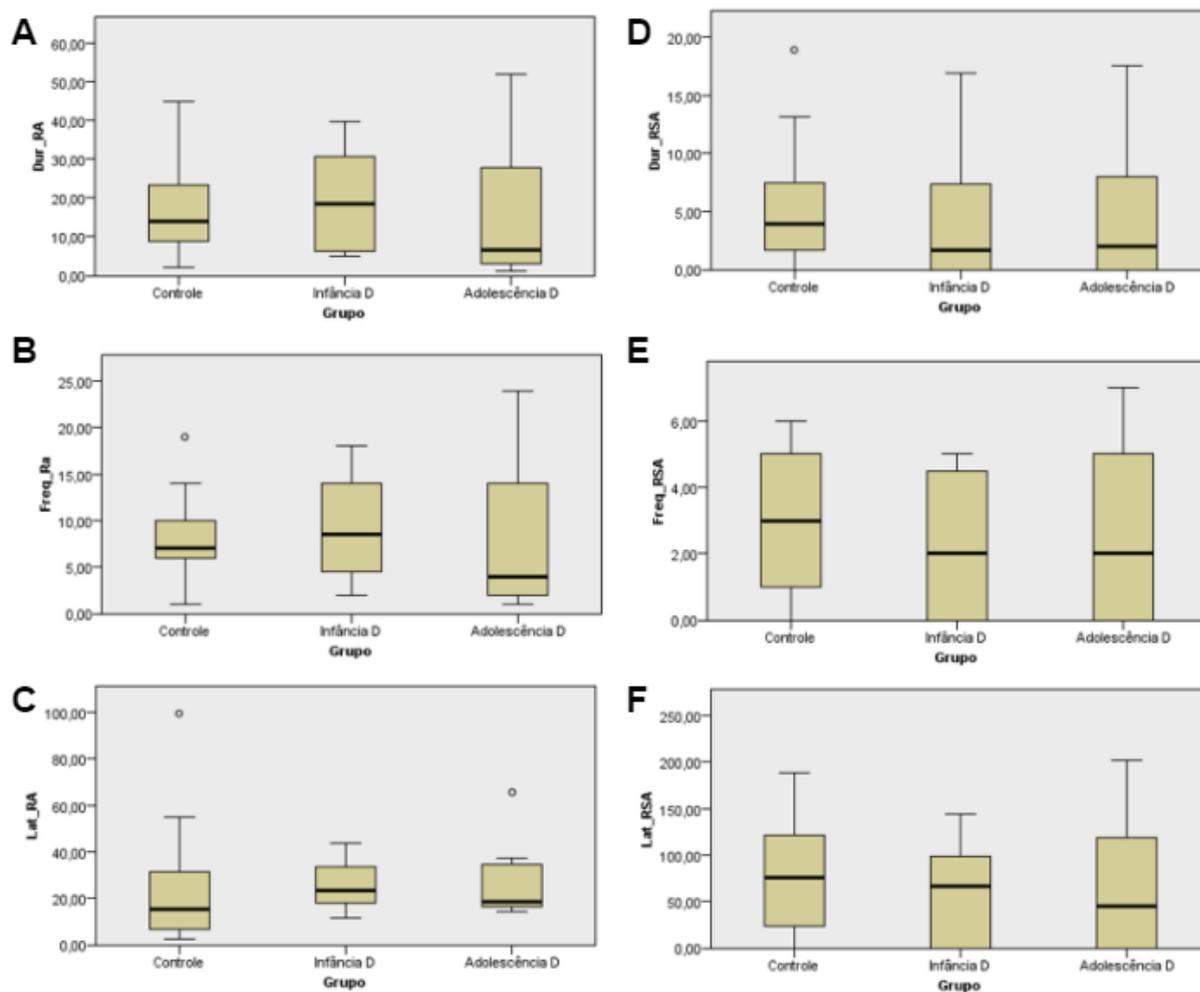


Figura 15. Média das variáveis de rearing no teste da tarefa de reconhecimento de objetos novos. **A.** Duração de rearing apoiado. **B.** Frequência de rearing apoiado. **C.** Latência rearing apoiado. **D.** Duração de rearing sem apoio. **E.** Frequência de rearing sem apoio. **F.** Latência rearing sem apoio.

5.3.4. Rearing Amostra REA

Para análises de rearing na amostra da tarefa de reconhecimento espacial associativo não encontramos diferenças estatisticamente significativas para nenhuma variável (duração, frequência e latência) em nenhuma das situações (apoiado e sem apoio).

Na variável duração do rearing apoiado foi feito um teste ANOVA, que mostrou não haver diferença significativa entre grupos [$F(2)=0,081$ $p=0,922$] (Fig. 16A). Já na

variável total de exploração do rearing sem apoio pelo teste Kruskal-Wallis de Amostras Independente não é possível observar diferenças estatisticamente significativas $H(2)=3,091$ $p=0,213$ (Fig.16D).

Para variável Frequência de exploração de rearing apoiado, foi feita uma ANOVA e não foi apresentando valor estatisticamente significativo entre os grupos [$F(2)=0,017$ $p=0,983$] (Fig. 16B). Na frequência de exploração de rearing sem apoio não é possível observar diferenças significativas no teste Kruskal-Wallis de Amostras Independente entre os grupos com $H(2)=5,173$ $p=0,075$ (Fig.16E).

Em latência de rearing apoiado o teste Kruskal-Wallis de Amostras Independente mostra que não houve diferença estatisticamente significativa $H(2)=4,525$ $p=0,104$ (Fig.16C). Na latência sem apoio não é possível observar uma diferença significativa ($H(2)=4,118$ $p=0,128$) entre os grupos (Fig.16F).

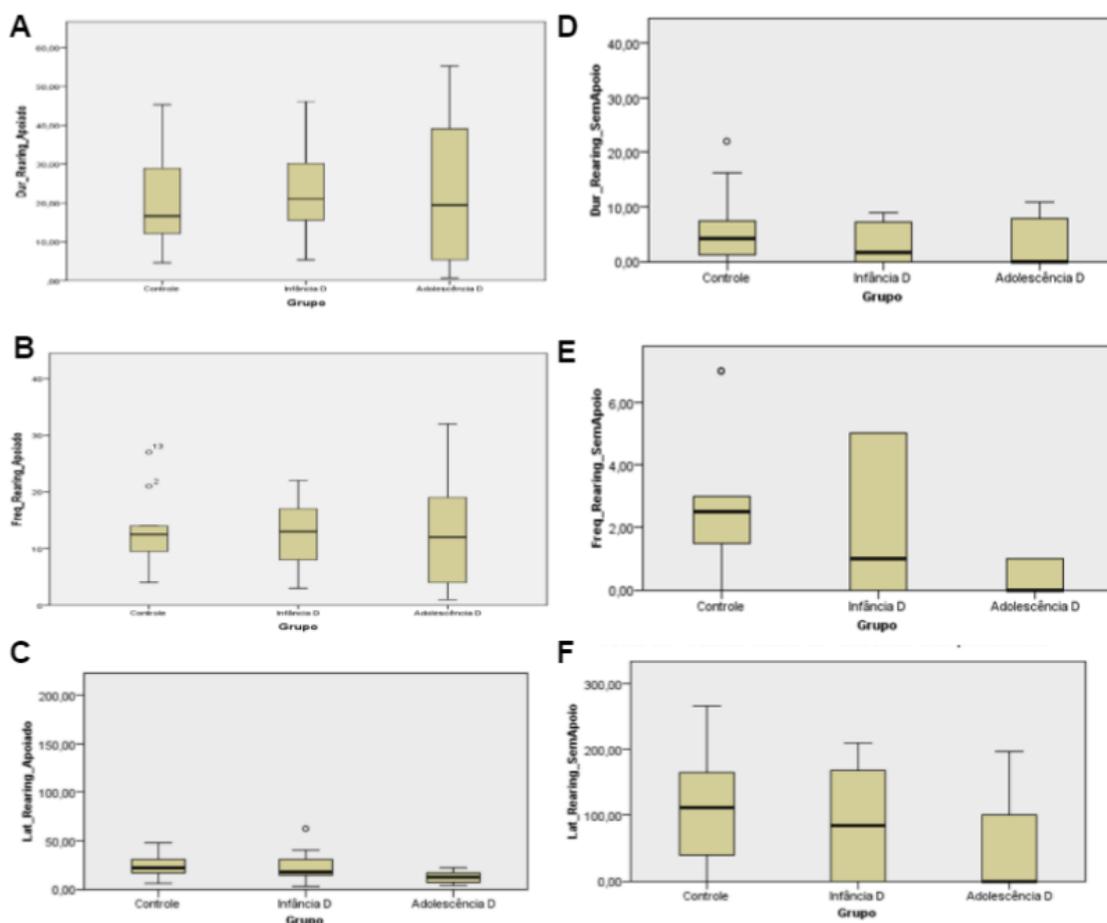


Figura 16. Média das variáveis de rearing na amostra da tarefa de reconhecimento espacial associativo. **A.** Duração de rearing apoiado. **B.** Frequência de rearing apoiado. **C.**

Latencia rearing apoiado. **D.** Duração de rearing sem apoio. **E.** Frequência de rearing sem apoio. **F.** Latencia rearing sem apoio.

5.3.5. Rearing Teste REA

Na variável duração de exploração do rearing apoiado foi feito um teste teste Kruskal-Wallis de Amostras Independente, não havendo diferenças estatisticamente significativas com $H(2)=1,039$ $p=0,595$ (Fig. 17A). Já na variável duração de exploração do rearing sem apoio os resultados não apresentaram diferenças significativas $H(2)=0,328$ $p=0,849$ (Fig. 17D).

Para variável Frequência de exploração de rearing apoiado, foi feita uma ANOVA e não foi apresentando valor estatisticamente significativo entre os grupos [$F(2)=0,077$ $p=0,926$] (Fig. 17B). Na frequência de exploração de rearing sem apoio não é possível observar diferenças significativas entre os grupos com $H(2)=0,701$ $p=0,704$ (Fig. 17E).

Em latência de rearing apoiado o teste Kruskal-Wallis de Amostras Independente mostra que não apresentou diferença estatisticamente significativa $H(2)=1,220$ $p=0,543$ (Fig. 17C). Na latência sem apoio foi realizado uma ANOVA e não é possível observar uma diferença significativa [$F(2)=0,85$ $p=0,919$] entre os grupos (Fig. 17F).

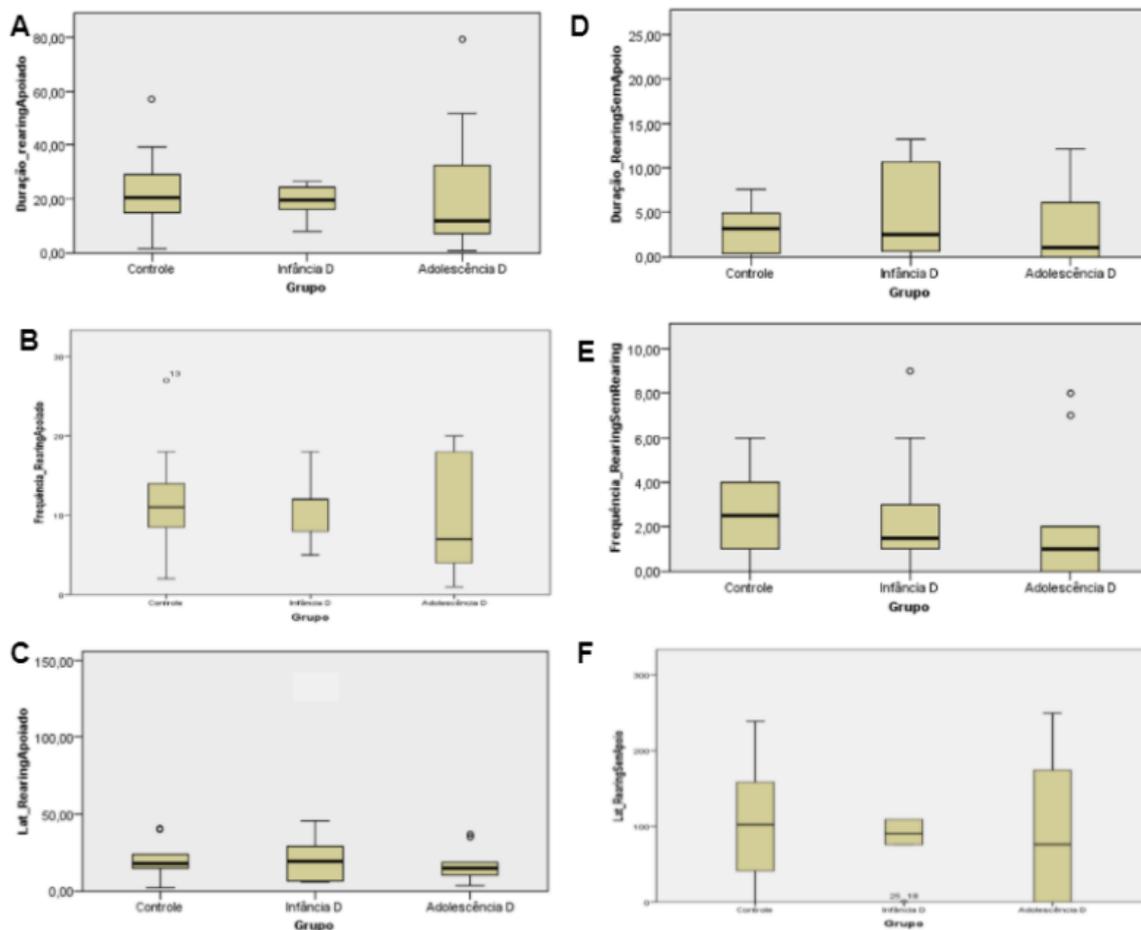


Figura 17. Média das variáveis de rearing no teste da tarefa de reconhecimento espacial associativo. **A.** Duração de rearing apoiado. **B.** Frequência de rearing apoiado. **C.** Latência rearing apoiado. **D.** Duração de rearing sem apoio. **E.** Frequência de rearing sem apoio. **F.** Latência rearing sem apoio.

5.4. Tarefa de reconhecimento de objetos novos

5.4.1. Amostra

Na sessão de amostra foi realizado um teste de ANOVA de uma via para amostras independentes, onde podemos observar não haver diferenças significativas para a variável total de exploração [F(2,33): 0,732; $p = 0,488$] (Fig. 18A). No entanto, para a frequência de exploração é possível perceber uma tendência de diferença entre grupos, mas sem um

valor significativo [F(2,33): 3,261; $p= 0,051$] (Fig .18B). E na variável latência para exploração foi realizado um teste Kruskal-Wallis de Amostras Independentes, que mostrou não haver diferenças significativas entre grupos $H(2)= 0,259$, $p= 0,879$ (Fig .18C).

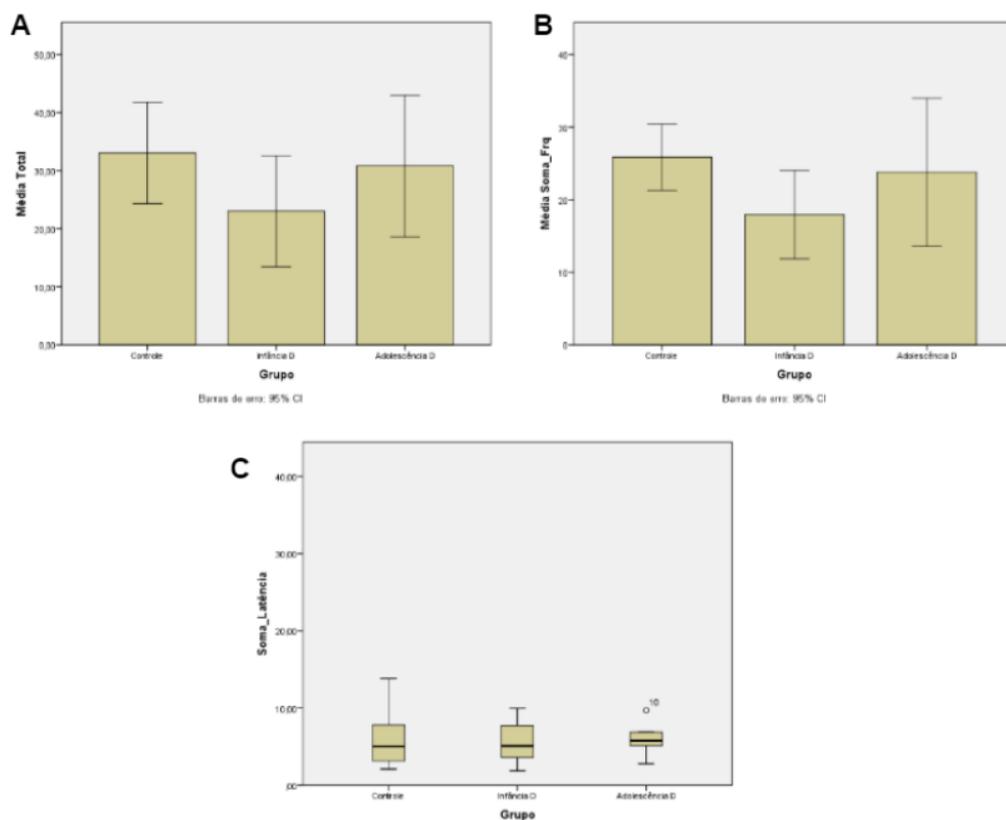


Figura 18. Médias das variáveis analisadas na sessão de amostra da Tarefa de reconhecimento de objetos novos. **A.** Média em segundos da duração de exploração dos objetos. **B.** Média da soma da frequência de exploração dos objetos. **C.** Latência para a exploração do primeiro objeto em segundos.

Para a taxa de exploração entre objetos na sessão de amostra, foi calculado um teste t pareado para cada um dos grupos. Sendo objeto A, objeto que foi substituído na sessão de teste, objeto B que permaneceu na sessão de teste.

Como resultados para o grupo controle, obtivemos que a taxa de exploração do objeto B (média= 0,55) foi maior do que a do objeto A (média= 0,45) , no entanto, esse

valor não foi estatisticamente significativo $t(13)=-1,754$ $p=0,103$, $d= -0,41$, $r= -0,9$. Para o grupo Infância D a taxa de exploração do objeto A (média= 0,54) foi maior em relação ao objeto B (média= 0,46), no entanto essa diferença não foi estatisticamente significativa $t(11)=1,090$ $p=0,299$, $d= 0,61$, $r= 0,29$. E para o grupo Adolescência D a taxa de exploração do objeto B (média= 0,49) foi menor em relação ao objeto A (média= 0,51), no entanto, essa diferença não foi significativa $t(9)= 0,279$; $p=0,787$, $d= 0,14$ $r= 0,071$. Esses resultados podem ser observados na figura 19.

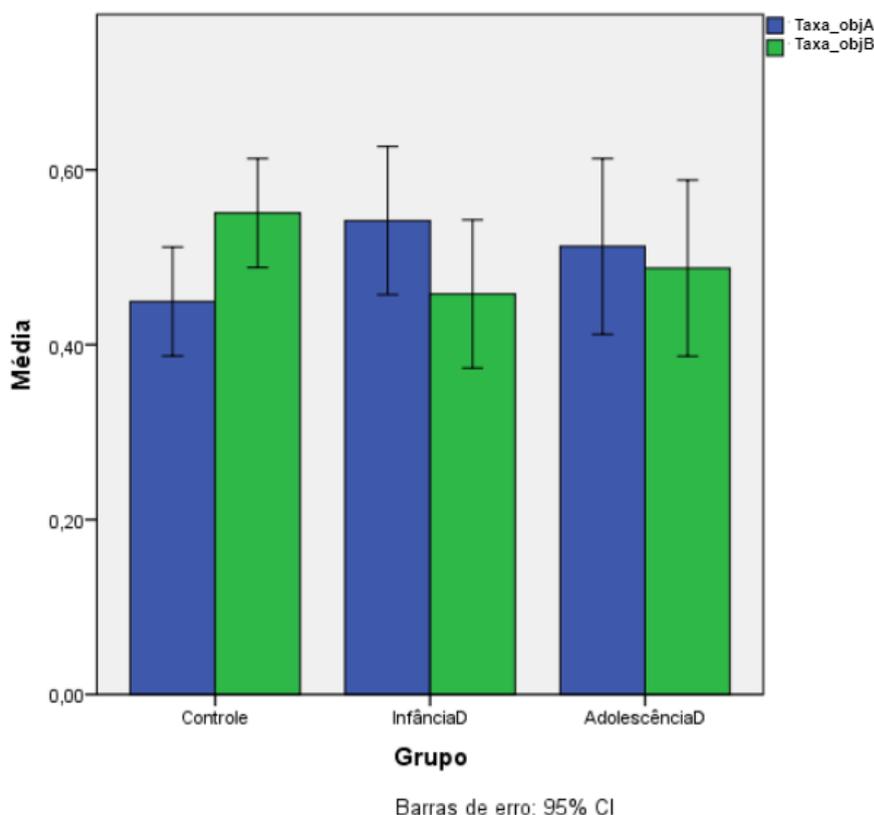


Figura 19. Taxas de exploração entre objeto A (objeto que foi substituído na sessão de teste) e objeto B (objeto que permaneceu na sessão de teste), para os três grupos: grupo controle, Infância D e Adolescência D, na amostra da Tarefa de reconhecimento de objetos novos.

5.4.2. Teste

Na sessão de teste, foi realizado um teste de Anova de uma via e não foram identificadas diferenças significativas no total de exploração $F(2,33): 1,410; p = 0,258$ e frequência de exploração $[F(2,33): 1,934; p = 1,161]$ entre os grupos. O Teste de Kruskal-Wallis de Amostras Independentes também não mostrou diferença estatisticamente significativa para a variável latência de exploração $H(2) = 0,849, p = 0,654$ (Figura 20).

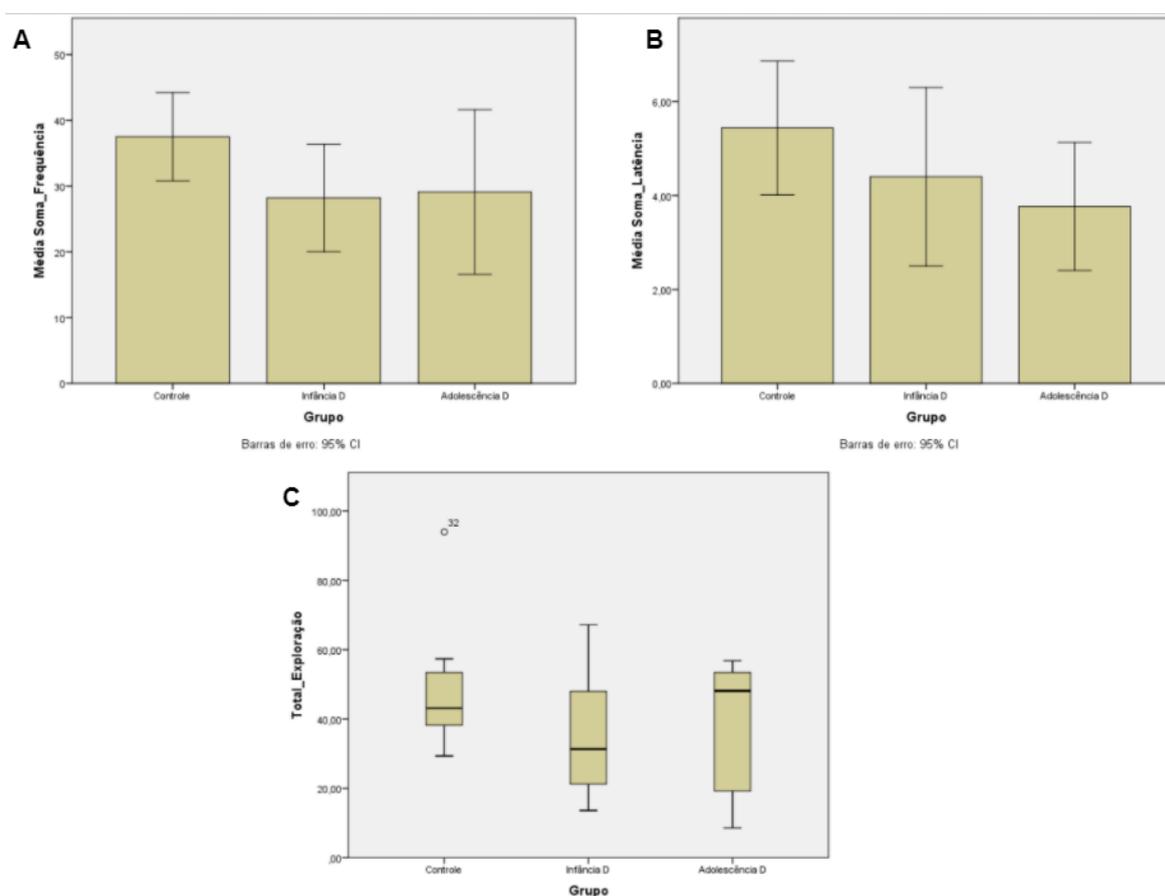


Figura 20. Médias das variáveis analisadas na sessão de teste da Tarefa de reconhecimento de objetos novos. **A.** Média em segundos da duração de exploração dos objetos. **B.** Média da soma da frequência de exploração dos objetos. **C.** Latência para a exploração do primeiro objeto em segundos.

A fim de verificar se havia diferenças entre as taxas de exploração para o objeto novo e objeto familiar, foi realizado um teste t pareado para cada grupo. Para o grupo controle, é possível observar que o objeto novo (média= 0,60) foi mais explorado do que o objeto familiar (média= 0,40), apresentando diferenças significativas $t(13)= 2,450$, $p=0,029$, $d= 1,33$, $r= 0,55$. Para o grupo Infância D não foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa $t(11)= 1,246$ $p= 0,239$, $d=0,76$, $r= 0,36$, mas a taxa de exploração do objeto novo (média= 0,56) foi maior do que a taxa de exploração do objeto familiar (média = 0,44). O grupo Adolescência D também mostrou uma diferença significativa para a taxa de exploração $t(9)= 2,945$ $p=0,016$, $d=1.81$, $r=0,67$ tendo o objeto novo (média= 0,60) uma maior taxa de exploração em relação ao objeto familiar (média= 0,40)(Figura.21).

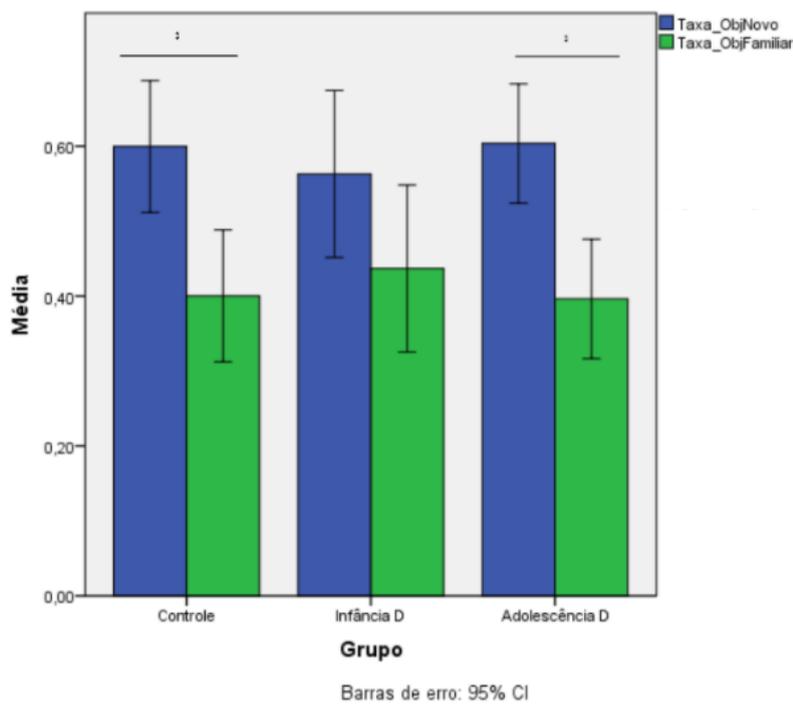


Figura 21. Taxas de exploração entre objeto novo e objeto familiar, para os três grupos na sessão de teste da Tarefa de reconhecimento de objetos novos.

5.5. Tarefa de reconhecimento espacial associativo

5.5.1. Amostra

Na análise de REA, foi feito uma ANOVA de uma via para amostras independentes, que mostrou não haver diferença estatisticamente significativa para a variável soma da frequência de exploração [F(2,29): 1,644; p= 0,207] e nem para a variável Latência de exploração do primeiro objeto [F(2,29): 1,515; p= 0,237]. A variável total de exploração dos objetos foi avaliada por meio do teste de Kruskal-Wallis de amostras independentes, conforme os resultados não houve diferença estatisticamente significativa para esta variável $H(2)= 1,663$, p= 0,435, conforme mostra gráficos da Figura 22.

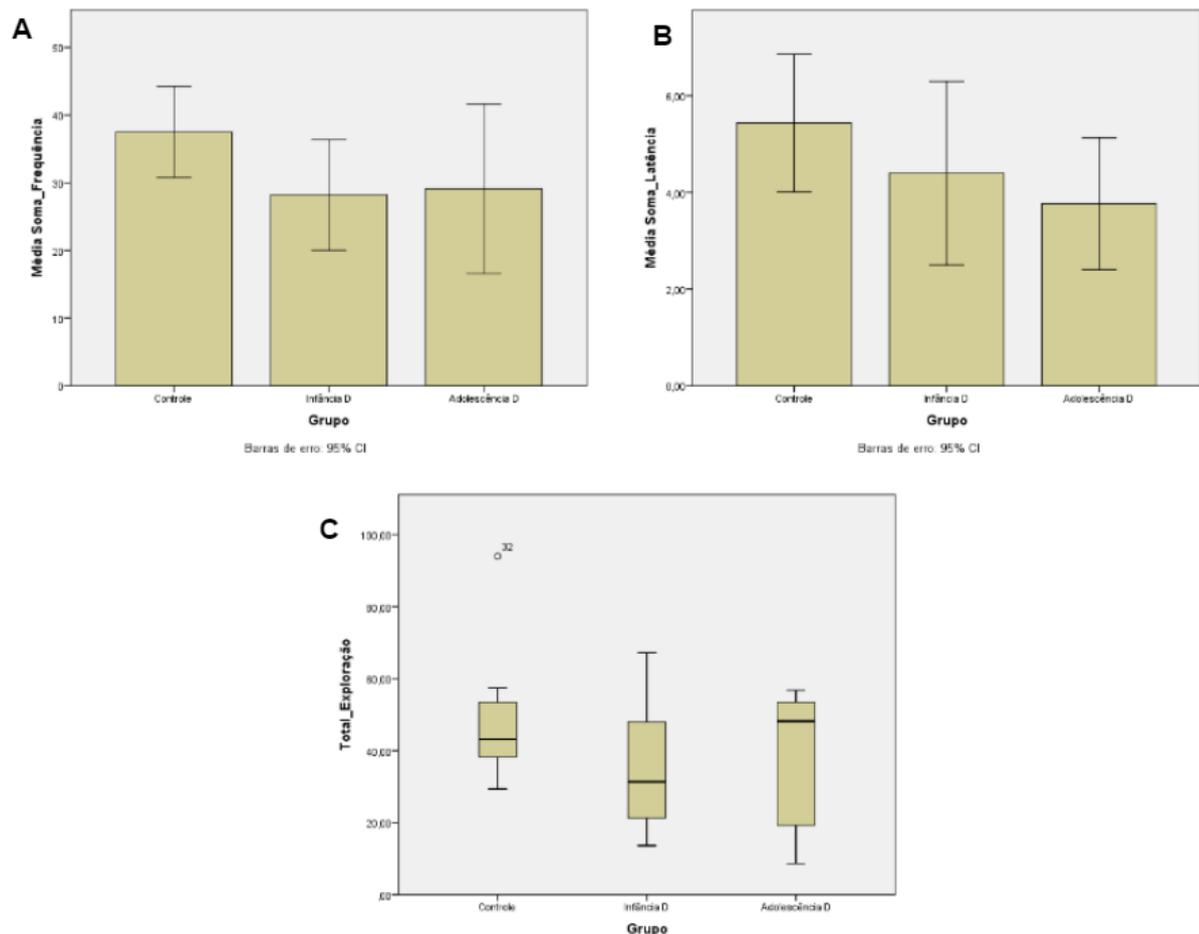


Figura 22. Médias das variáveis analisadas na sessão de amostra da Tarefa de reconhecimento espacial associativo. **A.** Média em segundos da duração de exploração dos

objetos. **B.** Média da soma da frequência de exploração dos objetos. **C.** Latência para a exploração do primeiro objeto em segundos.

Foi calculado um teste t pareado, para cada um dos grupos, comparando a variável taxa de explorações entre o objeto A, objeto que foi substituído na sessão de teste, e objeto B, que permaneceu na sessão de teste. A taxa de exploração do objeto A (média= 0,52) foi maior do que a do objeto B (média= 0,48), no grupo controle, porém não foi encontrada diferença estatisticamente significativa $t(11)= 0,623$ $p=0,546$, $d= 0,36$, $r= 0,17$. No grupo Infância D, do mesmo modo, a taxa exploração do objeto A (média= 0,53) foi maior em relação a do objeto B (média= 0,46), no entanto essa diferença não foi significativa $t(9)= 0,957$ $p=0,363$, $d= 0,58$, $r= 0,28$. Para o grupo Adolescência D a taxa de exploração do objeto A (média= 0,47) foi menor do que a do objeto B (média= 0,53), contudo, essa diferença não foi significativa $t(9)=- 0,561$ $p=0,588$, $d=-0,35$, $r=-0,17$ (Figura. 23).

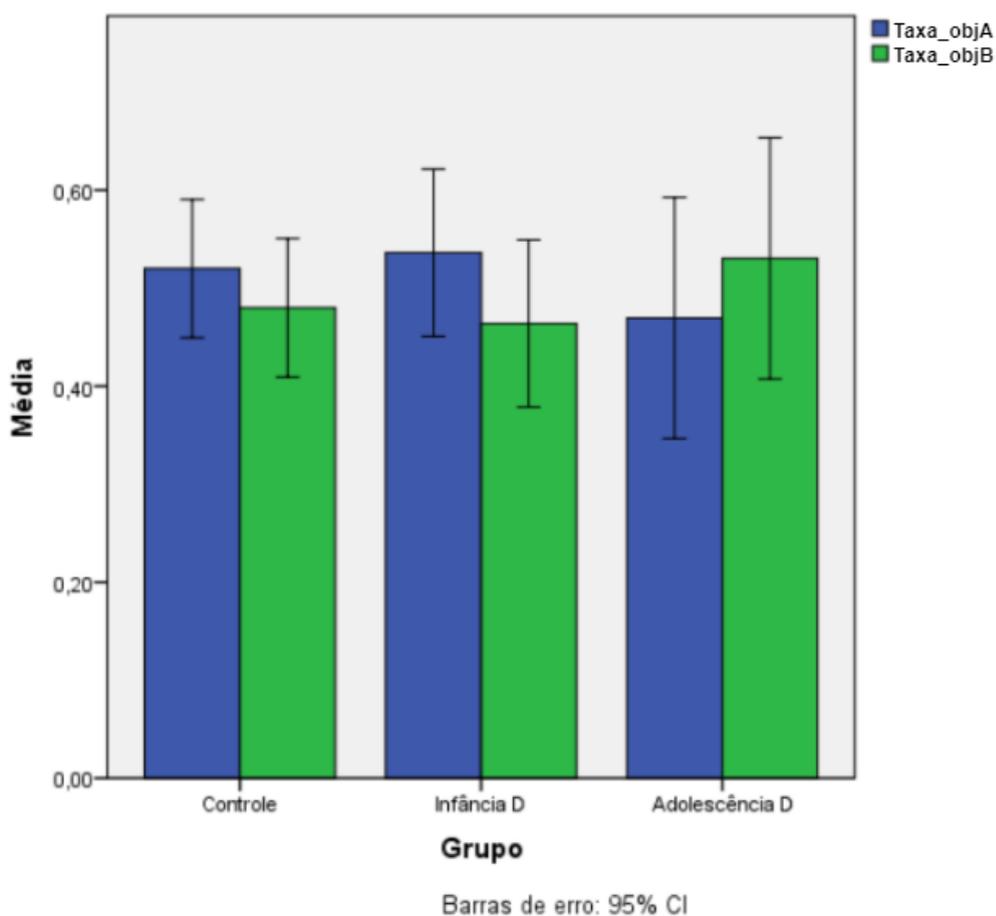


Figura 23. Taxas de exploração entre objeto A (objeto que foi substituído na sessão de teste) e objeto B (objeto que permaneceu na sessão de teste), para os três grupos: grupo controle, Infância D e Adolescência D, na Tarefa de reconhecimento de objetos novos.

5.5.2. Teste

Para as variáveis exploração total, frequência de exploração e latência de exploração, foi calculado um teste de Kruskal Wallis de Amostras Independentes com os valores: $H(2) = 1,279$, $p = 0,527$; $H(2) = 2,894$, $p = 0,235$ e $H(2) = 0,113$, $p = 0,945$, respectivamente, não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas como mostra a Figura 24.

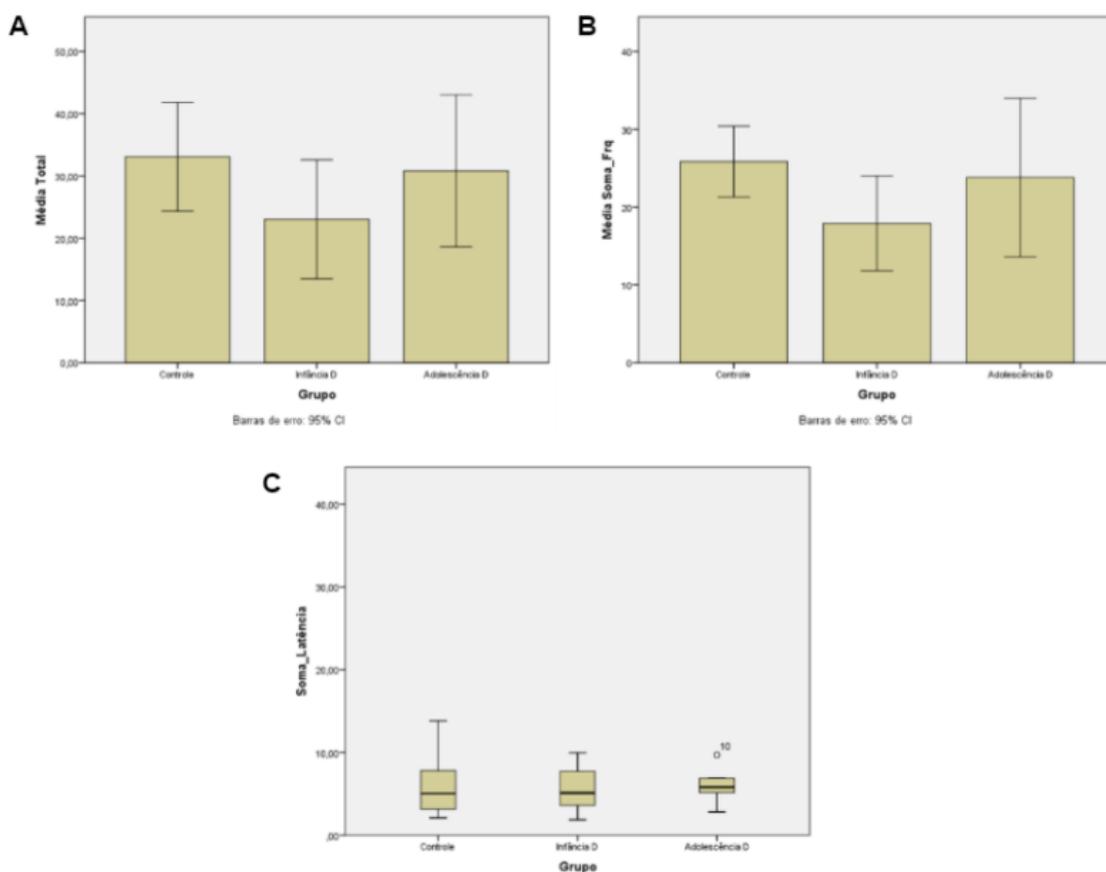


Figura 24. Médias das variáveis analisadas na sessão de teste da Tarefa de reconhecimento espacial associativo. **A.** Média em segundos da duração de exploração dos objetos. **B.** Média da soma da frequência de exploração dos objetos. **C.** Latência para a exploração do primeiro objeto em segundos.

Um teste t pareado foi realizado para cada um dos grupos com o objetivo de verificar se existiam diferenças entre as taxas de exploração para o objeto substituído na sessão de teste (objeto deslocado) e objeto não substituído (objeto não deslocado). No grupo controle é possível observar que objeto deslocado (média= 0,59) foi mais explorado do que o objeto não deslocado (média= 0,41), apresentando diferença estatisticamente significativa $t(11)= 2,738$, $p=0,019$, $d=1,64$, $r=0,63$. Para o grupo Infância D a taxa de exploração do objeto deslocado (média= 0,55) foi maior em relação a taxa de exploração do objeto não deslocado (média= 0,45), porém esta diferença não foi estatisticamente significativa $t(9)= 1,417$ $p= 0,190$, $d=0,91$, $r=0,41$. O grupo Adolescência D uma

maior taxa na exploração no objeto deslocado (média= 0,53) foi observado em relação ao objeto não deslocado (média= 0,47) não apresentando diferença significativa para a taxa de exploração $t(9) = 0,675$, $p = 0,517$, $d = 0,46$, $r = 0,22$. (Figura. 25)

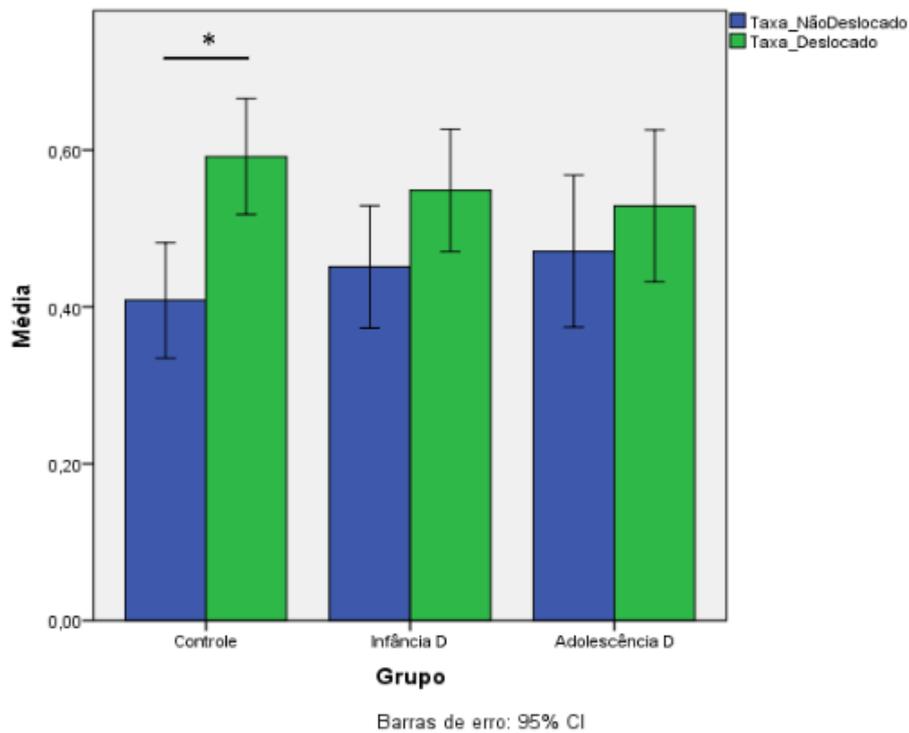


Figura 25. Taxas de exploração entre objeto deslocado e objeto não deslocado, para os três grupos na sessão de teste da Tarefa de reconhecimento espacial associativo.

6. Discussão

O desenvolvimento e formação de ritmos diários que correlacionem diversos processos, como temperatura, pressão sanguínea, liberação de hormônios e atividade locomotora, são indispensáveis para o sucesso de um organismo no meio em que habita (FORTES, 2010). Sabendo disso, e que a dessincronização circadiana é capaz de alterar alguns comportamentos fisiológicos, causando prejuízos importantes sobre memória, metabolismo e transtornos de humor (OLIVEIRA et al. 2020; VADNIE & MCCLUNG, 2017; KIRSHNAN & LYONS 2015; RUBY et. al., 2013), o presente estudo objetivou-se avaliar o desempenho de ratos *Wistar* adultos que foram submetidos à dessincronização forçada durante algumas fases de sua ontogênese (Infância e Adolescência) sobre tarefas de memória e comportamento tipo ansioso.

Levando em consideração que o ritmo circadiano fetal é arrastado por sinais vindos de sua genitora (SERON-FERRE et al. 2012), o grupo Infância D foi submetido ao protocolo de iluminação T22 logo na fase de pareamento, sendo a fase de infância constituída de pareamento e lactação. Na fase de pareamento os animais expostos à dessincronização forçada por meio do protocolo luminoso T22, exibiram dois componentes rítmicos, um sincronizado ao ciclo claro/escuro ambiental de 1320, e um componente em livre curso com período $1468,33 \pm 10,40$ min. Nessa fase dois animais adultos (genitores) estavam presentes na gaiola, estudos como o de De la Iglesia e colaboradores (2004), corroboram nossos achados mostrando haver a dissociação dos componentes rítmicos em ratos, quando expostos ao protocolo de 22 horas.

Em estudos anteriores foi observado que os ritmos de embriões e neonatos de ratos *wistars* possuem sincronia com os das genitoras, que por sua vez é arrastado ao ciclo claro-escuro ambiental (Bellavía et al., 2006). Estudos com outros roedores, como hamsters, corroboram esse achado (DAVIS & GORSKI 1988). Por essa razão a fêmea genitora do grupo Infância D foi submetida ao protocolo T22 logo no pareamento, para que a gravidez, gestação e nascimento ocorresse neste protocolo de iluminação garantindo a consequente dessincronização dos filhotes. Na lactação, somente as fêmeas genitoras estavam presentes na gaiola junto a ninhada, sendo assim, a ritmicidade nos apresenta a atividade conjunta de todos os animais presentes na gaiola. Nesse momento, o percentual de variância foi menor em relação ao pareamento e uma das fêmeas junto a ninhada, além

de apresentar os dois componentes característicos na dessincronização forçada, mostrou haver um ritmo em livre curso. Essa presença de três ritmos de atividade pode ter se dado devido a presença de genitora e toda sua ninhada na mesma gaiola. Westerga & Gramsbergen (1990), detectou em linhagens de ratos Hooded Lister, que o caminhar horizontal, sem a barriga apoiado no chão, começa a ocorrer no décimo primeiro dia pós natal, período esse que os animais da ninhada estavam na fase de lactação, fazendo com que a movimentação fosse captada pelo sensor causando o padrão dissociativo incomum e o percentual de variância menor na lactação.

No grupo denominado Adolescência D, animais que passaram a infância sobre ciclo de 24h (12h claro/12h escuro) foram submetidos ao ciclo claro/escuro de 22h, tendo sido encontrado o padrão clássico de dissociação, com animais apresentando dois ritmos bem definidos. Albert et al., (2013) nos diz que, quando ratos adolescentes são expostos a mudanças crônicas de fase, passam a apresentar apenas um ritmo estável de atividade/repouso, sincronizado ao claro/escuro ambiental. Segundo os autores, isso se dá devido a plasticidade do sistema de temporização de ratos jovens, capaz de ser arrastado ao ciclo ambiental com maior facilidade do que indivíduos adultos. O presente estudo nos mostra algo contrário a isso, com animais adolescentes apresentando dois picos de atividade, ou seja, mesmo que a plasticidade do sistema de temporização circadiano seja alta em animais jovens, o protocolo T22 tem capacidade de promover dissociação do núcleo supraquiasmático, resultado já observado nos trabalhos de Pereira (2017) e Araújo (2017).

Já no grupo controle, foi analisada toda a série temporal, sendo possível observar se estes animais permaneceram durante todo o experimento sincronizados ao ciclo claro/escuro ambiental. No que diz respeito à ritmicidade circadiana da atividade locomotora é possível observar que animais expostos a um ciclo de 24h (grupo controle) exibem um pico, em seus periodogramas, de 1440. O mesmo pode ser observado em estudos anteriores onde animais em um ciclo claro/escuro de 24h exibem ritmos circadianos de atividade locomotora sincronizados ao claro escuro ambiental, exibindo períodos de 1440 (TUREK, 1994; STEPHAN et al. 1979).

Na fase de vida adulta, onde todos os animais foram submetidos ao T24, encontramos diferenças significativas entre o grupo Infância D e os demais grupos (Adolescência D e Controle), indicando menor estabilidade de ritmos em animais adultos

que passaram a infância em T22. Em experimento semelhante, Anglès-Pujolràs et al (2007), avaliaram o grau de dissociação de animais nascidos e mantidos em T22 e animais nascidos em T24 e transferidos para T22 após desmame, descobriram que, animais nascidos em T22 apresentavam ritmos endógenos mais curtos do que o grupo nascido em T24, resultados semelhantes aos encontrados nesta pesquisa.

Sobre o teste de campo aberto, não foi possível observar diferenças significativas em nenhuma das variáveis analisadas (Tempo que os animais passaram no Centro e na periferia do Campo, distância total percorrida e velocidade média). Do mesmo modo, Bem-Hamo et al (2016) não encontrou diferenças significativas entre os grupos, controle e submetido ao ciclo claro/escuro de 22 horas, que passaram pelo teste de campo aberto. Esses resultados podem ser explicados pelo impulso inato dos ratos a explorar ambientes novos, sendo indispensável para mapeamento do local e otimização da segurança (WHISHAW, I., GHARBAWIE, O., CLARK, B., & LEHMANN, H. 2006; O'KEEFE, J., NADEL, L., & WILLNER, J. 1979).

Além das variáveis citadas no parágrafo anterior, fizemos uma análise de rearing tanto na tarefa de campo aberto como nos testes e amostras das tarefas de reconhecimento de objetos novos e reconhecimento espacial associativo, visando ter uma visão em progressão desse comportamento que pode ser indicativo de um comportamento tipo ansioso (LEVER, BURTON & O'KEEFE 2006). Na tarefa de campo aberto os animais não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre as variáveis: duração e frequência, isso pode ser explicado por ser a primeira vez dos animais no campo, tendo os roedores uma tendência a explorar mais ambientes novos (GOES et al. 2013). Na amostra de RON, os animais do grupo Adolescência D tiveram os menores valores na variável duração em rearing sem apoio sendo estatisticamente significativos em comparação com grupo Controle. Estes animais, ainda, apresentaram em comparação aos demais grupos valores estatisticamente significativos, na variável latência. Com o grupo Adolescência D sendo o último a passar pelo protocolo T22, é possível que a situação de estresse causada pelo protocolo luminoso tenha persistido até a vida adulta e causado os resultados encontrados ou o protocolo de iluminação, nesta fase, conferiu um estado de baixa motivação para estes animais. McCormick & Green (2013), relatou que animais expostos a estresse crônico durante a fase de adolescência obtêm ansiedade aumentada quando testados na vida adulta. Sturman et al. (2018), mediu o rearing apoiado e sem apoio de

camundongos, machos e fêmeas, na tarefa de campo aberto mostrou que o rearing, principalmente sem apoio, é sensível à situação de estresse. Esse mesmo estudo afirma que testes repetidos e procedimentos de manuseio podem levar a mudanças nos parâmetros alcançados (STURMAN et al. 2017), isso explicaria o fato de não haver diferenças significativas para as demais variáveis no teste de RON, nem na amostra e teste de REA, onde não encontramos diferenças estatisticamente significativas.

Em relação às tarefas de memória RON (reconhecimento de objetos novos) e REA (reconhecimento espacial associativo), testamos nas sessões de amostra e teste as variáveis frequência de exploração, latência para a exploração do primeiro objeto e total de exploração entre os grupos. Assim, com a preferência por um objeto (objeto A ou objeto B) nas sessões de amostra das duas tarefas, foi testada. Não obtivemos valores estatisticamente significativos nas variáveis acima, ou seja: os grupos não exploraram um objeto mais do que o outro nas sessões de amostra, nenhum dos grupos tinha falta de motivação para exploração e nenhum animal possuía dificuldade de locomoção.

Na tarefa de reconhecimento de objetos novos, o grupo Infância D mostrou prejuízo no desempenho, não conseguindo discriminar objeto novo de familiar, enquanto o grupo controle e Adolescência D tiveram resultado estatisticamente significativo para discriminação entre os objetos. Reger et al. (2009) estudou a memória de reconhecimento de ratos Sprague-Dawley machos em várias idades, desde o desmame até a idade adulta, os resultados mostram que os animais mais velhos possuem uma memória a longo prazo, enquanto que os desmamados exibem reconhecimento até 1 hora após o teste, mostrando que a memória para reconhecimento tem desenvolvimento tardio. O autor sugere que essas diferenças podem estar associadas ao Lobo Temporal Medial (complexo hipocampal/dentado, córtices perirrinal e entorrinal e giro para-hipocampal) que passa por períodos de desenvolvimento após o nascimento. Aliás o córtex perirrinal está mais envolvido com a memória de reconhecimento de objetos do que o hipocampo, sendo este último importante para a memória de percepção para lugares e caminhos e, portanto, envolvido diretamente em tarefas de reconhecimento espacial como é o caso da REA (MURRAY, BUSSEY & SAKSIDA, 2007; BARKER & WARBURTON, 2011).

Como resultado do REA, o grupo controle foi o único capaz de discriminar o objeto deslocado do não deslocado, havendo prejuízo de memória espacial associativa nos demais grupos experimentais submetidos ao protocolo T22. Um estudo com humanos

adultos jovens usando tarefa de reconhecimento associativo detectou, através de ressonância magnética funcional, que o hipocampo e parahipocampo podem estar envolvidos em informações associativas usadas para discriminar itens com base no lugar de ocorrência anterior (DUZEL et. al., 2003). Em revisão, Aggleton & Nelson (2020), mostram que a tarefa de reconhecimento espacial associativo possui uma circuitaria complexa envolvendo importantes áreas como hipocampo, córtex perirrinal, córtex entorrinal lateral, núcleos talâmicos anteriores, os corpos mamilares, córtex retrosplenial, núcleo reuniens e córtex pré-frontal medial. Com isso, estudos revelam que a dessincronização afeta a memória e aprendizado, causando diminuição acentuada da proliferação e neurogênese das células hipocampais (GIBSON et al., 2010). Em um experimento utilizando ratos machos Sprague Dawley adultos jovens, avanços crônicos de fase semanais de 6 horas, provocaram prejuízos na memória de reconhecimento, não apresentando preferência entre os objetos na sessão de teste, indicando avanços crônicos de fase como prejudiciais a consolidação da memória. Além disso, também foi observado diminuição nos níveis de neurogênese hipocampal desses animais (HORSEY, 2020).

Testes de ratos *Wistar* adultos submetidos ao protocolo T22 evidenciam que não há prejuízo na memória de reconhecimento de objetos para estes animais, no entanto os sujeitos tiveram prejuízos no teste de esquiva passiva, indicando que a dessincronização pode ocasionar prejuízos na memória do tipo emocional, porém pode não prejudicar a memória de conteúdo não emocional em animais adultos (NETO, 2008). Por outro lado, ratos *Wistar* adolescentes submetidos ao protocolo T22, no entanto, apresentaram déficits no desempenho da tarefa de reconhecimento de objetos e reconhecimento espacial associativo (ARAÚJO 2017), porém não apresentaram déficits na realização da tarefa de esquiva passiva. Esses resultados nos mostram que diferentes estruturas cerebrais estão envolvidas nos diferentes tipos de memória, com o reconhecimento espacial associativo com um circuito neural mais complexo, tendo assim, uma maturação mais tardia que o reconhecimento de objetos novos, por exemplo, visto que esta última tarefa envolve menos estruturas cerebrais. Isto é, quanto mais complexa a circuitaria para um determinado tipo de memória, mais tempo de maturação é necessário.

Tais resultados mostram que, interrupções no funcionamento ou desregulação do ritmo circadiano, que tem extrema importância na aquisição de aprendizado, recuperação e formação de memória (KRISHNAM & LYONS, 2015), podem causar algum tipo de

prejuízo dependendo da fase de dessincronização do animal, do teste de memória avaliado e da fase de vida em que este foi testado, podendo ter prejuízos em estruturas que podem possuir sistemas compensatórios ou podem ser danificadas permanentemente, estudos sobre mecanismos subjacentes são necessários e estão em curso.

7. Conclusão

Com isso, concluímos que o protocolo de dessincronização forçada T22, induz a dessincronização do ritmo de atividade locomotora que passa a exibir dois ritmos, sendo associado ao desacoplamento das duas porções do núcleo supraquiasmático. Foi possível observar que ratos que passam pelo protocolo, tanto na fase de infância quanto na de adolescência, apresentam ritmo de atividade locomotora dissociada, havendo resincronização quando expostos ao protocolo de iluminação T24.

Também é possível concluir que animais expostos ao protocolo de iluminação T22 obtêm prejuízo na memória espacial associativa dentro dos grupos experimentais, mas na memória de reconhecimento de objetos novos só o grupo que foi exposto ao protocolo de dessincronização na infância, obteve prejuízo quando testados na fase adulta, indicando que os circuitos cerebrais para tais memórias são diferentes podendo haver algum sistema compensatório para memória RON na fase de adolescência. O prejuízo gerado no teste REA afetou tanto o grupo exposto na infância, como o grupo exposto na adolescência, podendo ser relacionado a danos no desenvolvimento de algumas estruturas durante essas fases que perduram até a fase adulta, onde ocorreram os testes.

Esse estudo nos mostra que a dessincronização circadiana pode causar danos em diferentes tipos de memória, e que estes impactos podem perdurar até a idade adulta. Em uma perspectiva translacional, estudos como esse nos fazem refletir sobre os impactos que a exposição irregular à luz em crianças e jovens, como por exemplo através do uso excessivo de produtos eletrônicos, pode causar a longo prazo. Isso nos mostra a importância de utilizar modelos animais como forma inicial para estudos com humanos, para desvendar circuitos e desenvolver estratégias terapêuticas.

Concluímos que é estritamente importante o estudo dessa área, sendo necessárias mais pesquisas que utilizem mais testes comportamentais e que investiguem os distúrbios que a dissociação pelo protocolo de iluminação pode causar, tanto em outros tipos de memória, quanto em outros processos cognitivos.

8. Referências

- Abrahamson, Eric E, e Robert Y Moore. “Suprachiasmatic Nucleus in the Mouse: Retinal Innervation, Intrinsic Organization and Efferent Projections”. *Brain Research* 916, n° 1–2 (outubro de 2001): 172–91. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(01\)02890-6](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)02890-6).
- Aggleton, John P., e Andrew J.D. Nelson. “Distributed interactive brain circuits for object-in-place memory: A place for time?” *Brain and Neuroscience Advances* 4 (1° de janeiro de 2020): 2398212820933471. <https://doi.org/10.1177/2398212820933471>.
- Ambrogio Lorenzini, Carlo G, Elisabetta Baldi, Corrado Bucherelli, Benedetto Sacchetti, e Giovanna Tassoni. “Role of Ventral Hippocampus in Acquisition, Consolidation and Retrieval of Rat’s Passive Avoidance Response Memory Trace”. *Brain Research* 768, n° 1–2 (setembro de 1997): 242–48. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(97\)00651-3](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(97)00651-3).
- Anglès-Pujolràs, Montserrat, Antoni Díez-Noguera, e Trinitat Cambras. “Exposure to T-Cycles of 22 and 23 h during Lactation Modifies the Later Dissociation of Motor Activity and Temperature Circadian Rhythms in Rats”. *Chronobiology International* 24, n° 6 (janeiro de 2007): 1049–64. <https://doi.org/10.1080/07420520701800645>.
- Aschoff, Jorgen, e Hermann Pohl. “Phase Relations between a Circadian Rhythm and Its Zeitgeber within the Range of Entrainment”. *Naturwissenschaften* 65, n° 2 (fevereiro de 1978): 80–84. <https://doi.org/10.1007/BF00440545>.
- Barker, G. R. I., e E. C. Warburton. “When Is the Hippocampus Involved in Recognition Memory?” *Journal of Neuroscience* 31, n° 29 (20 de julho de 2011): 10721–31. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6413-10.2011>.
- . “When Is the Hippocampus Involved in Recognition Memory?” *Journal of Neuroscience* 31, n° 29 (20 de julho de 2011): 10721–31. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6413-10.2011>.
- Barker, Gareth RI, e Elizabeth Clea Warburton. “Multi-Level Analyses of Associative Recognition Memory: The Whole Is Greater than the Sum of Its Parts”. *Current Opinion in Behavioral Sciences* 32 (abril de 2020): 80–87. <https://doi.org/10.1016/j.cobeha.2020.02.004>.
- Ben-Hamo, Miriam, Tracy A. Larson, Leanne S. Duge, Carl Sikkema, Charles W. Wilkinson, Horacio O. de la Iglesia, e Mónica M. C. González. “Circadian Forced Desynchrony of the Master Clock Leads to Phenotypic Manifestation of Depression in Rats”. *Eneuro* 3, n° 6 (novembro de 2016): ENEURO.0237-16.2016. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0237-16.2016>.

- Bollinger, T, e U Schibler. “Circadian Rhythms – from Genes to Physiology and Disease”. *Swiss Medical Weekly*, 24 de julho de 2014. <https://doi.org/10.4414/smw.2014.13984>.
- Broadbent, N. J., L. R. Squire, e R. E. Clark. “Spatial Memory, Recognition Memory, and the Hippocampus”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, nº 40 (5 de outubro de 2004): 14515–20. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406344101>.
- Brooks, Elisabeth, e Maria M. Canal. “Development of Circadian Rhythms: Role of Postnatal Light Environment”. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 37, nº 4 (maio de 2013): 551–60. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2013.02.012>.
- Cambras, T., M. M. Canal, A. Torres, J. Vilaplana, e A. Díez-Noguera. “Manifestation of Circadian Rhythm under Constant Light Depends on Lighting Conditions during Lactation”. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 272, nº 4 (1º de abril de 1997): R1039–46. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1997.272.4.R1039>.
- Canal-Corretger, M. M., J. Vilaplana, T. Cambras, e A. Díez-Noguera. “EFFECT OF LIGHT ON THE DEVELOPMENT OF THE CIRCADIAN RHYTHM OF MOTOR ACTIVITY IN THE MOUSE”. *Chronobiology International* 18, nº 4 (janeiro de 2001): 683–96. <https://doi.org/10.1081/CBI-100106081>.
- Cho, Kwangwook, A. Ennaceur, Jon C. Cole, e Chang Kook Suh. “Chronic Jet Lag Produces Cognitive Deficits”. *The Journal of Neuroscience* 20, nº 6 (15 de março de 2000): RC66–RC66. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-06-j0005.2000>.
- Clark, Robert E., Nicola J. Broadbent, e Larry R. Squire. “Hippocampus and Remote Spatial Memory in Rats”. *Hippocampus* 15, nº 2 (2005): 260–72. <https://doi.org/10.1002/hipo.20056>.
- Clayton, Nicola S., e Nathan J. Emery. “Avian Models for Human Cognitive Neuroscience: A Proposal”. *Neuron* 86, nº 6 (junho de 2015): 1330–42. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.04.024>.
- Cox, Kimberly H, e Joseph S Takahashi. “Circadian Clock Genes and the Transcriptional Architecture of the Clock Mechanism”. *Journal of Molecular Endocrinology* 63, nº 4 (novembro de 2019): R93–102. <https://doi.org/10.1530/JME-19-0153>.
- Cressman, Victoria L., Jordan Balaban, Sara Steinfeld, Alexei Shemyakin, Peter Graham, Nelly Parisot, e Holly Moore. “Prefrontal Cortical Inputs to the Basal Amygdala Undergo Pruning during Late Adolescence in the Rat”. *The Journal of Comparative Neurology*, 2010, NA-NA. <https://doi.org/10.1002/cne.22359>.

- . “Prefrontal Cortical Inputs to the Basal Amygdala Undergo Pruning during Late Adolescence in the Rat”. *The Journal of Comparative Neurology*, 2010, NA-NA. <https://doi.org/10.1002/cne.22359>.
- Emens, Jonathan S., Amber L. Laurie, Jeannie B. Songer, e Alfred J. Lewy. “Non-24-Hour Disorder in Blind Individuals Revisited: Variability and the Influence of Environmental Time Cues”. *Sleep* 36, n° 7 (1° de julho de 2013): 1091–1100. <https://doi.org/10.5665/sleep.2818>.
- Emens, Jonathan S., Alfred J. Lewy, Bryan J. Lefler, e Robert L. Sack. “Relative Coordination to Unknown ‘Weak Zeitgebers’ in Free-Running Blind Individuals”. *Journal of Biological Rhythms* 20, n° 2 (abril de 2005): 159–67. <https://doi.org/10.1177/0748730404273294>.
- Ennaceur, A. “One-Trial Object Recognition in Rats and Mice: Methodological and Theoretical Issues”. *Behavioural Brain Research* 215, n° 2 (dezembro de 2010): 244–54. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.12.036>.
- Ennaceur, A., e J. Delacour. “A New One-Trial Test for Neurobiological Studies of Memory in Rats. 1: Behavioral Data”. *Behavioural Brain Research* 31, n° 1 (novembro de 1988): 47–59. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(88\)90157-X](https://doi.org/10.1016/0166-4328(88)90157-X).
- Franken, P., e D.-J. Dijk. “Circadian Clock Genes and Sleep Homeostasis”. *European Journal of Neuroscience* 29, n° 9 (maio de 2009): 1820–29. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.06723.x>.
- Fujioka, Aya, Takashi Fujioka, Ryosuke Tsuruta, Tomonori Izumi, Shunji Kasaoka, e Tsuyoshi Maekawa. “Effects of a Constant Light Environment on Hippocampal Neurogenesis and Memory in Mice”. *Neuroscience Letters* 488, n° 1 (janeiro de 2011): 41–44. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.11.001>.
- Goes, T C, F D Antunes, T H Almeida-Souza, F R C Ursulino, F B Garcez, A L L Melo, e F Teixeira-Silva. “Comportamento de ratos *Wistar* no Paradigma da Exploração Livre”. *Scientia Plena*, 2013, 7.
- Hartmann, Mitra J. Z. “A Night in the Life of a Rat: Vibrissal Mechanics and Tactile Exploration: Hartmann”. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1225, n° 1 (abril de 2011): 110–18. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06007.x>.
- Haspel, Jeffrey A., Ron Anafi, Marishka K. Brown, Nicolas Cermakian, Christopher Depner, Paula Desplats, Andrew E. Gelman, et al. “Perfect Timing: Circadian Rhythms, Sleep, and Immunity — an NIH Workshop Summary”. *JCI Insight* 5, n° 1 (16 de janeiro de 2020): e131487. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.131487>.
- Hastings, Michael H., Elizabeth S. Maywood, e Marco Brancaccio. “The Mammalian Circadian Timing System and the Suprachiasmatic Nucleus as Its Pacemaker”. *Biology* 8, n° 1 (11 de março de 2019): 13. <https://doi.org/10.3390/biology8010013>.

- Hauber, W, e A Bareiß. “Facilitative Effects of an Adenosine A1/A2 Receptor Blockade on Spatial Memory Performance of Rats: Selective Enhancement of Reference Memory Retention during the Light Period”. *Behavioural Brain Research* 118, nº 1 (janeiro de 2001): 43–52. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(00\)00307-7](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(00)00307-7).
- Honma, K. I., e T. Hiroshige. “Internal Synchronization among Several Circadian Rhythms in Rats under Constant Light”. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 235, nº 5 (1º de novembro de 1978): R243–49. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1978.235.5.R243>.
- Jesus Pinto, Wagner de, Victor Cavalcante Muricy, e Rafael Ramon Rodrigues Treto. “RITMOS BIOLÓGICOS NO SISTEMA ENDÓCRINO”. *Brazilian Journal of Development* 6, nº 7 (2020): 53677–96. <https://doi.org/10.34117/bjdv6n7-857>.
- Juraska, Janice M., e Jari Willing. “Pubertal Onset as a Critical Transition for Neural Development and Cognition”. *Brain Research* 1654 (janeiro de 2017): 87–94. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.04.012>.
- Kennaway, David J. “The Role of Circadian Rhythmicity in Reproduction”. *Human Reproduction Update* 11, nº 1 (1º de janeiro de 2005): 91–101. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmh054>.
- Ko, Caroline H., e Joseph S. Takahashi. “Molecular Components of the Mammalian Circadian Clock”. *Human Molecular Genetics* 15, nº suppl_2 (15 de outubro de 2006): R271–77. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl207>.
- Krishnan, Harini C., e Lisa C. Lyons. “Synchrony and Desynchrony in Circadian Clocks: Impacts on Learning and Memory”. *Learning & Memory* 22, nº 9 (setembro de 2015): 426–37. <https://doi.org/10.1101/lm.038877.115>.
- . “Synchrony and Desynchrony in Circadian Clocks: Impacts on Learning and Memory”. *Learning & Memory* 22, nº 9 (setembro de 2015): 426–37. <https://doi.org/10.1101/lm.038877.115>.
- Lever, C., S. Burton, e J. O’Keefe. “Rearing on Hind Legs, Environmental Novelty, and the Hippocampal Formation”. *Reviews in the Neurosciences* 17, nº 1–2 (janeiro de 2006). <https://doi.org/10.1515/REVNEURO.2006.17.1-2.111>.
- . “Rearing on Hind Legs, Environmental Novelty, and the Hippocampal Formation”. *Reviews in the Neurosciences* 17, nº 1–2 (janeiro de 2006). <https://doi.org/10.1515/REVNEURO.2006.17.1-2.111>.
- Ma, Wen-Pei, Jun Cao, Meng Tian, Ming-Hu Cui, Hui-Li Han, Yue-Xiong Yang, e Lin Xu. “Exposure to Chronic Constant Light Impairs Spatial Memory and Influences Long-Term Depression in Rats”. *Neuroscience Research* 59, nº 2 (outubro de 2007): 224–30. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2007.06.1474>.

- McCormick, C.M., e M.R. Green. “From the Stressed Adolescent to the Anxious and Depressed Adult: Investigations in Rodent Models”. *Neuroscience* 249 (setembro de 2013): 242–57. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.08.063>.
- Menezes, Elizabete Wenzel de, Jorge Mancini Filho, e Sylvania Meiry Peris Neves. *Manual de cuidados e procedimentos com animais de laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP. Universidade de São Paulo. Instituto de Química*, 2013.
- Moser, May-Britt, e Edvard I. Moser. “Distributed Encoding and Retrieval of Spatial Memory in the Hippocampus”. *The Journal of Neuroscience* 18, nº 18 (15 de setembro de 1998): 7535–42. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-18-07535.1998>.
- Müller, Lisa, Peter Fritzsche, e Dietmar Weinert. “Novel Object Recognition of Djungarian Hamsters Depends on Circadian Time and Rhythmic Phenotype”. *Chronobiology International* 32, nº 4 (21 de abril de 2015): 458–67. <https://doi.org/10.3109/07420528.2014.992526>.
- Murray, Elisabeth A., Timothy J. Bussey, e Lisa M. Saksida. “Visual Perception and Memory: A New View of Medial Temporal Lobe Function in Primates and Rodents”. *Annual Review of Neuroscience* 30, nº 1 (julho de 2007): 99–122. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.29.051605.113046>.
- Ohta, Hidenobu, Shin Yamazaki, e Douglas G McMahon. “Constant Light Desynchronizes Mammalian Clock Neurons”. *Nature Neuroscience* 8, nº 3 (março de 2005): 267–69. <https://doi.org/10.1038/nn1395>.
- O’Keefe, John, Lynn Nadel, e Jeff Willner. “Tuning out Irrelevancy? Comments on Solomon’s Temporal Mapping View of the Hippocampus.” *Psychological Bulletin* 86, nº 6 (1979): 1280–89. <https://doi.org/10.1037/0033-2909.86.6.1280>.
- Oliveira, Isis Gabrielli Barbieri de, Marcos Divino Ferreira Junior, Paulo Ricardo Lopes, Dhiogenes Balsanufu Taveira Campos, Marcos Luiz Ferreira-Neto, Eduardo Henrique Rosa Santos, Paulo Cezar de Freitas Mathias, et al. “Forced Internal Desynchrony Induces Cardiometabolic Alterations in Adult Rats”. *Journal of Endocrinology* 242, nº 2 (agosto de 2019): 25–36. <https://doi.org/10.1530/JOE-19-0026>.
- Panda, Satchidananda, John B. Hogenesch, e Steve A. Kay. “Circadian Rhythms from Flies to Human”. *Nature* 417, nº 6886 (maio de 2002): 329–35. <https://doi.org/10.1038/417329a>.
- Patke, Alina, Michael W. Young, e Sofia Axelrod. “Molecular Mechanisms and Physiological Importance of Circadian Rhythms”. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 21, nº 2 (fevereiro de 2020): 67–84. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0179-2>.

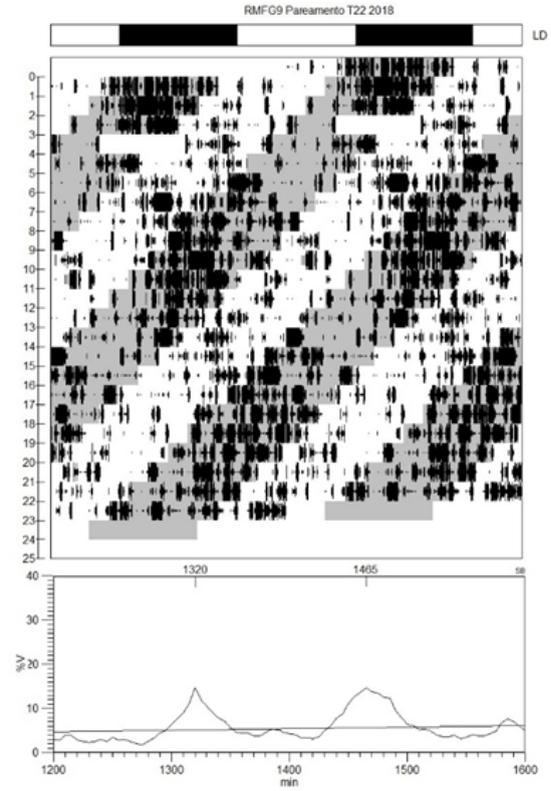
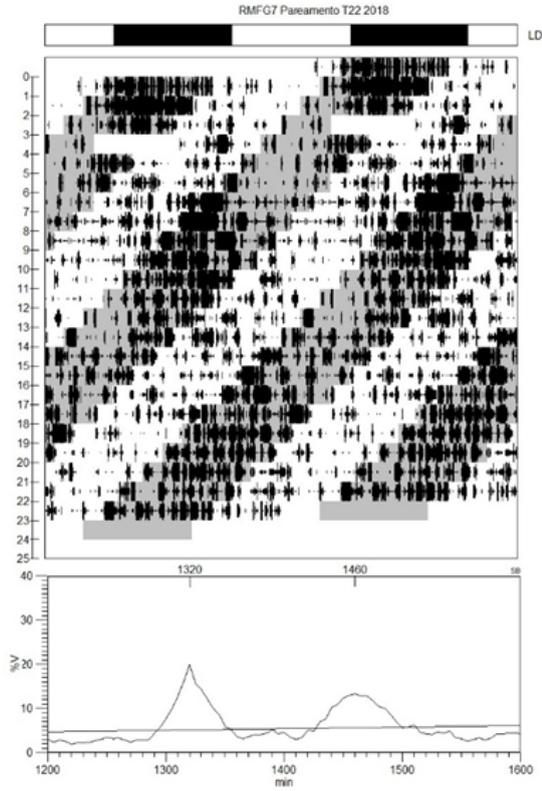
- Phillipson, O.T., e A.C. Griffiths. “The Topographic Order of Inputs to Nucleus Accumbens in the Rat”. *Neuroscience* 16, n° 2 (outubro de 1985): 275–96. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(85\)90002-8](https://doi.org/10.1016/0306-4522(85)90002-8).
- Pittendrigh, C. S. “Circadian Rhythms and the Circadian Organization of Living Systems”. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 25, n° 0 (1° de janeiro de 1960): 159–84. <https://doi.org/10.1101/SQB.1960.025.01.015>.
- Reger, Maxine L., David A. Hovda, e Christopher C. Giza. “Ontogeny of Rat Recognition Memory Measured by the Novel Object Recognition Task”. *Developmental Psychobiology* 51, n° 8 (dezembro de 2009): 672–78. <https://doi.org/10.1002/dev.20402>.
- Ruby, Norman F., Calvin E. Hwang, Colin Wessells, Fabian Fernandez, Pei Zhang, Robert Sapolsky, e H. Craig Heller. “Hippocampal-Dependent Learning Requires a Functional Circadian System”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, n° 40 (7 de outubro de 2008): 15593–98. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808259105>.
- Savelyev, Sergey A., Karin C. Larsson, Anne-Sofie Johansson, e Gabriella B. S. Lundkvist. “Slice Preparation, Organotypic Tissue Culturing and Luciferase Recording of Clock Gene Activity in the Suprachiasmatic Nucleus”. *Journal of Visualized Experiments*, n° 48 (15 de fevereiro de 2011): 2439. <https://doi.org/10.3791/2439>.
- Stark, C. E.L. “Simple and Associative Recognition Memory in the Hippocampal Region”. *Learning & Memory* 8, n° 4 (1° de julho de 2001): 190–97. <https://doi.org/10.1101/lm.40701>.
- Stephan, Friedrich K., Jennifer M. Swann, e Cheryl L. Sisk. “Entrainment of Circadian Rhythms by Feeding Schedules in Rats with Suprachiasmatic Lesions”. *Behavioral and Neural Biology* 25, n° 4 (abril de 1979): 545–54. [https://doi.org/10.1016/S0163-1047\(79\)90332-7](https://doi.org/10.1016/S0163-1047(79)90332-7).
- Sturman, Oliver, Pierre-Luc Germain, e Johannes Bohacek. “Exploratory Rearing: A Context- and Stress-Sensitive Behavior Recorded in the Open-Field Test”. *Stress* 21, n° 5 (3 de setembro de 2018): 443–52. <https://doi.org/10.1080/10253890.2018.1438405>.
- Takahashi, Joseph S., e Martin Zatz. “Regulation of Circadian Rhythmicity”. *Science* 217, n° 4565 (17 de setembro de 1982): 1104–11. <https://doi.org/10.1126/science.6287576>.
- Taufique, S.K. Tahajjul, Abhilash Prabhat, e Vinod Kumar. “Constant Light Environment Suppresses Maturation and Reduces Complexity of New Born Neuron Processes in the Hippocampus and Caudal Nidopallium of a Diurnal Corvid: Implication for Impairment of the Learning and Cognitive Performance”.

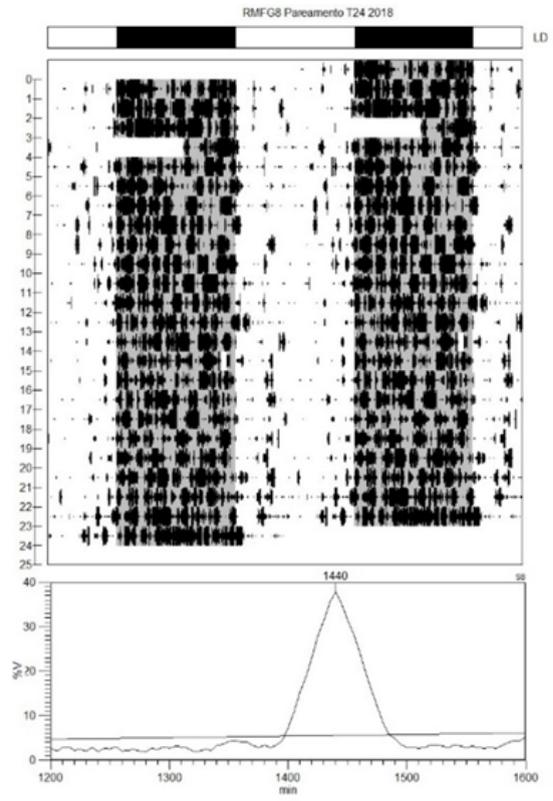
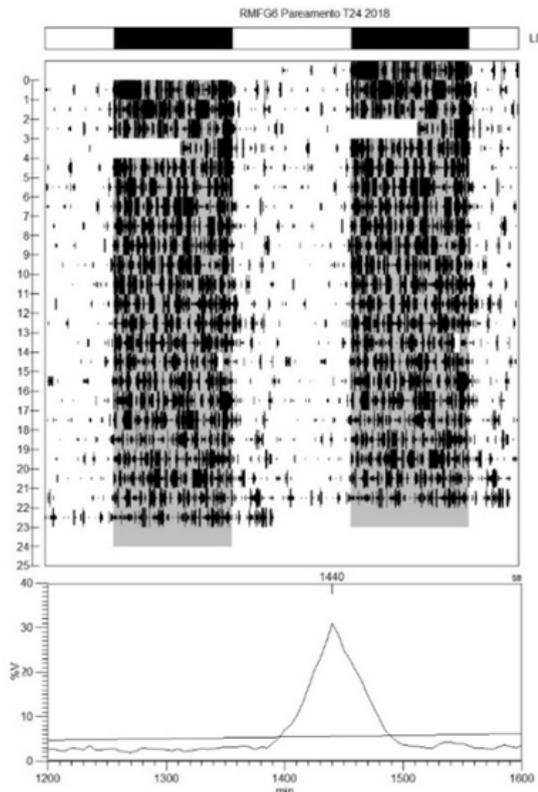
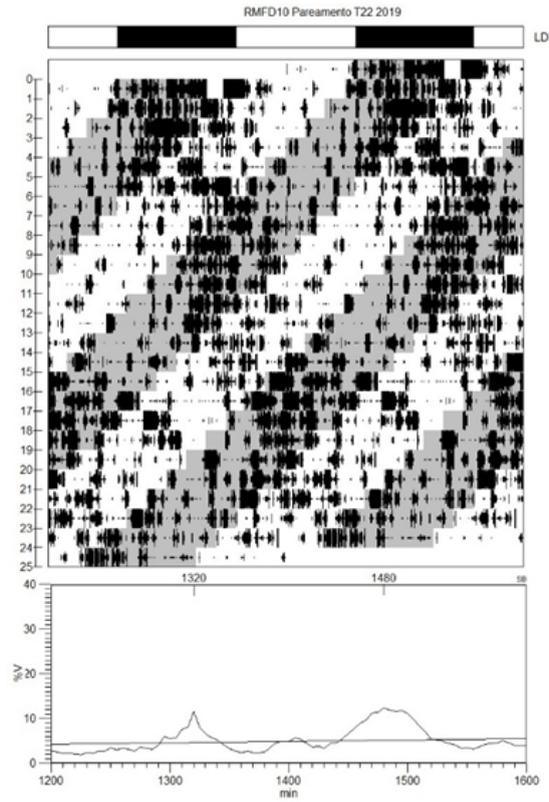
- Neurobiology of Learning and Memory* 147 (janeiro de 2018): 120–27. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2017.12.001>.
- Tsang, Anthony H, Johanna L Barclay, e Henrik Oster. “Interactions between Endocrine and Circadian Systems”. *Journal of Molecular Endocrinology* 52, n° 1 (fevereiro de 2014): R1–16. <https://doi.org/10.1530/JME-13-0118>.
- Turek, Fred W. “Circadian Rhythms”. In *Proceedings of the 1992 Laurentian Hormone Conference*, 43–90. Elsevier, 1994. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-571149-4.50007-6>.
- Vadnie, Chelsea A., e Colleen A. McClung. “Circadian Rhythm Disturbances in Mood Disorders: Insights into the Role of the Suprachiasmatic Nucleus”. Organizado por Harry Pantazopoulos. *Neural Plasticity* 2017 (5 de novembro de 2017): 1504507. <https://doi.org/10.1155/2017/1504507>.
- Vitaterna, M. H., C. P. Selby, T. Todo, H. Niwa, C. Thompson, E. M. Fruechte, K. Hitomi, et al. “Differential Regulation of Mammalian Period Genes and Circadian Rhythmicity by Cryptochromes 1 and 2”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, n° 21 (12 de outubro de 1999): 12114–19. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.21.12114>.
- Whishaw, I, O Gharbawie, B Clark, e H Lehmann. “The Exploratory Behavior of Rats in an Open Environment Optimizes Security”. *Behavioural Brain Research* 171, n° 2 (10 de agosto de 2006): 230–39. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.03.037>.

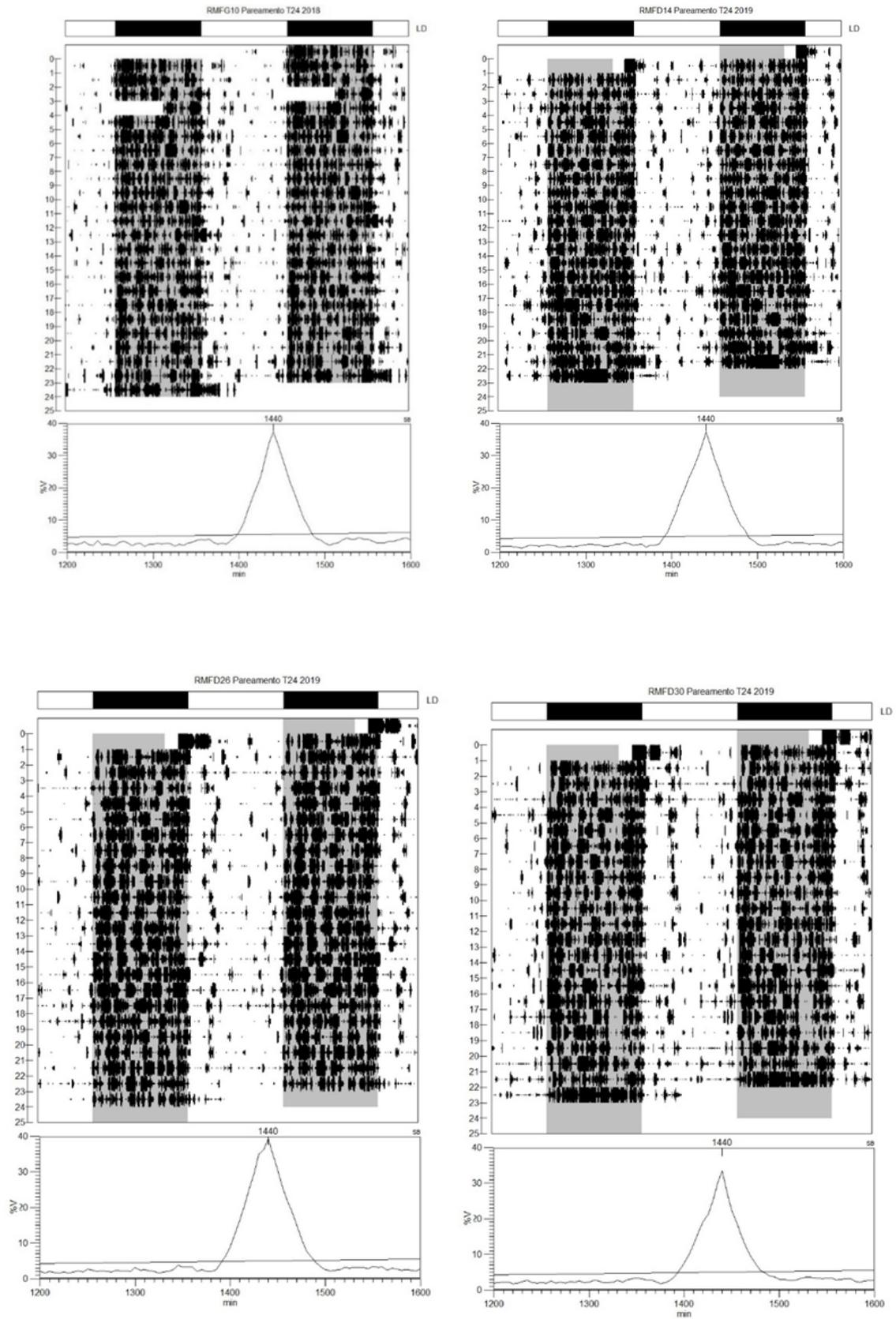
9. Anexos

9.1. Gráficos - Infância

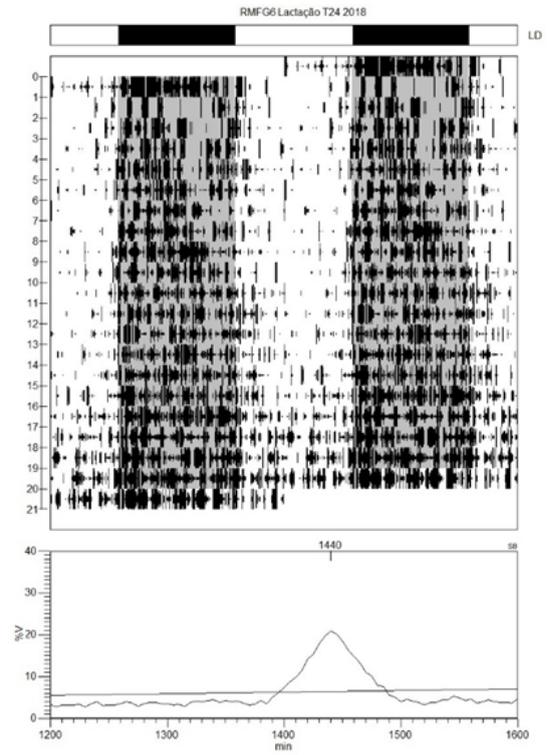
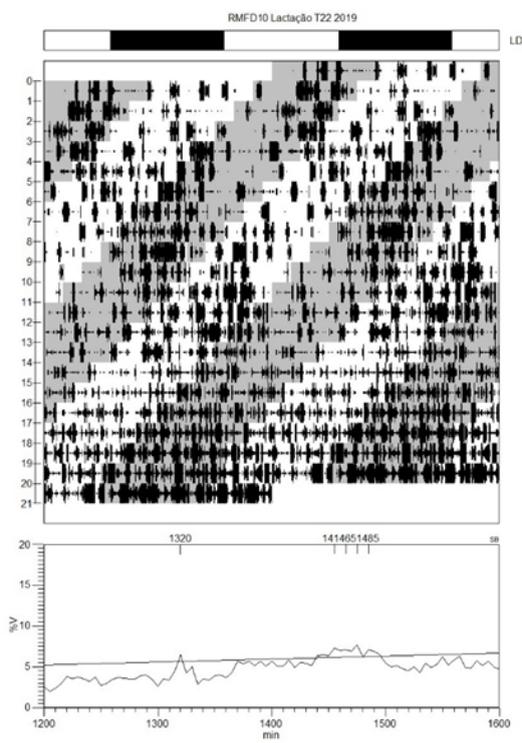
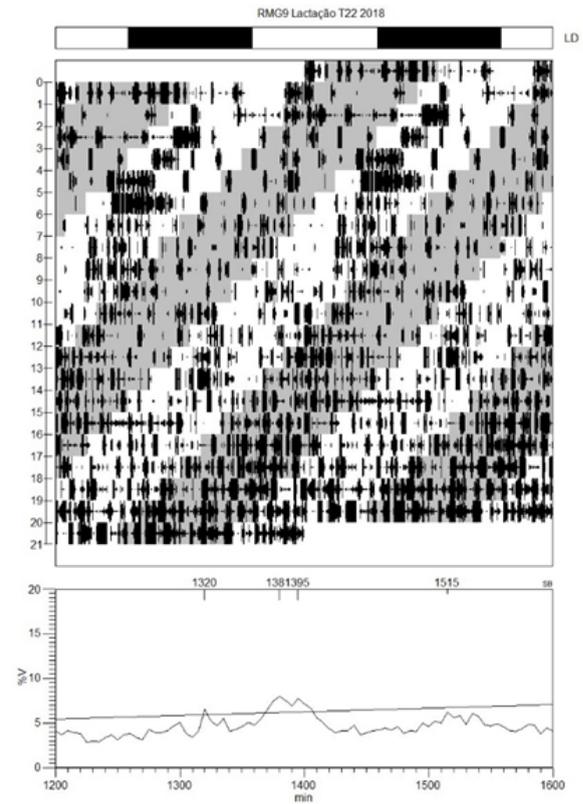
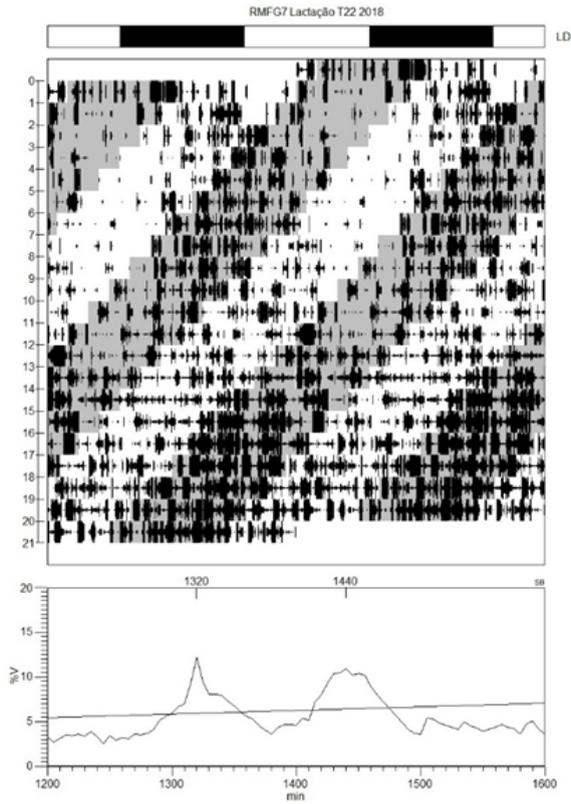
9.1.1. Pareamento

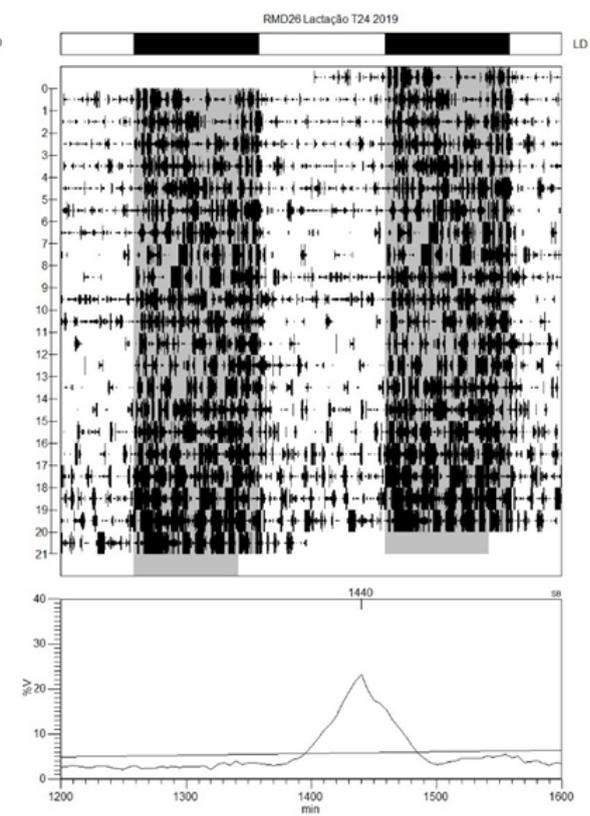
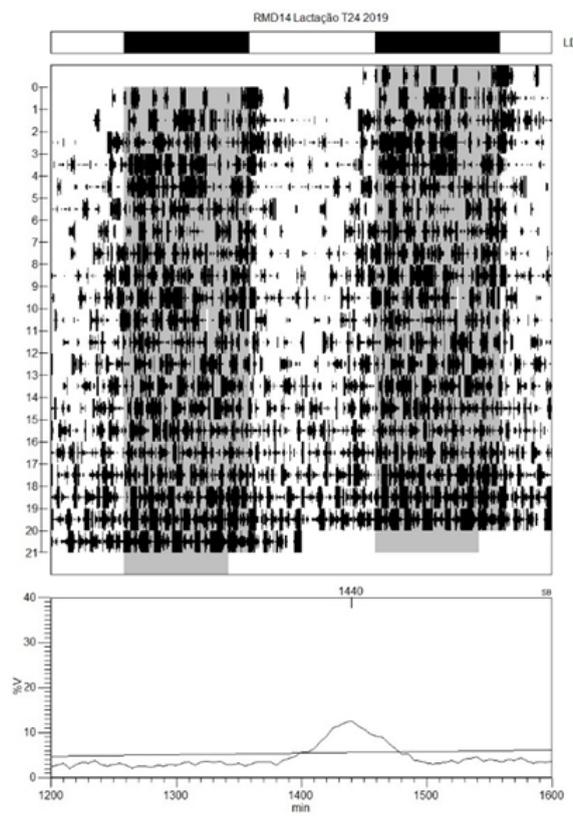
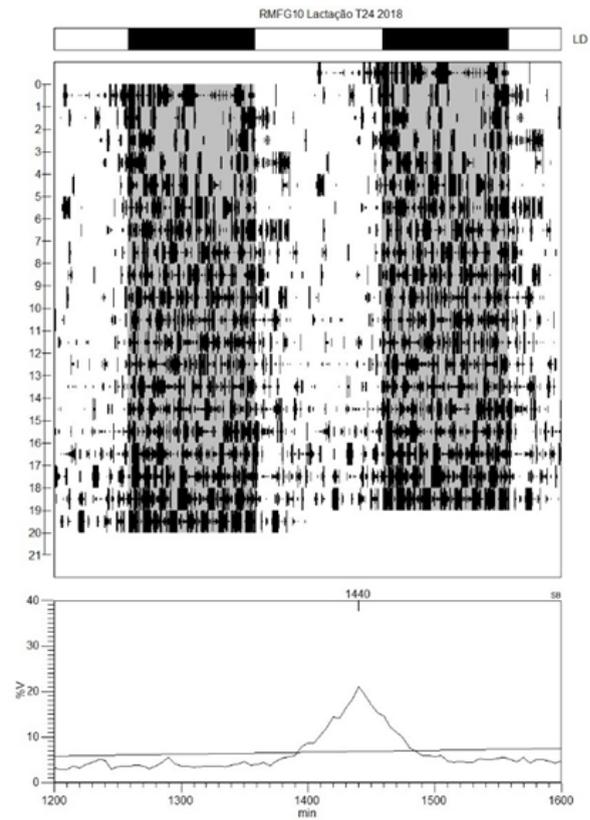
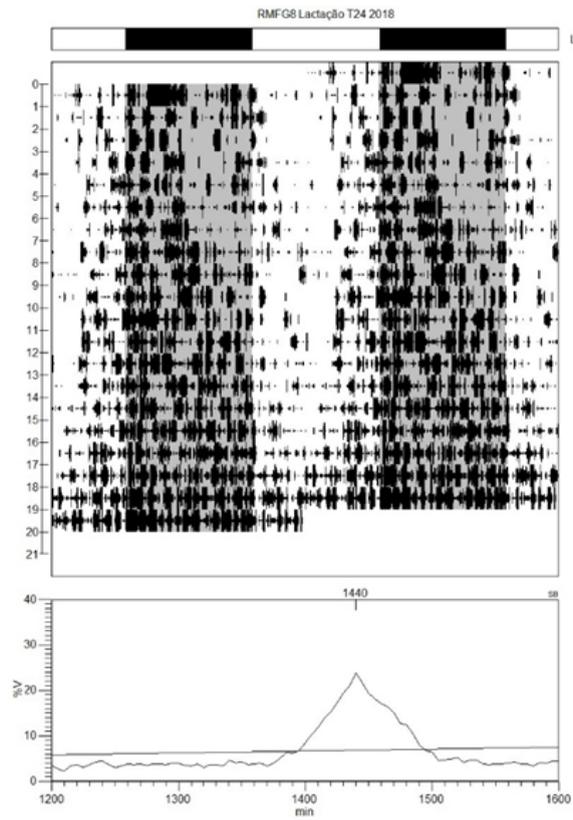


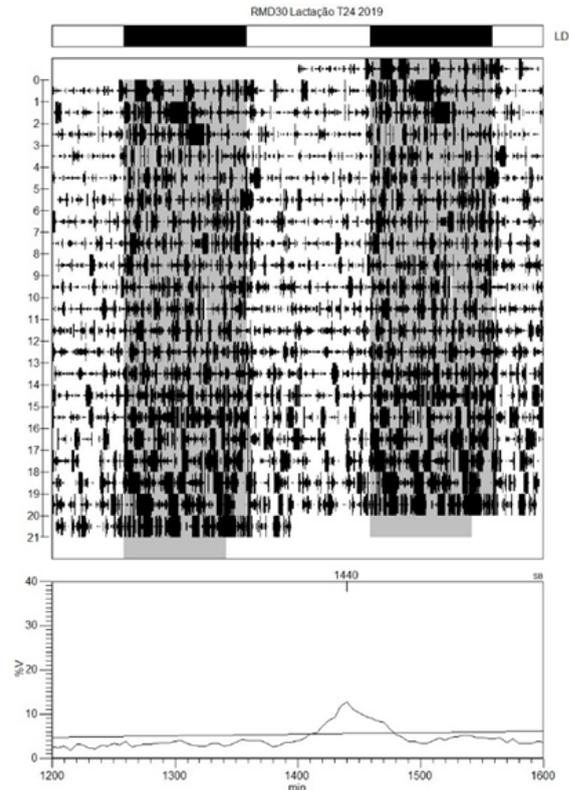




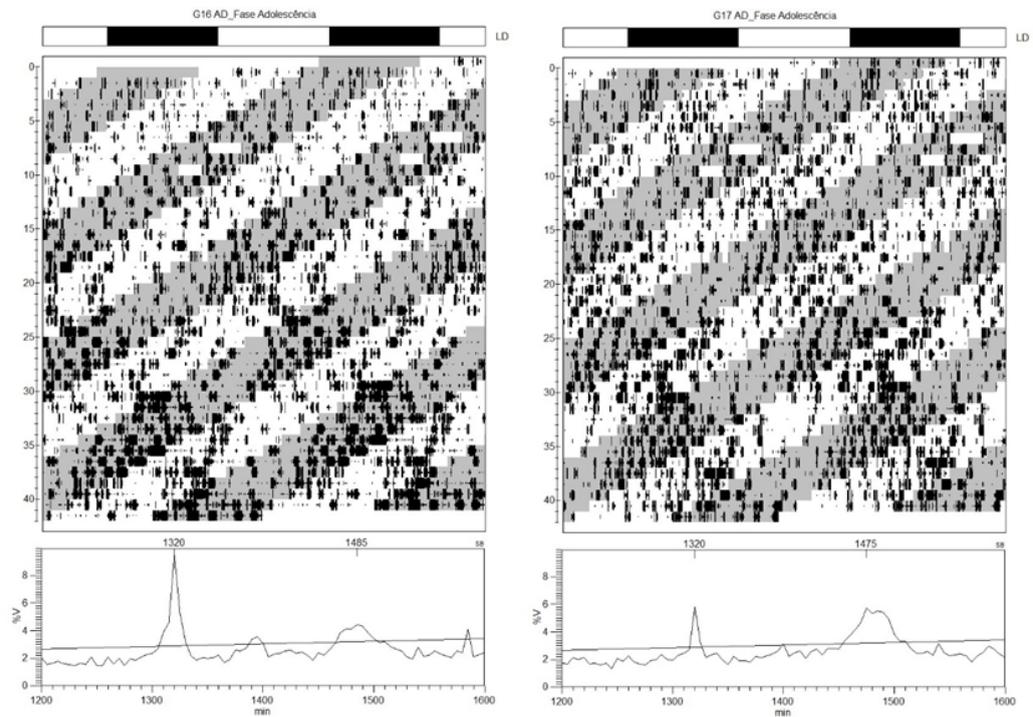
9.1.2. Lactação

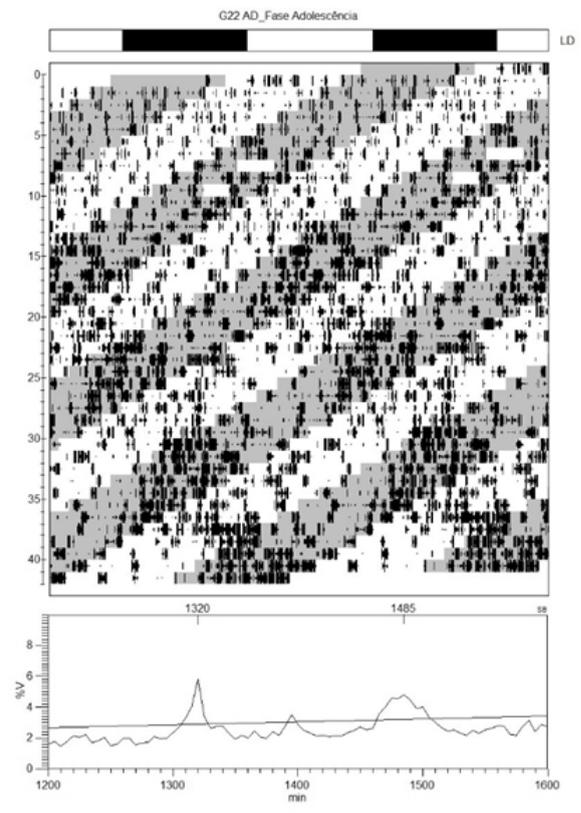
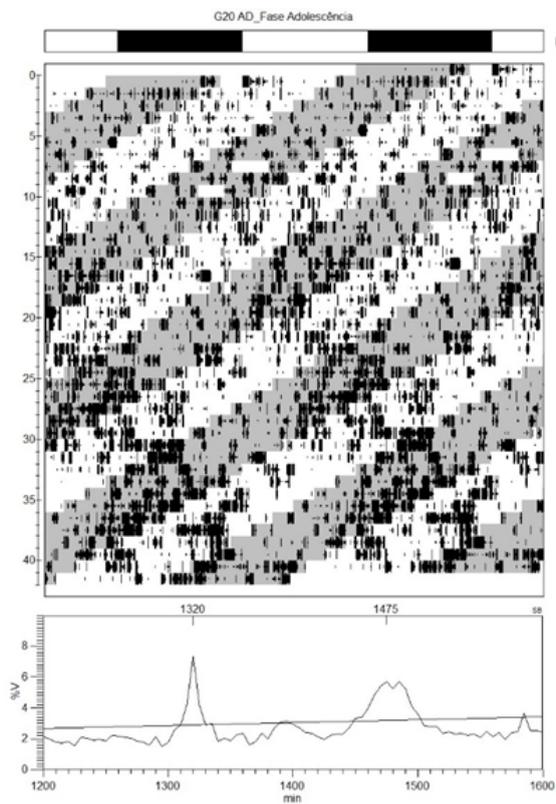
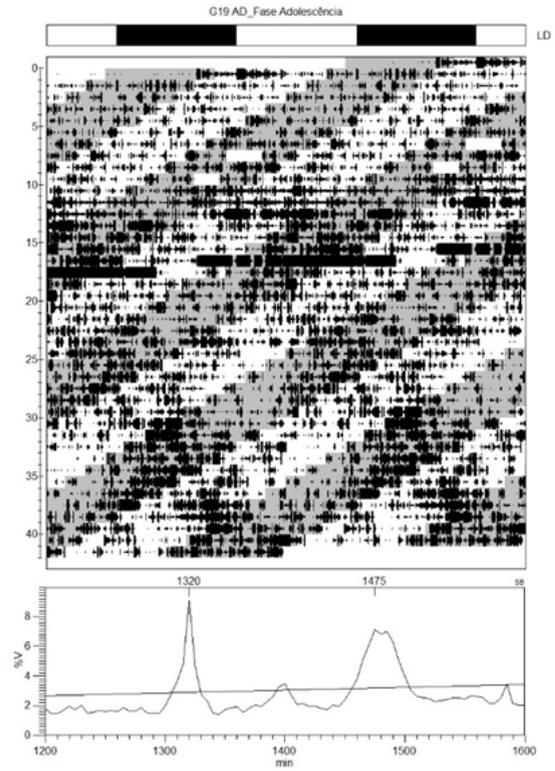
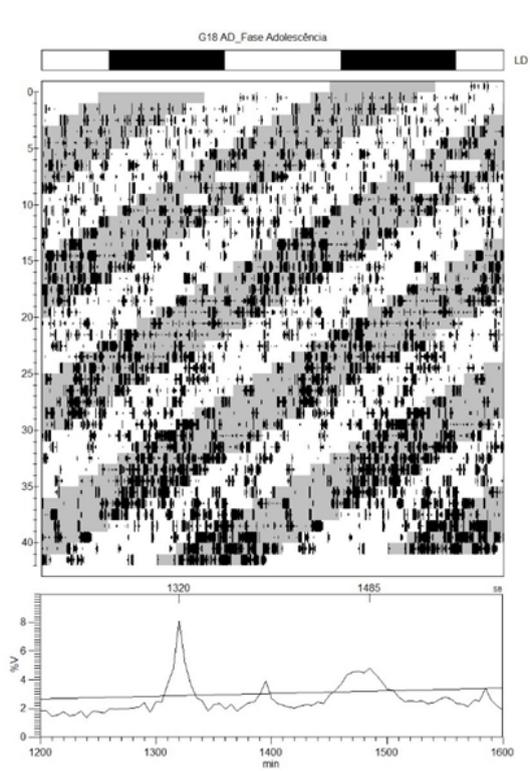


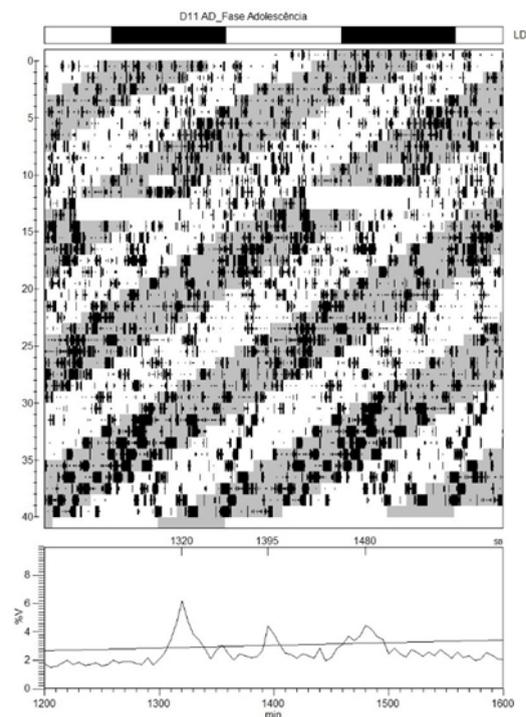
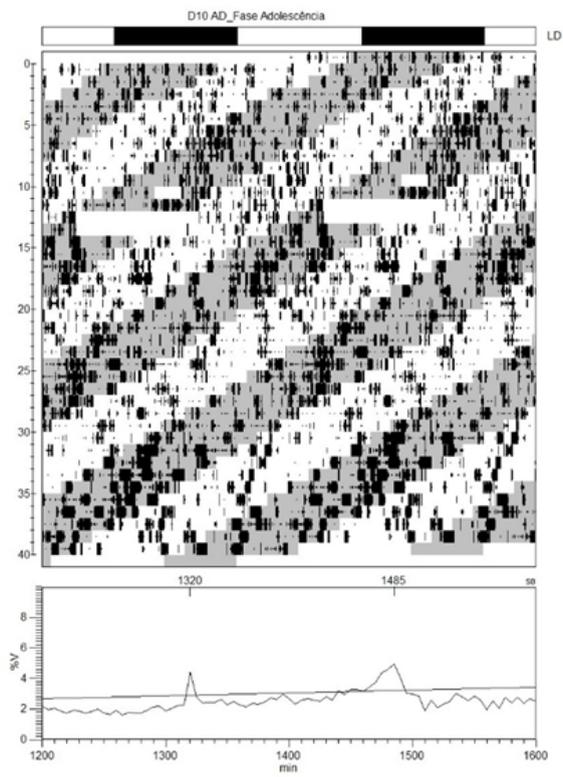
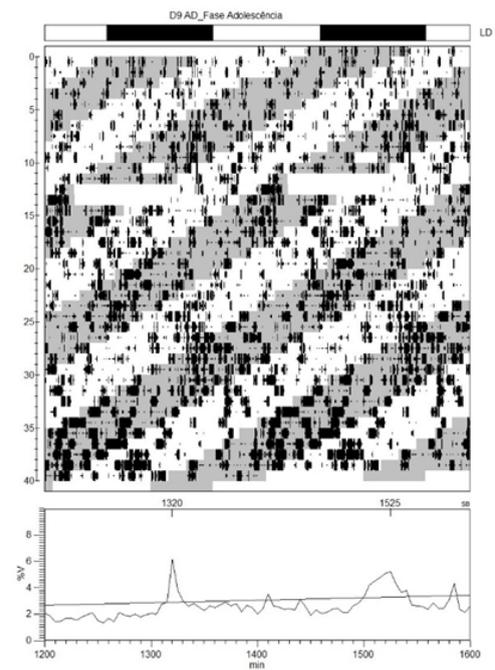
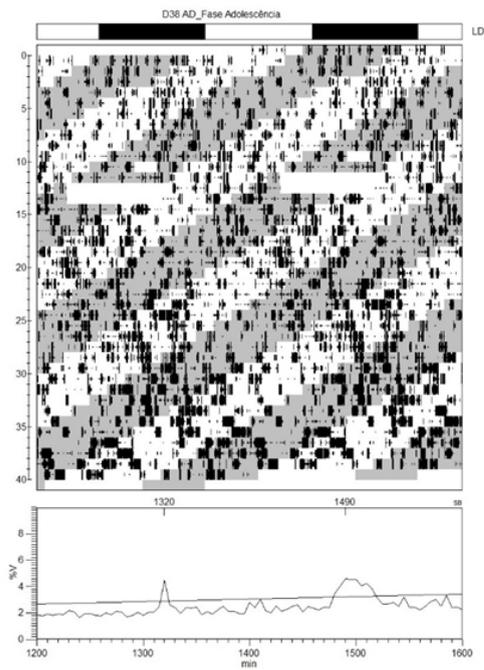




9.2. Gráficos - Adolescência

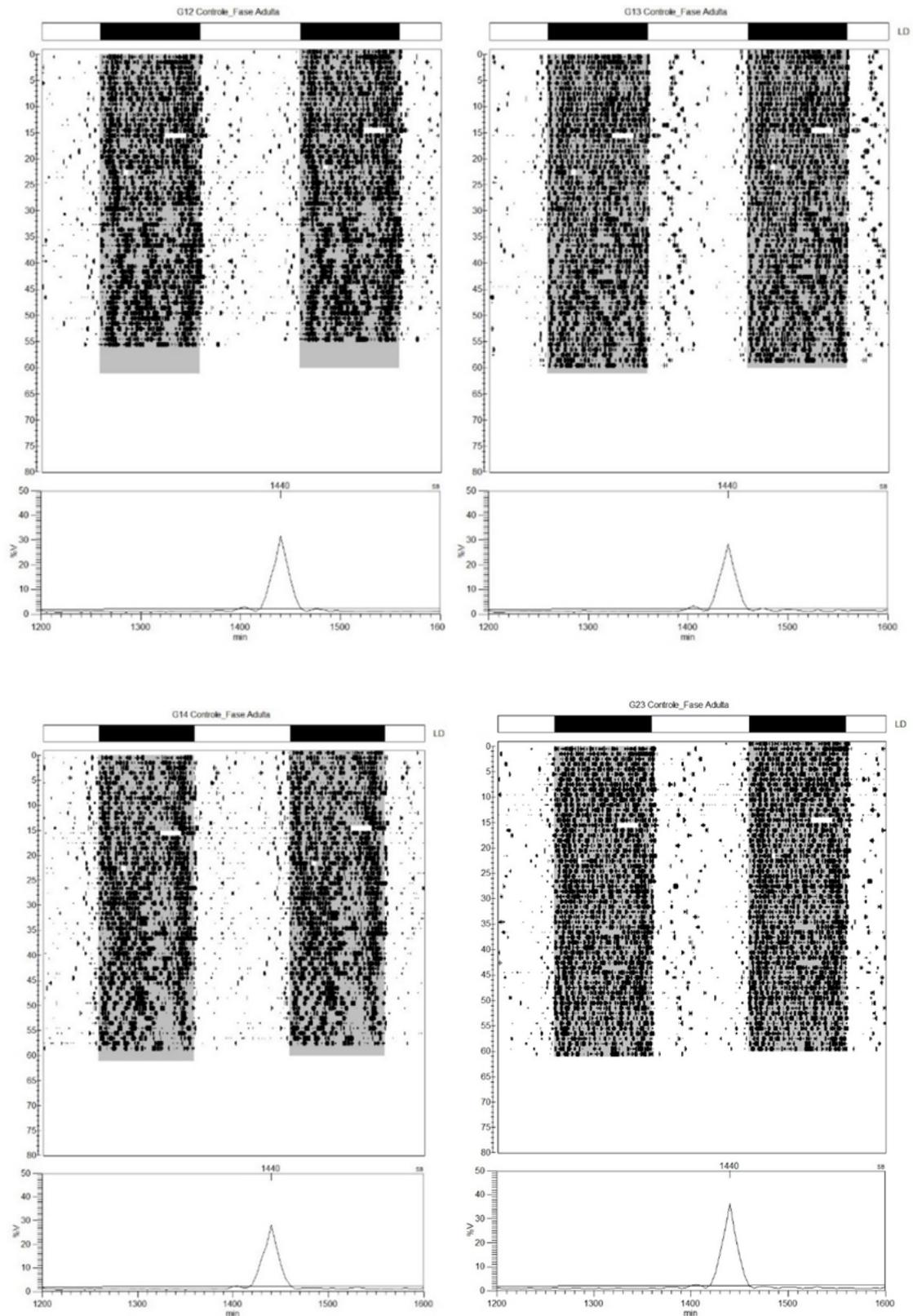


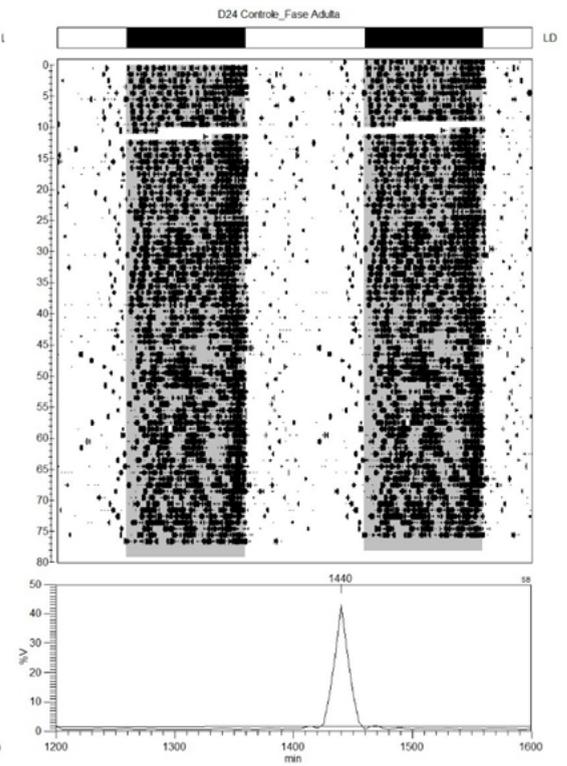
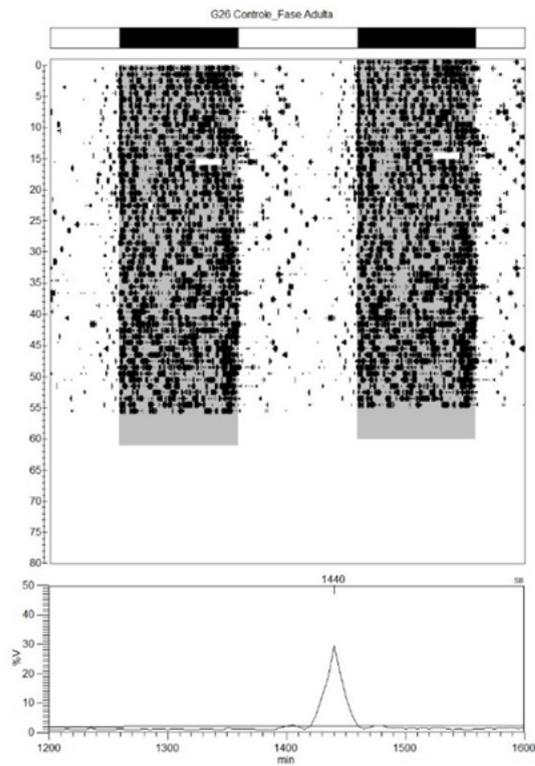
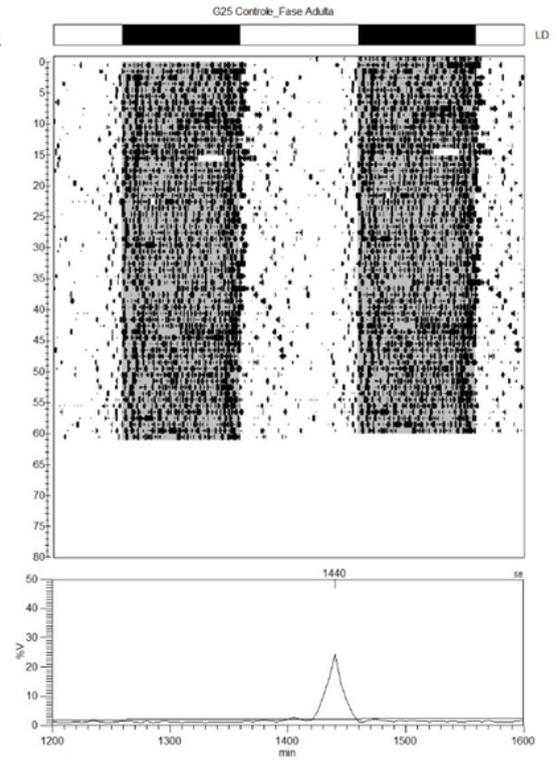
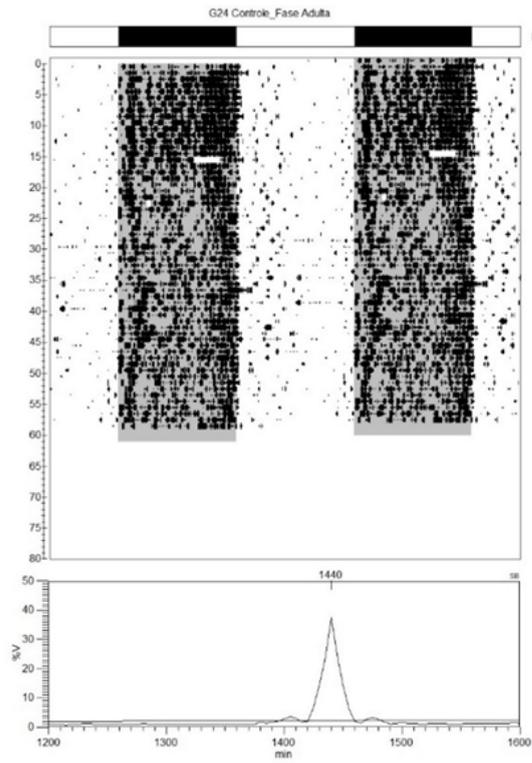


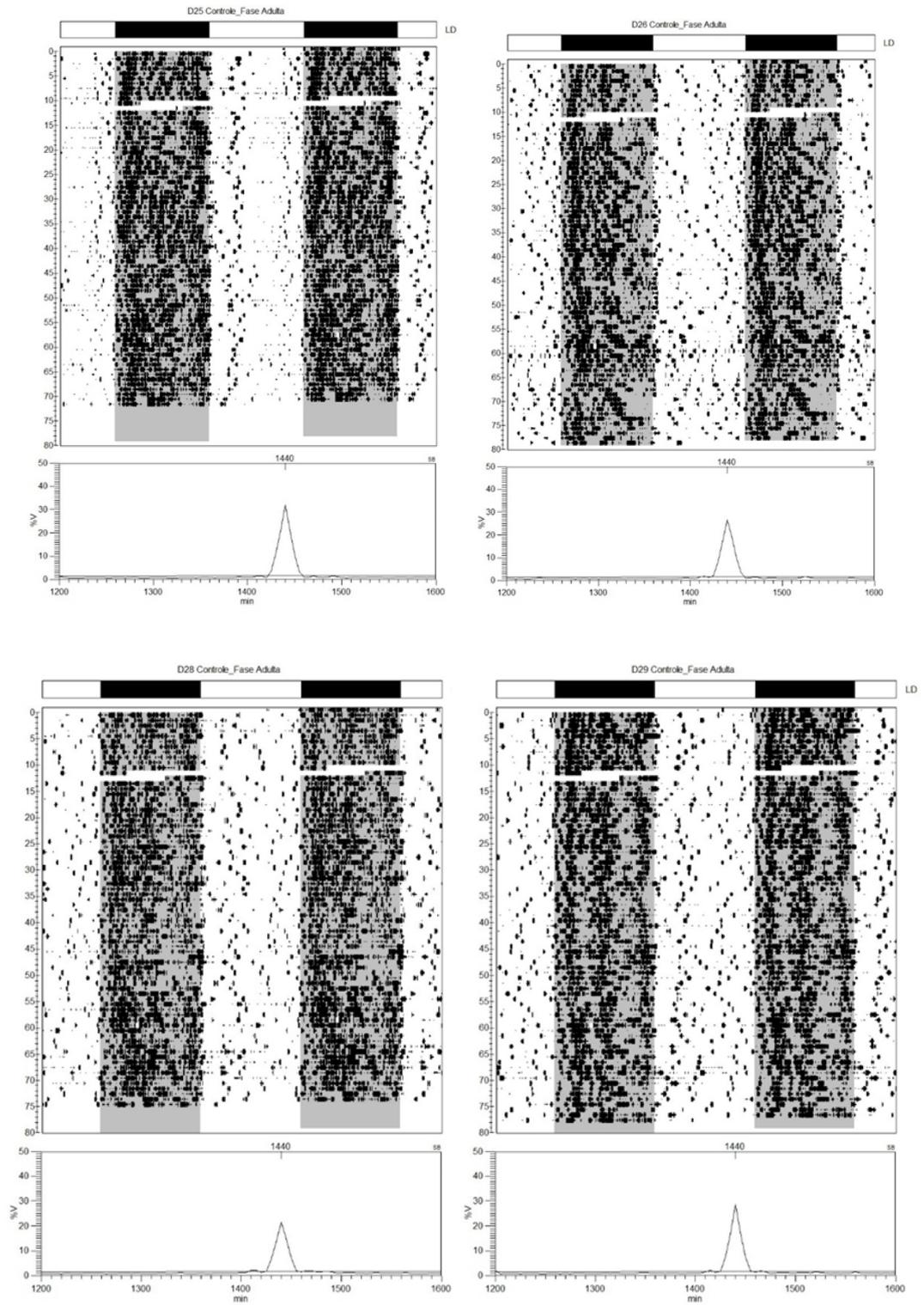


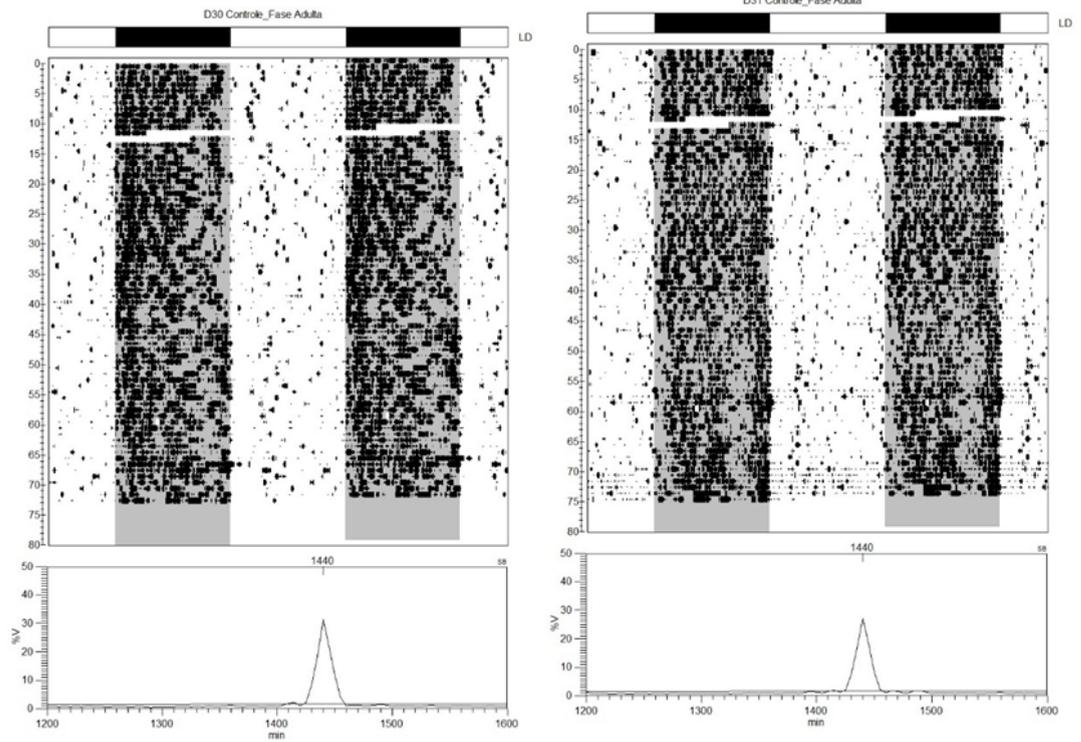
9.3. Gráficos - Fase Adulta

9.3.1. Grupo Controle- Fase Adulta

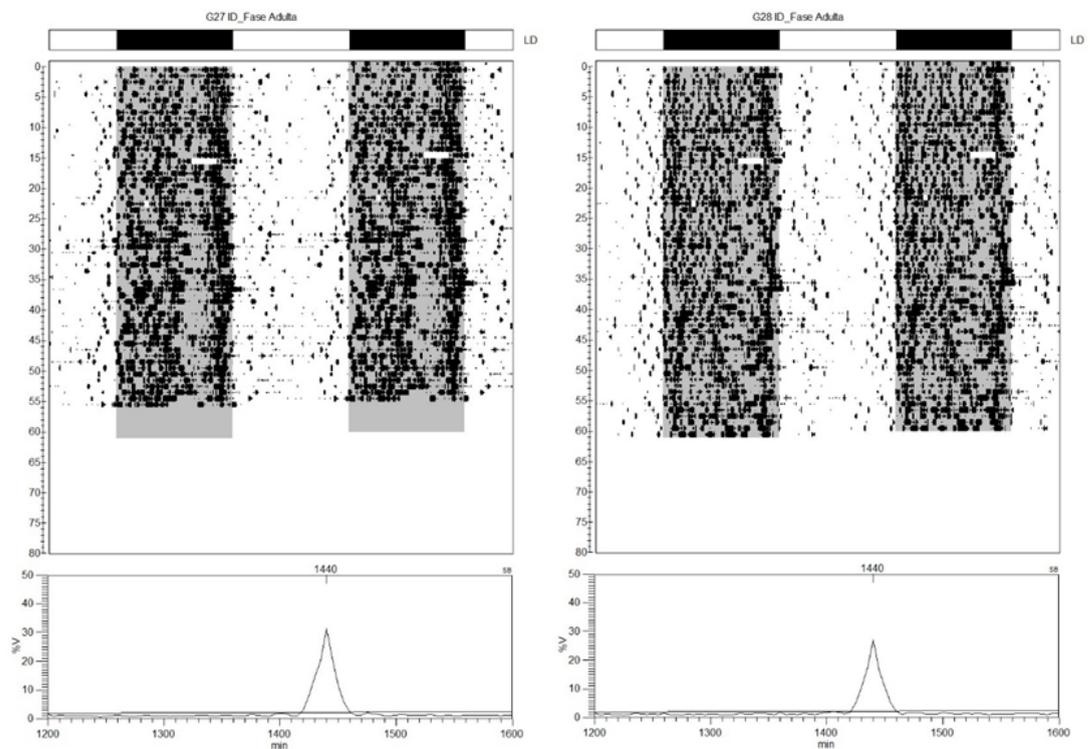


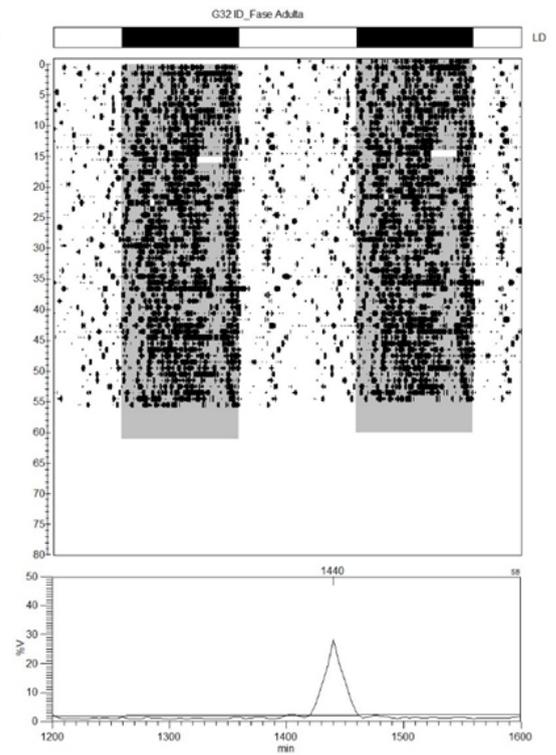
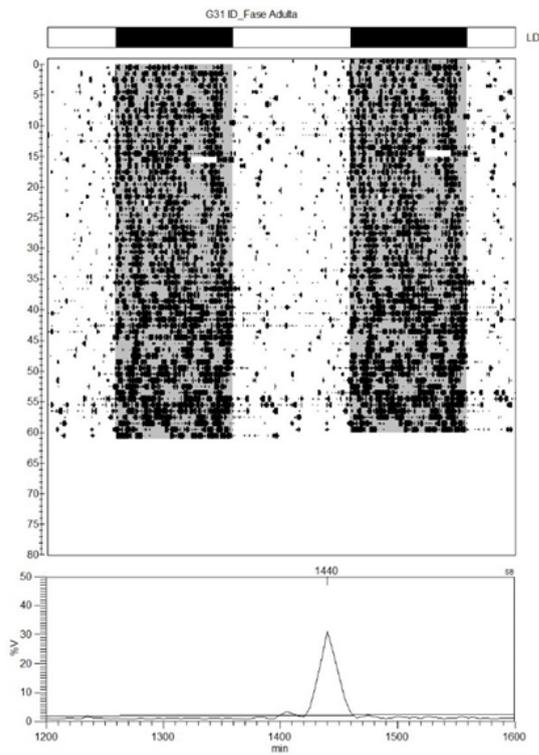
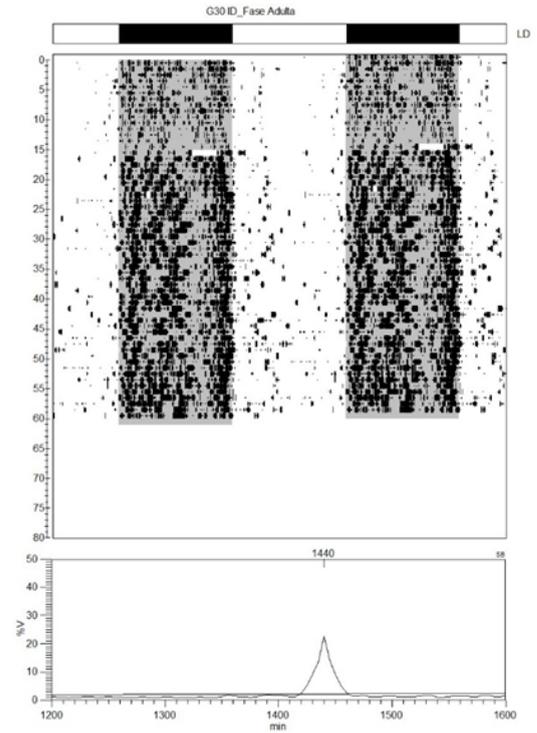
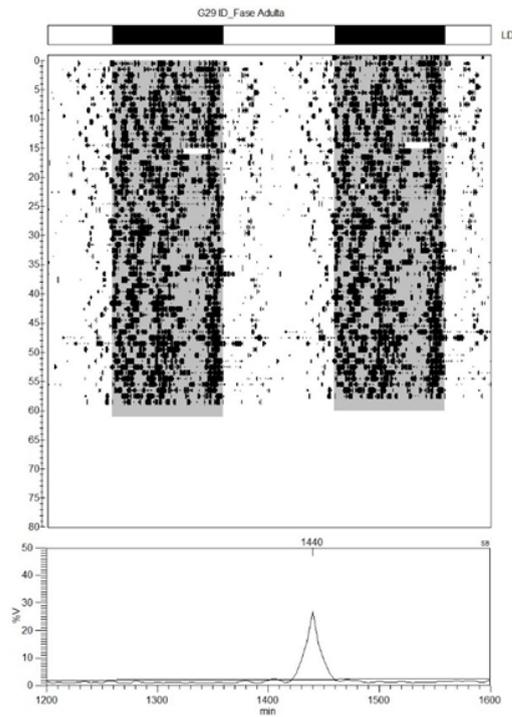


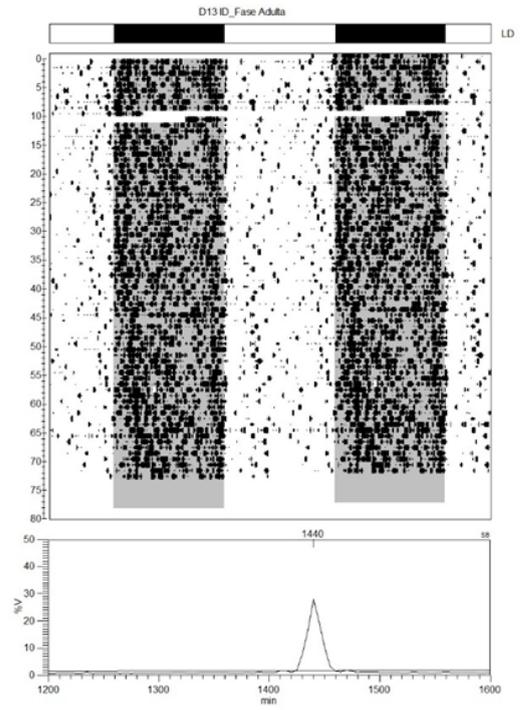
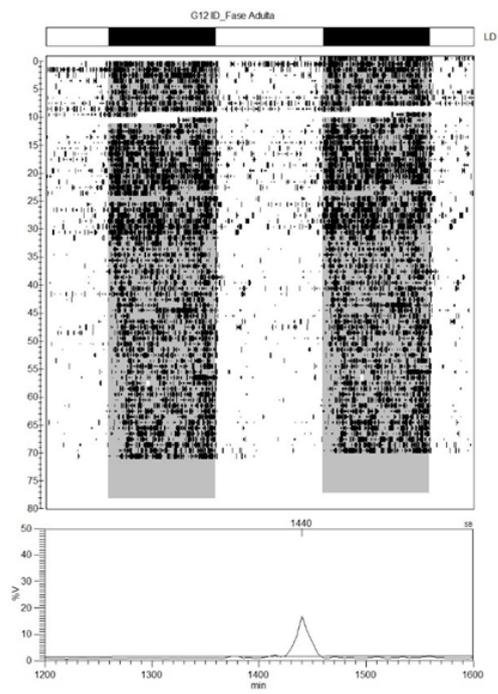
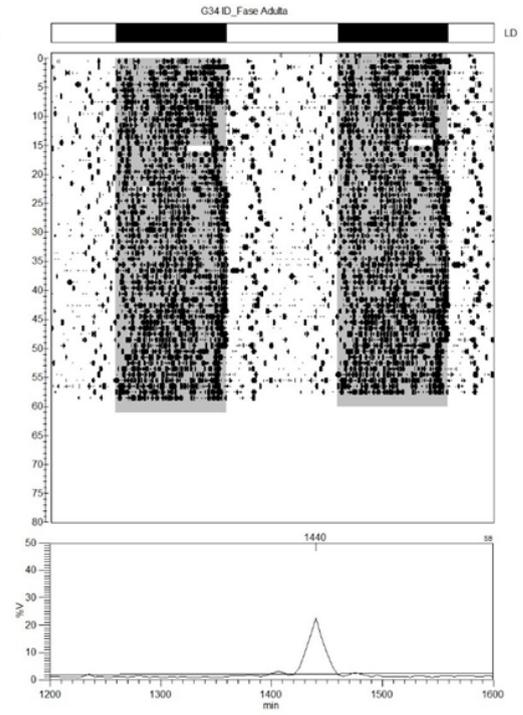
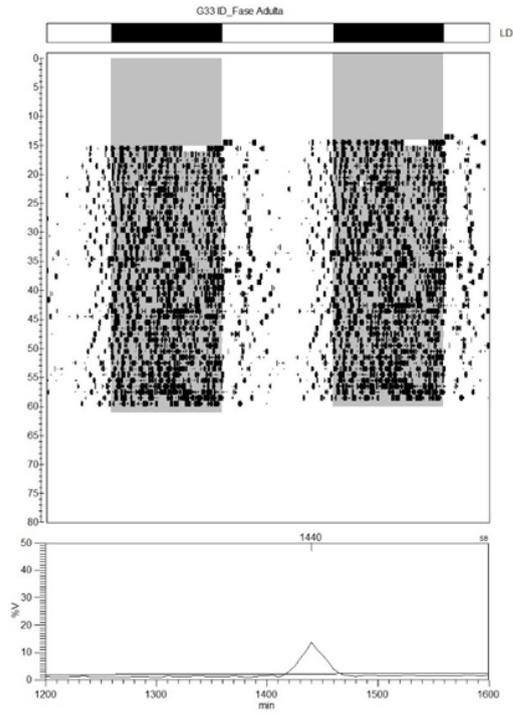


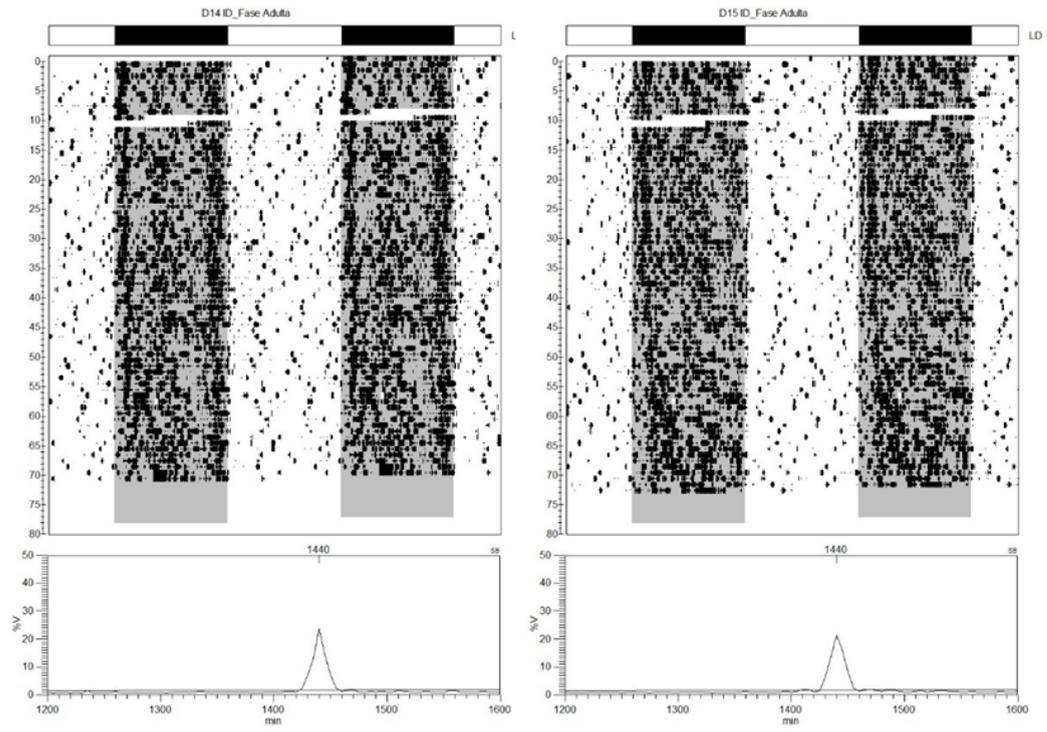


9.3.2. Grupo Infância D- Fase Adulta

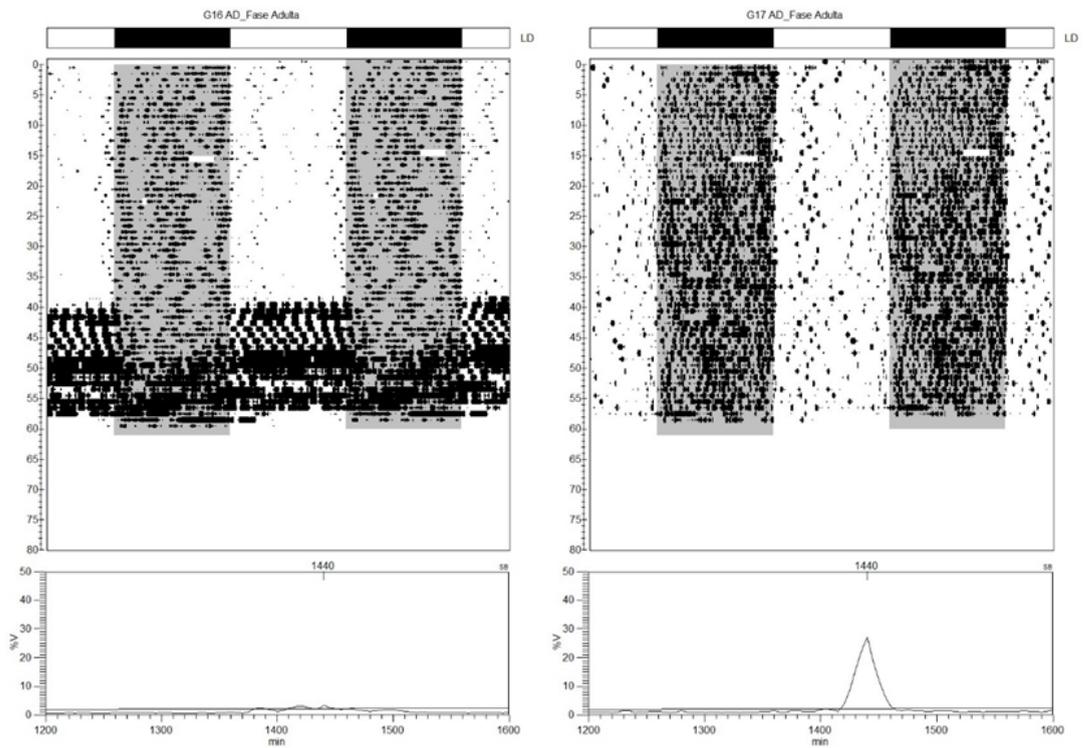


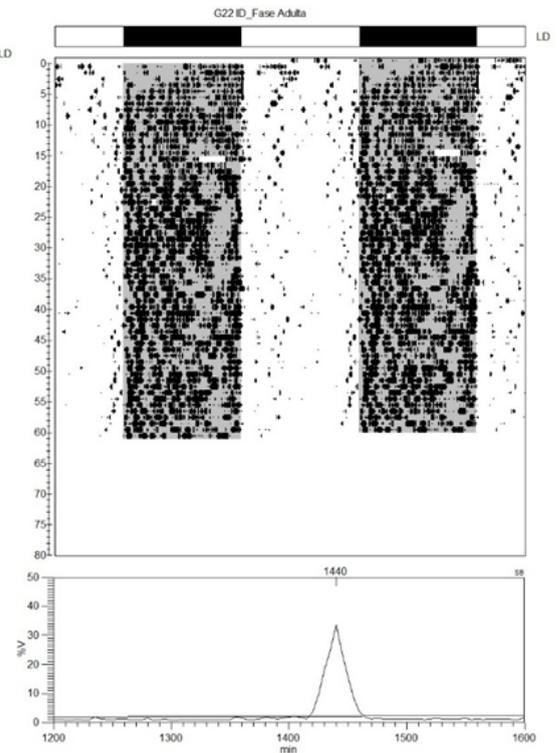
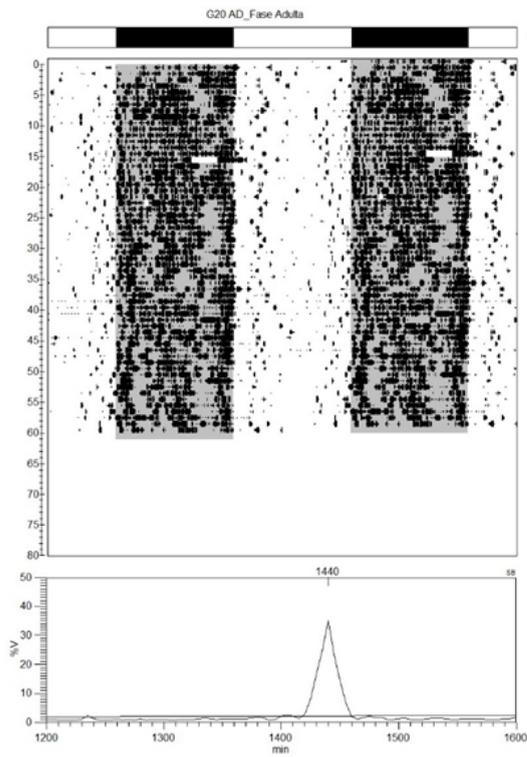
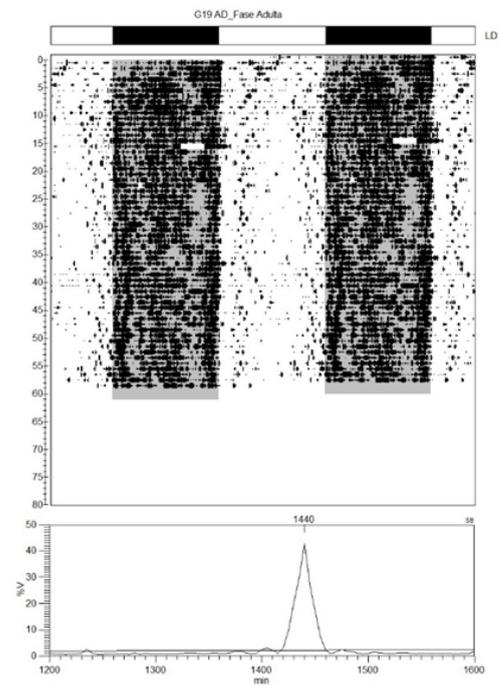
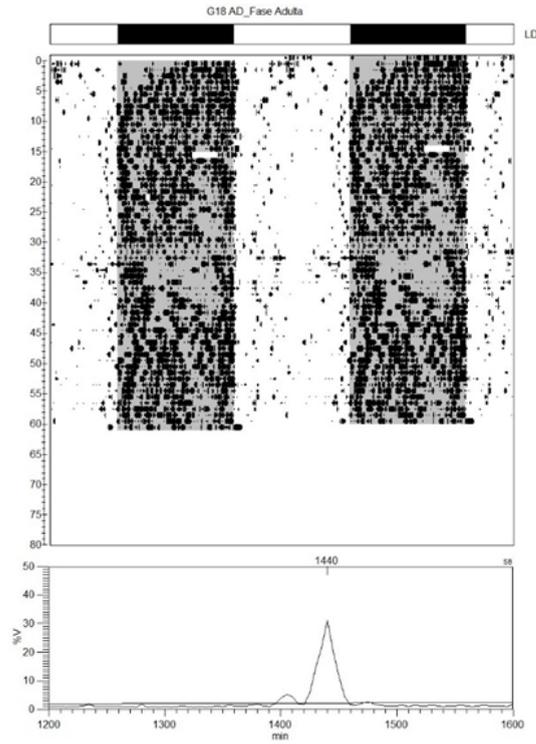


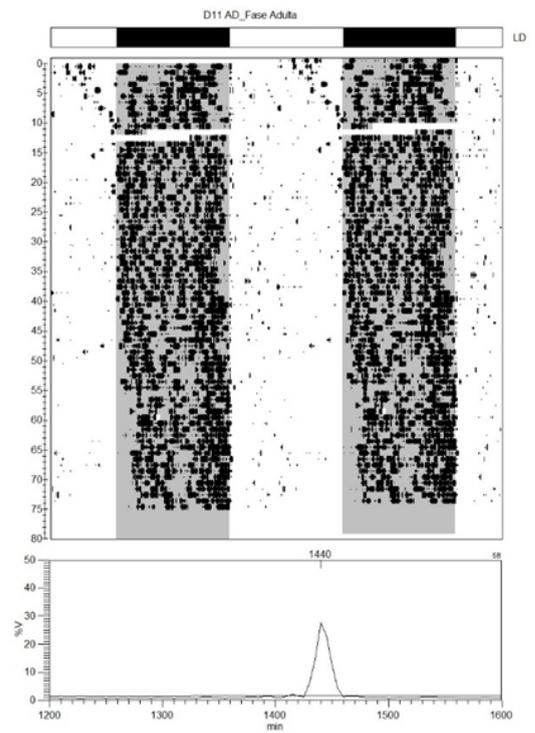
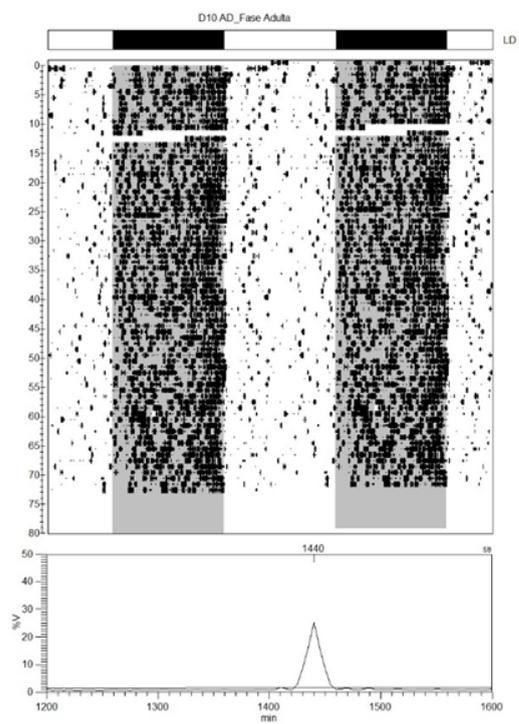
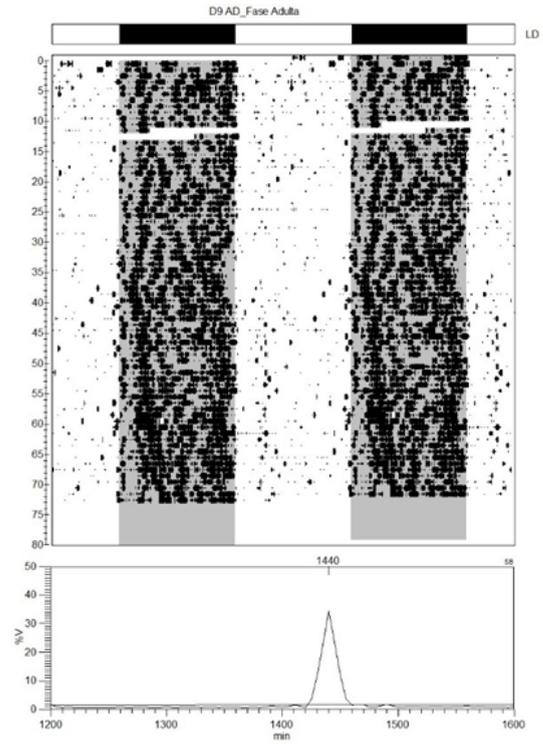
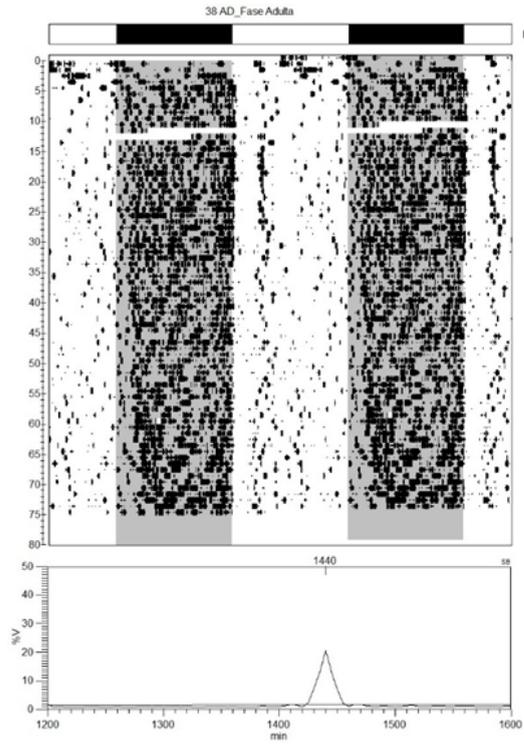




9.3.3. Grupo Adolescência- Fase Adulta







9.4. Certificado CEUA



Universidade
Federal da
Paraíba

Comissão de Ética no
Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos da dessincronização interna na memória, ansiedade e depressão de ratos Wistar ao longo da ontogênese", protocolada sob o CEUA nº 5688110518 (ID 000297), sob a responsabilidade de **Adriana Maria Fernandes de Oliveira Golzio e equipe; Crhistiane Andressa da Silva; Karen Cristina Pugliane** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) na reunião de 17/07/2018.

We certify that the proposal "Effects of internal desynchronization on memory, anxiety and depression of Wistar rats along ontogenesis", utilizing 12 Heterogenics rats (12 males), protocol number CEUA 5688110518 (ID 000297), under the responsibility of **Adriana Maria Fernandes de Oliveira Golzio and team; Crhistiane Andressa da Silva; Karen Cristina Pugliane** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Paraíba (CEUA/UFPB) in the meeting of 07/17/2018.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 08/2018 a 07/2019 Área: Psicologia

Origem: Unidade de Produção Animal - IPeFarM

Espécie: Ratos heterogênicos

sexo: Machos

idade: 3 a 4 meses

N: 12

Linhagem: Rattus Norvegicus - Wistar

Peso: 300 a 350 g

Local do experimento: Laboratório de Estudo da memória e Cognição (Lemcog) - Universidade Federal da Paraíba (Campus I)

João Pessoa, 19 de julho de 2018

Profa. Dra. Islania Gisela Albuquerque Gonçalves
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. Ricardo Romão Guerra
Vice-Cordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba