



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

Centro de Ciência Humanas, Letras e Artes

Programa de Pós-Graduação em Neurociência Cognitiva e Comportamento

Karen Cristina Pugliane

**EFEITOS DA DESSINCRONIZAÇÃO CIRCADIANA NOS ESTÁGIOS INICIAIS DA
ONTOGÊNESE EM PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS RELACIONADOS À
RITMICIDADE, METABOLISMO, MEMÓRIA, ANSIEDADE E DEPRESSÃO EM RATOS
*WISTAR ADULTOS.***

João Pessoa

2021

Karen Cristina Pugliané

**EFEITOS DA DESSINCRONIZAÇÃO CIRCADIANA NOS ESTÁGIOS INICIAIS DA
ONTOGÊNESE EM PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS RELACIONADOS À
RITMICIDADE, METABOLISMO, MEMÓRIA, ANSIEDADE E DEPRESSÃO EM RATOS
*WISTAR ADULTOS.***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociência Cognitiva e Comportamento (PPGNeC) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) para obtenção do título de Mestra.

Orientador: Dr. Flávio Freitas Barbosa

Co-orientadora: Dr^a Rochele Castelo-Branco

João Pessoa

2021

**EFEITOS DA DESSINCRONIZAÇÃO CIRCADIANA NOS ESTÁGIOS
INICIAIS DA ONTOGÊNESE EM PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS
RELACIONADOS À RITMICIDADE, METABOLISMO, MEMÓRIA,
ANSIEDADE E DEPRESSÃO EM RATOS WISTAR ADULTOS.**

Karen Cristina Puglianе

Assinatura da banca examinadora atestando que a presente dissertação foi defendida e
aprovada em 30/09/2021

Flávio Freitas Barbosa

Prof. Dr. Flávio Freitas Barbosa (Orientador/UFPB)

Ywlliane da Silva Rodrigues Meurer

Profª. Drª. Ywlliane da Silva Rodrigues Meurer (Membro Interno/UFPB)

Bruna Del Vechio Koike

Profª. Drª. Bruna Del Vechio Koike (Membro Externo/UNIVASF)

João Pessoa

2021

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

P978e Pugliane, Karen Cristina.

Efeitos da dessincronização circadiana nos estágios iniciais da ontogênese em parâmetros comportamentais relacionados à ritmicidade, metabolismo, memória, ansiedade e depressão em ratos Wistar adultos / Karen Cristina Pugliane. - João Pessoa, 2021.

122 f. : il.

Orientação: Flávio Freitas Barbosa.

Coorientação: Rochele Castelo-Branco.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCHLA.

1. Ontogênese animal. 2. Dessincronização forçada.
3. Ratos Wistar. 4. Comportamento. 5. Cronobiologia. I. Barbosa, Flávio Freitas. II. Castelo-Branco, Rochele.
- III. Título.

UFPB/BC

CDU 591.3(043)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho e a gratidão de toda uma vida à minha amada família, em especial às mulheres que me criaram: minha avó Maria Francisca da Conceição, minha mãe Francisca Aparecida Silva e minha tia Francisca Maria, gratidão por todo o apoio e toda a força. Aos meus orientadores Flávio Freitas Barbosa e Rochele Castelo-Branco pelos maravilhosos anos de orientação e amizade. À Christiane Andressa da Silva por me introduzir ao fascinante mundo da Cronobiologia e ter idealizado esse projeto. Vocês me inspiram!

“Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes.”

Isaac Newton

Boa culinária não é para os fracos de coração. É para as mentes criativas! Corações fortes! As coisas podem até dar errado, mas não deve deixar ninguém definir seus limites a partir de sua origem. O único limite é sua alma.

Ratatouille

Palavras são, na minha nada humilde opinião, nossa inesgotável fonte de magia.

Alvo Dumbledore

Pode se encontrar a felicidade mesmo nas horas mais sombrias, se a pessoa se lembrar de acender a luz.

Alvo Dumbledore

AGRADECIMENTOS

Se tem algo que aprendi ao longo da minha trajetória é que ciência não se faz sozinha/sozinho. A vida em si se estrutura através da cooperação e juntos não apenas chegamos mais longe, como também chegamos mais fortes. Se estou hoje realizando o meu sonho, foi por ter encontrado ao longo do meu caminho pessoas que foram para mim grandes fontes de inspiração, motivação e apoio, que me impulsionaram a não desistir mesmo ante às situações mais difíceis e inesperadas: Essa vitória é nossa! Queria poder colocar aqui o nome de cada pessoa que transformou minha vida e ampliou minha maneira de pensar, tenho a honra de dizer que foram muitas. Como o espaço é limitado, vou tentar me conter neste momento de emoção e homenagear brevemente pessoas que me acompanharam um pouco mais de perto ao longo desses anos de Mestrado.

Primeiramente preciso salientar o quanto a carreira acadêmica se transformou em um sonho para mim, desde o primeiro momento em que soube que fazer ciência era possível, que não era uma realidade tão distante, inclusive para uma menina nascida e criada no interior. Essa descoberta não teria acontecido sem oportunidades, que vieram por meio dos investimentos na interiorização dos Institutos Federais e Universidades, investimento esse que mudou muitas vidas, incluindo a minha. Obrigada ao Instituto Federal de Ciência e Tecnologia da cidade de Currais Novos, interior do Rio Grande do Norte, e agradeço também ao meu primeiro orientador Miguel Fernandes Kolodiuk, que foi o primeiro a acreditar no meu trabalho e no meu potencial para cientista.

Para as pessoas as quais devo a vida e tudo que sou, todo o meu amor e gratidão à minha amada família. Vocês são minha base, raízes e essência, me deram força e coragem para enfrentar essa jornada em busca de um sonho, que começou quando saí de casa aos 15 anos para percorrer meu caminho nos estudos. Vocês me apoiaram mesmo nos momentos em que nem eu mesma sabia o que fazer para realizar minhas aspirações. Com olhos fechados e coração aberto, vocês sempre confiaram em mim e não há nada na vida que eu faça ou conquiste sem dedicar a vocês. Minhas figuras maternas, de força, garra, coragem e amor: minha mãe Francisca Aparecida, minha avó Maria Francisca e minha tia Francisca Maria. Também agradeço aos meus irmãos Alice e Paulo. Às minhas figuras paternas: meu pai Osvaldo Luiz, meu tio Francisco de Assis e meu padrasto João Marcelo. Eu não consigo achar palavras para expressar tudo o que vocês representam e o quanto me orgulho de vocês.

A minha trajetória também não teria ganhado vida ou forma se não fosse o apoio dos meus queridos orientadores Flávio Freitas Barbosa e Rochele Castelo-Branco, vocês foram meus guias ao longo de toda essa jornada, minhas fontes de inspiração e para além de orientadores sinto que ganhei amigos para toda uma vida. Eu jamais conseguirei agradecer a vocês o suficiente por me mostrarem como um verdadeiro educador deve ser: pessoas que se importam, que não tratam o conhecimento como algo mecânico e fora de contexto, mas como uma ferramenta de transformação. Ter vocês como mentores foi para mim uma grande honra. E aproveitando meu agradecimento aos mestres, não posso deixar de falar da Christiane Andressa da Silva, idealizadora da Crono-Lemcog, aquela que não só abriu, mas construiu as portas da Cronobiologia para que pudéssemos aprender sobre esse tema tão fascinante.

Como Ciência não se faz sozinha/sozinho, o que seria dos meus dias de laboratório sem a presença dos meus queridos amigos que me ensinaram tanto: Ingrid, Davi, Lívia, Paulo, Laís, Jeane e Kathlyn, Ana Luiza, Vanessa, Bruno, Pedro, Ana Paula, Júlio e Rafael, eu precisava colocar aqui o nome de cada um de vocês, porque a minha jornada não seria a mesma se eu não pudesse ter contado com todo o apoio emocional e todo o aprendizado que adquiri em nosso tempo de convivência nesses quase 8 anos que tenho de LEMCOG. Anos esses que contemplaram tantos experimentos e dias passados dentro do laboratório. Preciso fazer um agradecimento especial à Vanessa Soares pela participação na etapa 1 deste experimento em 2018 e Rafael Vitor, que esteve presente nos experimentos de 2019, nas etapas de análise e no auxílio das construções das tabelas, contar com o apoio de vocês fez toda a diferença e eu sou muito grata a toda a paciência, vontade de aprender e empenho que vocês demonstraram ao longo do nosso trabalho em equipe.

Além dos meus amigos do lab, também ganhei de presente amigos durante o Mestrado e aqui gostaria de homenagear meus queridos suportes da pandemia, nunca vou esquecer de todos os momentos em que nos encorajamos, de todos os desabafos, de toda a cumplicidade. Aos meus amigos, parceiros do desafio de se enfrentar a pós-graduação, que por si só é desafiadora, em tempos tão difíceis no cenário sócio-histórico: Obrigada Thaisy Campos, Danilo Menezes, Camila Machado, Heloísa Pacífico e Éryka Alves. Às mulheres que se tornaram minhas irmãs nesse trajeto, dividindo as aflições dos dias difíceis e as alegrias das conquistas: Jamile Meira, Aline Vieira, Joycimara Rodrigues, Mônica Rodrigues, Juliana Maciel, Luiza Armanda e Fernanda Gouveia, obrigada por cada cafezinho/chá e as conversas de aquecer o coração no ambiente real e virtual. Aos meus irmãos da vida, meus amigos de infância: Natália Gurgel e Valtair Neto. À Naíla, por todo o acolhimento e companheirismo, minha jornada não seria a mesma sem você e a Chele, obrigada pelos bons momentos. Torço muito pela felicidade e sucesso de cada uma/um de vocês. Ainda gostaria de registrar o meu agradecimento especial ao Ricardo Garcia, amigo querido que me apoiou tanto em todo esse processo, com todos os seus conselhos, sua paciência e sabedoria, agradeço imensamente pela amizade inspiradora e por tudo o que pude aprender com você. Você é um verdadeiro exemplo como pessoa e como profissional.

Agradeço também à Ywlliane Meurer e Bruna Koike, é uma grande alegria e uma imensa honra poder contar com a participação e colaboração de vocês neste momento tão especial. As tenho como fonte de inspiração há muito tempo e me senti bastante emocionada quando vocês gentilmente aceitaram marcar com chave de ouro o fechamento desse ciclo, participando da banca de defesa.

Que este seja um manifesto de amor
Amor pelas pessoas, pelo conhecimento
Pelo poder transformador da Ciência e Educação
Pela alegria de fazer parte de um todo
Pela oportunidade de realizar sonhos

Sumário

LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE FIGURAS.....	11
RESUMO.....	12
ABSTRACT	13
1. INTRODUÇÃO	14
1.1 O Ritmo Circadiano e sua Importância Adaptativa	14
1.2 A Ritmicidade e os Núcleos Supraquiasmáticos	15
1.3 Dessincronização Circadiana e o Protocolo T22	19
1.4 Dessincronização Circadiana e Ontogênese.....	23
1.5 Dessincronização, Memória e Transtornos de Humor	26
1.6 Justificativa	27
1.7 Objetivos.....	29
2. MÉTODO	31
2.1 Animais.....	31
2.1.1 Procedência dos Animais e Etapas do Experimento.....	31
2.1.2 Critérios de Exclusão da Amostra.....	31
2.1.3 Monitoramento do Estado de Saúde	31
2.1.4 Condições de Manutenção.....	32
2.2 Experimento de Dessincronização Forçada – Modelo T22.....	32
2.3 Medidas do Consumo de Água, Ração e Registro do Peso	34
2.4 Tarefas Comportamentais	35
2.4.1 Campo Aberto	36
2.4.2 Reconhecimento de Objeto Novo.....	37
2.4.3 Reconhecimento Espacial Associativo.....	38
2.4.4 Teste de preferência à sacarose.....	39
2.4.5 Teste de Esquiva Passiva	40
2.5 Análise dos Dados.....	41
2.5.1 Medidas do Consumo de Água, Ração e Registro do Peso	41
2.5.2 Ritmo Circadiano da Atividade Locomotora	41
2.5.3 Tarefas Comportamentais.....	42
3. RESULTADOS	45
3.1 Análise da Ritmicidade Circadiana da Atividade Locomotora	45
3.1.1 Fase Infância.....	45

3.1.2 Fase Adolescência.....	50
3.1.3 Fase Adulta	53
3.2 Análise do Peso Corporal e do Consumo de Água e Ração.....	56
3.2.1 Peso Corporal	56
3.2.2 Consumo de Ração.....	57
3.2.3 Consumo de Água	58
3.3 Tarefas Comportamentais	58
3.3.1 Campo Aberto	58
3.3.2 Reconhecimento de Objetos Novos.....	62
3.3.3 Reconhecimento Espacial Associativo.....	66
3.3.4 Preferência à sacarose	70
3.3.5 Esquiva Passiva	71
4. Discussão	73
5. Conclusão	90
Referências	91
ANEXO A: Etapas da Fase Adolescência.....	102
ANEXO B: Etapas da Fase Adulta	103
ANEXO C: Pareamento T22	104
ANEXO D: Pareamento T24	105
ANEXO E: Lactação T22	106
ANEXO F: Lactação T24.....	107
ANEXO G: Grupo Controle (Fase Adolescência)	108
ANEXO H: Grupo Infância D (Fase Adolescência)	111
ANEXO I: Grupo Adolescência D (Fase Adolescência 2018 42dias).....	113
ANEXO J: Grupo Adolescência D (Fase Adolescência 2018 40dias)	114
ANEXO K: Grupo Adolescência D (Fase Adolescência 2019)	115
ANEXO L: Grupo Controle (Fase Adulta)	116
ANEXO M: Grupo Infância D (Fase Adulta)	119
ANEXO N: Grupo Adolescência D (Fase Adulta)	121
ANEXO O: CEUA	123

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Descrição das gaiolas de acordo com as etapas, número de animais por gaiola pós-nascimento e o grupo para os quais estes animais foram designados após o desmame. Tempo (em dias) da duração das fases de pareamento (fêmea e macho reprodutores) e Lactação (fêmea e filhotes)	34
Tabela 3.1. Média e desvio padrão dos resultados encontrados para a série temporal completa (esquerda) e padronizada (direita) sendo incluídos os animais da etapa 1 e 2 alocados nos protocolos de luminosidade T24 e T22. Os valores em negrito, demarcados com * obtiveram $p < 0,05$ ao serem comparados via teste t pareado, ou seja, com a diminuição da série temporal estes valores apresentaram mudanças estatisticamente significativas.	46
Tabela 3.2. Média e desvio padrão dos resultados encontrados para a série temporal completa (esquerda) e padronizada (direita) sendo incluídos os animais da etapa 1 e 2 alocados nos grupos Controle (T24L/T24), Infância D (T22L/T24) e Adolescência D (T24L/T22). Os valores em negrito, demarcados com * obtiveram $p < 0,05$ ao serem comparados via teste t pareado, ou seja, com a diminuição da série temporal estes valores apresentaram mudanças estatisticamente significativas.....	51
Tabela 3.3. Descrição da fase adulta nas etapas 1 e 2, incluindo a especificação dos animais e seus respectivos grupos. A terceira coluna equivale a quantos dias o rato passou exposto ao protocolo T24 na fase adulta, que foi contabilizado desde o término do protocolo T22 para o grupo AD até o dia do último teste comportamental. A quarta coluna diz respeito ao dia em que foi finalizada a fase adulta, que equivale ao último dia da tarefa de esquiva passiva	53
Tabela 3.4. Média e desvio padrão dos resultados encontrados para as variáveis período, percentual de variância explicada pelo ritmo (%V), mesor, amplitude e acrofáse em cada um dos grupos (Controle, Infância e Adolescência D) para a série temporal padronizada entre as duas etapas	54
Tabela 3.5. Síntese dos resultados comportamentais para os três grupos Controle, Infância D e Adolescência D, foram considerados apenas os resultados $p < 0,05$ # representa que o animal não apresentou déficits para o desempenho da tarefa	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Vias de arrastamento fótico e não-fótico nos núcleos supraquiasmáticos	18
Figura 1.2. Entradas e saídas principais dos núcleos supraquiasmáticos	18
Figura 1.3. Actograma de rato mantido em ciclo CE 22h.....	21
Figura 1.4. Corte coronal do cérebro de animais em diferentes fases.....	22
Figura 2.1. Gaiolas de polipropileno dentro das cabines de claro/escuro.	32
Figura 2.2. Condição luminosa dos progenitores e alocação dos filhotes	33
Figura 2.3. Linha do tempo das etapas experimentais.....	35
Figura 2.4. Rato realizando a tarefa do campo aberto.	37
Figura 2.5. Rato executando a tarefa de reconhecimento de objeto novo.	38
Figura 2.6. Pistas proximais e distais.	38
Figura 2.7. Rato executando a tarefa de reconhecimento espacial associativo.	39
Figura 2.8. Gaiola e garrafas utilizadas para a tarefa de preferência à sacarose	40
Figura 2.9. Rato realizando a tarefa de esquiva passiva.....	41
Figura 3.1. Actogramas representativos das fases experimentais.	45
Figura 3.2. Actogramas e periodogramas para T24 e T22 (fase de pareamento).....	47
Figura 3.3. Variância explicada pelo ritmo (% V) para T24.	48
Figura 3.4. Actogramas e periodogramas para T24 e T22 (fase de lactação)	49
Figura 3.5. Actogramas e periodogramas referentes a fase da adolescência.....	52
Figura 3.6. Actogramas e periodogramas referentes a fase adulta	55
Figura 3.7. Massa corporal média dos animais ao longo das semanas.....	56
Figura 3.8. Consumo médio de ração ao longo das semanas.	57
Figura 3.9. Consumo médio de água ao longo das semanas.	58
Figura 3.10. Gráficos da atividade locomotora na tarefa de campo aberto.	59
Figura 3.11. Gráficos de <i>rearing</i> na tarefa de campo aberto.....	60
Figura 3.12. Gráficos de <i>grooming</i> na tarefa de campo aberto.	61
Figura 3.13. Excreção de fezes na tarefa de campo aberto.....	62
Figura 3.14. Gráficos da tarefa de Reconhecimento de objetos novos.....	63
Figura 3.15. Taxa de exploração do objeto no local novo e familiar	64
Figura 3.16. Gráficos da tarefa de Reconhecimento de objetos novos (teste).....	65
Figura 3.17. Taxa de exploração dos objetos novos e familiar (teste)	66
Figura 3.18. Gráficos da tarefa de Reconhecimento espacial associativo.....	67
Figura 3.19. Taxa de exploração do objeto no local deslocado e não deslocado	68
Figura 3.20. Gráficos da tarefa de Reconhecimento espacial associativo (teste).....	69
Figura 3.21. Taxa de exploração do objeto não deslocado e deslocado	70
Figura 3.22. Consumo de água e sacarose no teste de preferência à sacarose	71
Figura 3.23. Latências na tarefa de esquiva passiva.....	72

RESUMO

A sincronização dos organismos ao ambiente é um importante recurso adaptativo e mudanças na organização temporal podem impactar funções fisiológicas e comportamentais. A dessincronização circadiana está associada a prejuízos no metabolismo, na imunidade e no desempenho físico e cognitivo, tanto em humanos como em modelos animais. Nos mamíferos, o sistema circadiano conclui o seu desenvolvimento no período pós-natal e as consequências de alterações precoces na ritmicidade em etapas posteriores da ontogênese ainda não são completamente compreendidas. O objetivo do presente estudo foi avaliar a ritmicidade circadiana da atividade locomotora; peso, consumo de ração e água; além de parâmetros do comportamento ansioso, depressivo e memória de ratos *Wistar* machos adultos submetidos ao protocolo de dessincronização forçada interna no início da vida. Os animais foram expostos ao ciclo claro/escuro (CE) simétrico de 22h durante dois momentos da ontogênese (infância e adolescência). No grupo Infância D, os ratos foram submetidos ao protocolo T22 do período intrauterino ao desmame. Enquanto no grupo Adolescência D, os ratos foram expostos ao protocolo T22 do desmame (P22) ao P63. O grupo controle, por sua vez, foi submetido ao ciclo CE simétrico de 24h. Os animais realizaram a etapa comportamental na fase adulta, quando já estavam ressincronizados ao ciclo CE de 24h. As tarefas realizadas foram: campo aberto (CA), reconhecimento de objeto novo (RON), reconhecimento espacial associativo (REA), preferência à sacarose (PS) e esquiva passiva (EP), responsáveis por avaliar comportamento tipo ansioso, memória de reconhecimento, memória de reconhecimento espacial associativo, comportamento tipo depressivo (anedonia) e memória aversiva, respectivamente. Os resultados mostraram que o grupo Infância D apresentou menor robustez do ritmo circadiano da atividade locomotora quando sincronizados ao T24 na fase adulta, maior média de peso na fase adulta e déficits nas tarefas de memória RON e REA, demonstrando propensão para prejuízos metabólicos (tendência à ganho de peso), prejuízos rítmicos e cognitivos. O grupo Adolescência D obteve menor média de peso na fase adulta, anedonia, maior frequência de episódios de *grooming* incompleto e déficit na tarefa de memória REA, apresentando vulnerabilidade para prejuízos metabólicos (tendência à perda de peso), transtornos de humor e déficits na memória espacial. Em conclusão, os resultados mostraram que a aplicação do protocolo de dessincronização forçada (ciclo CE de 22h - T22) em estágios iniciais da ontogênese pode promover prejuízos diferenciais e persistentes em relação aos parâmetros comportamentais relacionados: à ritmicidade, ao metabolismo, à memória e aos transtornos de humor.

Palavras-chave: Dessincronização forçada; Ratos *Wistar*; Ontogênese; Comportamento; Cronobiologia

ABSTRACT

The synchrony of organisms to their environment has a clear adaptive value, and changes in their temporal organization may impair physiological functions and behavior. Circadian desynchronization is associated with metabolic and cognitive impairment in human and nonhuman animals. In mammals, the circadian system continues to develop during the postnatal period, and the consequences of early rhythmicity disorders in latter ontogenetic phases are still not well understood. The aim of the present study was to evaluate the circadian rhythmicity of locomotor activity, weight, food and water consumption, anxiety-like and depressive like-behavior, as well as memory abilities in adult male *Wistar* rats submitted to a forced internal circadian desynchronization protocol in early ontogenetic phases. Animals were exposed to a symmetrical light-dark cycle 11:11 (T22 protocol) in infancy and adolescence. In the Infancy D group, rats were exposed to the T22 protocol in the uterine and lactation phases; in the Adolescence D group, rats were exposed to the T22 protocol from weaning (P22) to P63, and the Control group was kept in a 12:12 light-dark cycle. All animals were resynchronized to LD 12:12 (T24) afterwards and were tested in adulthood. We used the open field test (OF), novel object recognition test (NOR), object-in-place recognition task (OIP), sucrose preference test (SP), and passive avoidance test (PA), which evaluate, respectively: anxiety-like behavior, recognition memory, associative spatial memory, depressive-like behavior and aversive memory. We found that the Infancy D group presented lower robustness of the rhythm after resynchronized to T24 in adulthood, relatively higher body mass and were impaired in NOR and OIP tasks, which support the notion that the impairment was higher in this ontogenetic phase. On the other hand, the Adolescence D group had relatively lower body mass in adulthood, anhedonia and higher bouts of incomplete self-grooming, as well as impairment in the OIP task, which suggests an increased susceptibility to mood disorders, spatial memory impairment and weight loss. Overall, these findings showed that the exposure to the T22 forced desynchronization protocol in early ontogenetic phases can lead to differential and long-lasting effects in behavioral parameters related to rhythmicity, metabolism, memory, and affective disorders.

Keywords: Forced desynchronization; *Wistar* rats; Ontogenesis; Behavior; Chronobiology

1. INTRODUÇÃO

1.1 O Ritmo Circadiano e sua Importância Adaptativa

A organização do nosso sistema solar, com os movimentos de translação e rotação da Terra, resulta em mudanças no ambiente natural que ocorrem de maneira cíclica, como é o caso da alternância entre o dia e a noite, as diferentes estações do ano e as fases da lua. Tais alterações geofísicas implicam em desafios ambientais específicos, sendo assim, ao longo do processo evolutivo, organismos que desenvolveram estratégias dinâmicas que permitiram a adaptação às mudanças, de forma a reagir, interagir, e antecipar a estrutura rítmica do ambiente, obtiveram vantagem seletiva diante dessas características ambientais. Tal organização biológica tornou os seres vivos capazes de antecipar e se adequar às mudanças de luminosidade, disponibilidade de alimentos, riscos predatórios, entre outras variantes importantes para a manutenção da sobrevivência (Hut & Beersma, 2011; Marques, Marques, Menna-Barreto, Silva, & Cipolla-Neto, 1989; Pittendrigh, 1960).

Ao considerar que determinados eventos ambientais ocorrem periodicamente, a marcação temporal torna-se extremamente importante para a organização das espécies. Ao trazer a dimensão temporal para o primeiro plano e pensar no tempo como fonte de pressão seletiva, conforme preconiza Marques e Menna-Barreto (2003), nos deparamos com uma nova forma de pensar a matéria viva, para além de sua organização espacial. A Cronobiologia é o campo da ciência que tem como foco o estudo da organização temporal dos seres vivos, rompendo com a definição da homeostase que leva a um equilíbrio estático (Marques et al., 1989; Marques & Menna-Barreto, 2003).

Neste contexto, são conhecidos como ritmos biológicos os eventos fisiológicos e comportamentais que são expressos de maneira periódica. Essa expressão rítmica não se configura em uma simples reação ao ambiente, uma das principais características dos ritmos biológicos é o fato de serem gerados de maneira inata, endógena e autossustentada pelos organismos (Pittendrigh, 1960; Tomotani & Oda, 2012). Dessa forma, a expressão rítmica de eventos biológicos continua a ocorrer ainda que em condições constantes, ou seja, na ausência das oscilações ambientais. Essa propriedade dos ritmos é denominada livre-curso, cujos valores e características podem variar conforme as particularidades do indivíduo, espécie e ambiente (Aschoff, 1960; Marques et al., 1989). Uma das formas de classificar os ritmos biológicos é através do domínio da frequência. Considerando a importante influência do ciclo claro/escuro no processo evolutivo, oriundo da alternância entre o dia e a noite, temos a categoria dos ritmos circadianos (*circa*=cerca *dianos*=dia), cujo período é expresso com cerca de 24 horas, os

ultradianos, com período menor do que 24 horas, e os infradianos, cujo período é maior do que 24 horas, por exemplo, o ciclo circaszeptano ou circanual (Marques et al., 1989).

O período em livre-curso dos ritmos biológicos pode ser sincronizado pelos fatores periódicos do ambiente. Este processo denomina-se arrastamento, no qual é estabelecida uma relação de fase entre o evento biológico e o ciclo ambiental. O arrastamento ocorre dentro de uma faixa limite, influenciada pelas características da espécie, tipo de tecido e variável biológica e comportamental em questão (Aschoff, 1981). Os fatores externos capazes de promover arrastamento são denominados *Zeitgebers* ou “agentes sincronizadores” e podem ser de origem fótica (ciclo claro/escuro) e não-fótica (variação de temperatura, ciclo alimentação/jejum, horário dos exercícios, horário das interações sociais) (Aschoff, 1981; Hughes et al., 2015).

A organização temporal interna possibilita a otimização das funções biológicas em determinadas fases do dia (Arellanes-Licea, Caldelas, Ita-Pérez, & Díaz-Muñoz, 2014). Apesar de todos os seres vivos possuírem especificidades em seus sistemas de temporização, neste trabalho focaremos nos ritmos biológicos com período circadiano e, em particular, no sistema de temporização circadiana dos mamíferos, sendo utilizado como sujeito experimental o rato *Wistar*. Devido à complexidade da fisiologia dos mamíferos, é válido ressaltar que a expressão dos ritmos biológicos não ocorrerá no mesmo momento para as mais diversas células e funções do organismo. Em um indivíduo saudável, essa expressão ocorre em relação de fase estável, sendo o ajuste entre os diversos osciladores endógenos ao ambiente externo realizado pelo sistema de temporização circadiano (Hut & Beersma, 2011; Menna-Barreto, 2005; Pittendrigh, 1960).

Em mamíferos, o sistema de temporização circadiano é composto por mecanismos moleculares que conferem a ritmicidade endógena e que estão presentes em diversos órgãos e tecidos do corpo. Para coordenar a expressão rítmica desse complexo sistema temos os Núcleos Supraquiasmáticos (NSQs), estrutura hipotalâmica bilateral localizada acima do quiasma óptico. Os NSQs são osciladores que operam de forma similar a um marca-passo, gerando e coordenando diversos ritmos biológicos. Além disso, essas estruturas atuam na sincronização da atividade rítmica dos osciladores periféricos dentro do próprio cérebro (por exemplo, hipocampo, ínsula, amígdala e córtex pré-frontal) e localizados em diversos tecidos (como é o caso do fígado, músculos, pâncreas e tecido adiposo) aos agentes sincronizadores, como o ciclo claro/escuro ambiental (Foster, 2021; Meijer, Schaap, Watanabe, & Albus, 1997; Reppert & Weaver, 2001; Sellix et al., 2012).

1.2 A Ritmicidade e os Núcleos Supraquiasmáticos

Um ser vivo possui uma organização temporal que é expressa como reação ao estímulo oferecido pelo ambiente externo e como ritmicidade estabelecida pelos osciladores endógenos (Marques & Menna-Barreto, 2003). Tal expressão rítmica endógena é possível devido à existência dos “genes circadianos”, que atuam por meio de uma alça de retroalimentação negativa, possuindo atividade cíclica com período circadiano conferida pelos loops de feedback transcricionais e translacionais (Lima & Vargas, 2018). De maneira simplificada, o loop central consiste nas proteínas CLOCK e BMAL que ativam a transcrição dos genes *Period* (*Per1*, *Per2*, *Per3*) e *Criptocromo* (*Cry1*, *Cry2*), resultando na tradução das proteínas PER e CRY ao longo do dia. No decorrer do ciclo, PER e CRY formam um heterodímero que transloca-se para o núcleo celular e inibe a atividade de CLOCK e BMAL. Conforme os níveis de PER e CRY diminuem, o ciclo se repete através da desinibição de CLOCK e BMAL e consequente reativação da transcrição dos genes *Per* e *Cry* (Albers, Walton, Gamble, Mcneill, & Hummer, 2017; Reppert & Weaver, 2001).

A ritmicidade endógena resultante dos genes circadianos exibe ritmos que são próximos a 24 horas. Apesar destes genes estarem presentes em diversos tecidos do corpo e possuírem sensibilidades diferenciadas aos diversos tipos de agentes sincronizadores, como é o caso, por exemplo, do fígado e do rim que possuem uma forte resposta direta ao arrastamento por alimentação, ainda é possível tornar esse sistema complexo sincronizado à alternância do dia e da noite (Tahara & Shibata, 2018; Xie et al., 2019). Nos mamíferos, o arrastamento desse sistema ao ciclo claro/escuro ambiental ocorre através dos NSQs devido à capacidade que essa estrutura possui de captar e processar o estímulo fótico e de transmitir essa informação para diversos osciladores periféricos que fornecem controle local da expressão aberta do ritmo (Hughes et al., 2015; Reppert & Weaver, 2002). O alinhamento do dia interno e externo fornece uma sequência temporal aos processos biológicos em horários mais propícios, por exemplo, estimulando o comportamento alimentar e de ingestão de água e preparando os órgãos para a ingestão, processamento e absorção de nutrientes durante a fase ativa do organismo, na qual ocorre maior gasto energético. Na fase de repouso, ocorre a diminuição dos processos digestivos e de gasto energético, enquanto outros processos são estimulados, como sono, reparo celular, eliminação de toxinas e consolidação da memória (Foster, 2021).

Para podermos discutir como ocorre a regulação fótica do sistema de temporização circadiano, é importante começarmos pelo processamento do sistema visual não formador de imagem. Na retina, as células ganglionares que possuem o fotorreceptor melanopsina (OPN4), denominadas IpRGC (células ganglionares da retina intrinsecamente fotossensíveis), são capazes de processar a informação fótica, além de receberem entrada das células amácrinas da retina e das células bipolares, sendo este último grupo responsável por transmitir as informações

dos fotorreceptores presentes nos cones e bastonetes (Hughes et al., 2015). As IpRGCs atuam como um canal para a transmissão de sinais aos centros não formadores de imagem, possuindo projeções para várias regiões cerebrais, dentre elas: os núcleos supraquiasmáticos, o núcleo ventrolateral pré-ótico; o folheto intergeniculado, localizado no tálamo; a região pré-tectal; e a amígdala. Foram identificados alguns subtipos de IpRGC (M1-M5) que se distinguem por sua morfologia e conexões, mediando as diferentes respostas à luz, como por exemplo: resposta pupilar, a supressão da atividade locomotora, indução do sono, níveis de alerta, aversão à luz e influência nos níveis de ansiedade e função cognitiva (Chen, Badea, & Hattar, 2011; Foster, 2021; Lazzerini Ospri, Prusky, & Hattar, 2019).

Em relação à transmissão das informações fóticas captadas pelas IpRGC para os núcleos supraquiasmáticos, esta pode ocorrer de duas formas: pela via direta, através do trato retino-hipotalâmico (RHT) ou por meio do trato geniculohipotalâmico (GHT), cujas informações partem para o folheto intergeniculado (IGL) do tálamo e retornam para os NSQs, sendo esta a via indireta (Hughes et al., 2015; Refinetti, 2006). A estimulação fótica que chega aos NSQs por meio do RHT tem como neurotransmissores o glutamato e polipeptídeo ativador de adenilato ciclase hipofisário (PACAP), enquanto as informações oriundas da via indireta têm como neurotransmissores o ácido γ -aminobutírico (GABA) e o neuropeptídeo Y (NPY) (Foster, 2021; Hughes et al., 2015). Além da via fótica, os NSQs também recebem influência de sincronizadores não-fóticos como atividade física, estímulos emocionais e estímulos sensoriais, essas informações decorrem das projeções gabaérgicas e peptidérgicas do IGL e as projeções serotonérgicas (5-HT) da rafe mediana (MR) (Figura 1.1) (Golombek & Rosenstein, 2010; Liu & Panda, 2017).

Com base na inervação do RHT, conteúdo de neuropeptídeos, projeções eferentes e aferentes e ativação em resposta à luz, a estrutura dos NSQs é subdividida em duas áreas: a área central, denominada ventrolateral (NSQs-VL) e a concha ou região dorsomedial (NSQs-DM). A área ventrolateral está localizada acima do quiasma óptico e recebe a inervação direta e densa do trato retinohipotalâmico (RHT), é caracterizada por neurônios que sintetizam o polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP) e peptídeo liberador de gastrina (GRP). Enquanto a região dorsomedial apresenta uma conexão mais esparsa com o RHT, a região NSQs-DM contém vasopressina arginina (AVP) e neurônios de calretinina. Portanto, os NSQs-VL recebem a maioria das aferências de recepção de informação fótica, além de estar conectada com a região da rafe mediana, enquanto NSQs-DM recebem a maior parte dos estímulos provenientes do hipotálamo e da área límbica (Bano-Otalora & Piggins, 2017; Golombek & Rosenstein, 2010).

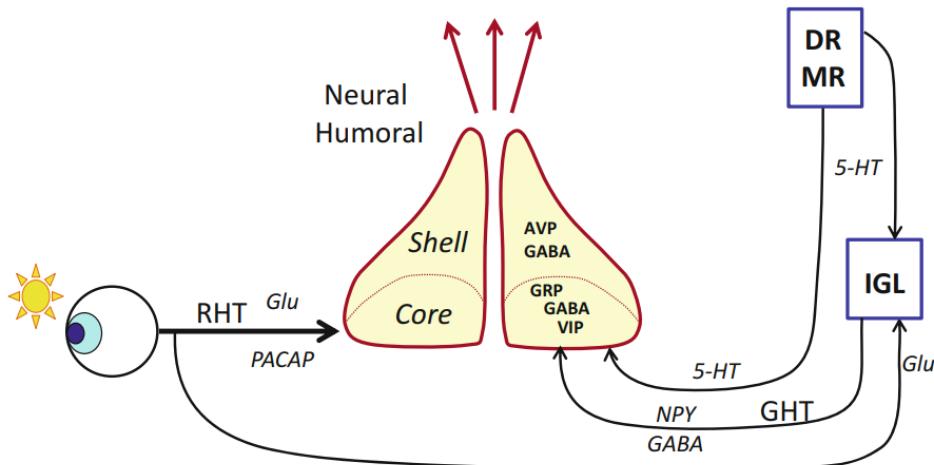


Figura 1.1. Vias de arrastamento fótico e não-fótico nos núcleos supraquiasmáticos e subdivisão das regiões ventrolateral (*core*) e dorsomedial (*shell*). Adaptado de Chapter 12 The Mammalian Neural Circadian System: From Molecules to Behaviour (p. 260) escrito por B. Bano-Otalora e H. D. Piggins, in Biological Timekeeping: Clocks, Rhythms and Behaviour. Press. Copyright 2017 por Springer (tradução nossa).

Em relação às vias eferentes dos NSQs, estudos realizados em ratos por Moore e colaboradores (revistos em Moore, 2013) demonstrou haver uma projeção dos NSQs-DM para o hipotálamo dorsomedial (DMH), a área pré-óptica (POA), a zona subparaventricular medial (mSPVz), o núcleo paraventricular hipotalâmico (PVH), o núcleo paraventricular no tálamo (PVT) e o núcleo do leito da estria terminal (BST). Enquanto a porção ventral (NSQs-VL) projeta-se principalmente para peri-NSQs, bem como a zona subparaventricular lateral (ISPVz) e a membrana frontal basal, incluindo os núcleos septais laterais (Figura 1.2) (Bano-Otalora & Piggins, 2017; Moore, 2013).

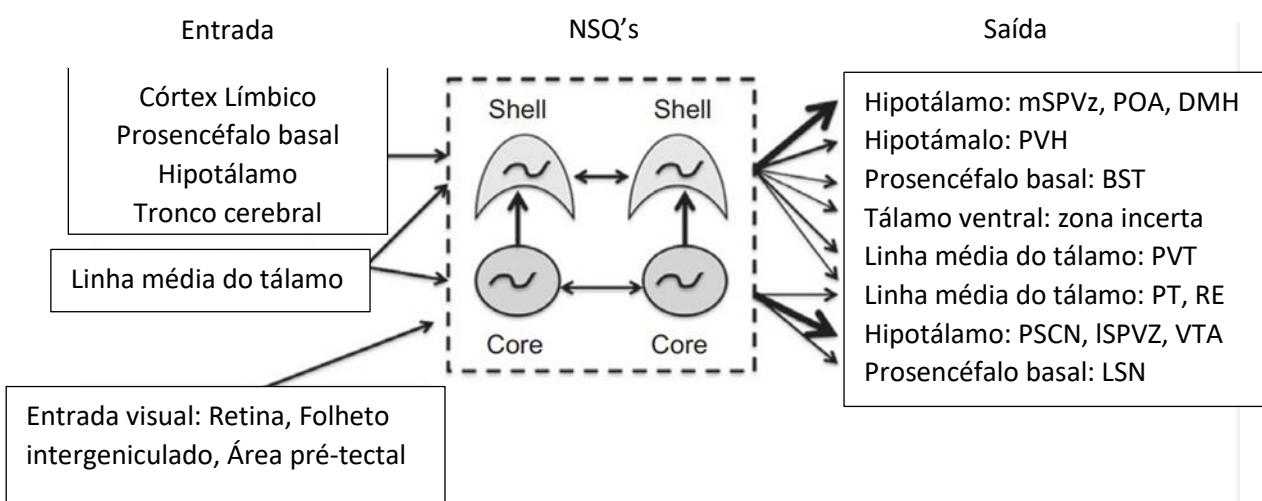


Figura 1.2. Entradas (*input*) e saídas (*output*) principais das porções ventrolateral (*core*) e dorsomedial (*shell*) dos Núcleos Supraquiasmáticos (SCN). Retirado de “The Suprachiasmatic Nucleus and the Circadian Timing System” escrito por R. Y. Moore (2013), p. 17. Copyright 2017 por Elsevier Inc. (tradução nossa)

Os NSQs também regulam a ritmicidade circadiana da síntese e liberação de hormônios, como é o caso da melatonina, cuja regulação é feita por meio de uma via multissináptica que inclui eferências para o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e uma projeção descendente para neurônios pré-ganglionares simpáticos na medula espinhal torácica superior que, por sua vez, se projetam para o gânglio cervical superior (SCG) (Broussard et al., 2017). A produção de melatonina é inibida pela entrada fótica da retina para os NSQs, o que torna este hormônio um sinalizador biológico da exposição ao escuro que interage com receptores presentes nos NSQs, tanto em animais diurnos quanto noturnos (Foster, 2021). Outro exemplo de hormônio que possui ritmo circadiano e que tem sua ritmicidade associada à regulação dos NSQs é o cortisol (em humanos) e a corticosterona (em rato), este hormônio apresenta seu pico de expressão antecipando fases de atividade. O pico da corticosterona está associada em ratos aos neurotransmissores NSQs que influenciam neurônios pré-autonômicos do núcleo paraventricular do hipotálamo, projetando-se em neurônios autonômicos simpáticos que inervam a glândula adrenal (Buijs, Tinoco, Alvarado, & Escobar, 2021).

Esse breve panorama acerca das aferências e eferências dos núcleos supraquiasmáticos tem como intuito principal ressaltar a abrangência e complexidade do sistema de temporização circadiano. Neste contexto, a sincronização entre os osciladores que compõem este sistema é crítica para o funcionamento biológico saudável e a coordenação dos eventos biológicos em interação. Os NSQs apresentam um importante papel nessa sincronização rítmica, com uma ampla rede de conexões que interagem de maneira bidirecional através de sinais neurais e hormonais diversos (Meijer & Schwartz, 2003; Silver & Schwartz, 2005). Experimentos envolvendo lesões nos NSQs de ratos demonstraram a perda da ritmicidade em parâmetros comportamentais como a atividade locomotora e comportamento de beber (Stephan & Zucker, 1972) ou a perda da ritmicidade da corticosterona adrenal (Moore & Eichler, 1972).

O indivíduo, quando sincronizado ao ambiente, possui mecanismos endógenos que permitem a regulação das variações homeostáticas. Quando há divergências entre o funcionamento dos ritmos internos e o ciclo externo, ocorre a “dessincronização circadiana” que resulta em alterações fisiológicas que diminuem a qualidade de vida em humanos e em modelos animais. Esta condição ocasiona prejuízos nos processos imunológicos, metabólicos e neurológicos, tendo como consequência desempenhos físicos e cognitivos deficientes, o que pode exercer influência também em diversos tipos de câncer, promover doenças cardiometaabólicas, entre outras condições patológicas (Golombek et al., 2013).

1.3 Dessincronização Circadiana e o Protocolo T22

A sincronização entre os componentes do sistema de temporização circadiano desempenha a otimização e o bom funcionamento deste sistema. Neste sentido, mecanismos de acoplamento e interações intercelulares regulam a sincronia de fase entre diferentes osciladores e torna possível que um oscilador exerça influência sob o ritmo de outro oscilador (Evans & Gorman, 2016). Quando as pistas temporais internas ou externas são conflitantes, inconstantes ou fracas, o sistema de temporização circadiano pode ser acometido pelo fenômeno designado de dessincronização circadiana, no qual ocorre uma perturbação nos períodos das oscilações, podendo promover avanços ou atrasos de fase, ou até mesmo a interrupção da sincronização dos ritmos internos com o ambiente (Marques & Menna-Barreto, 2003; Touitou, Coste, Dispersyn, Pain, 2010; Sellix et al., 2012). Neste contexto, dada as similaridades do sistema circadiano entre mamíferos, os modelos animais têm sido utilizados a fim de esclarecer a relação entre o ciclo claro/escuro e a regulação dos ritmos circadianos, bem como os efeitos provocados pelas perturbações nesse sistema (Brooks & Canal, 2013; Krishnan & Lyons, 2015; Logan & McClung, 2019).

Certos paradigmas experimentais tornam o acoplamento entre as duas porções dos núcleos supraquiamáticos insuficiente para a manutenção de um ritmo coerente. Este é o caso de ratos expostos a protocolos de iluminação com fotoperíodos menores do que 24 horas. Neste contexto emerge a utilização do protocolo T22, que consiste na exposição do animal a 11 horas na fase de claro e 11 horas na fase de escuro (Campuzano, Vilaplana, Cambras, & Diez-Noguera, 1998; de la Iglesia, Cambras, Schwartz, & Díez-Noguera, 2004). Este protocolo promove o desacoplamento das porções ventrolateral e dorsomedial nos NSQs, fazendo com que o roedor apresente expressões rítmicas em dois períodos: um associado ao ciclo externo de 22 horas (arrastado pela porção NSQs-VL) e outro associado ao ciclo endógeno de aproximadamente 24 horas (arrastado pela porção NSQs-DM) (de la Iglesia et al., 2004; Cambras et al., 2007).

Essa dissociação rítmica pode ser visualizada através de actogramas contendo dados de atividade locomotora, com períodos que são expressos de forma simultânea e apresentam-se em coincidência e não coincidência de fase, como está representando na Figura 1.3. Dessa forma são identificadas 4 fases distintas: os momentos da fase de claro (dia objetivo) e escuro (noite objetiva) do protocolo que coincidem com a fase de repouso (dia subjetivo) e atividade (noite subjetiva) do animal em ambos os períodos rítmicos, demarcados em A e B respectivamente; enquanto a fase de não coincidência rítmica se caracteriza pelos momentos em que o animal está em fase de atividade no ritmo em livre-curso (noite subjetiva) enquanto o protocolo está na fase de claro, bem como quando o animal está na fase de repouso no ritmo em livre-curso (dia subjetivo) apesar de estar na fase de escuro do protocolo, condições estas

demarcadas como C e D, respectivamente (de la Iglesia et al., 2004; de la Iglesia, Cambras, & Díez-Noguera, 2008).

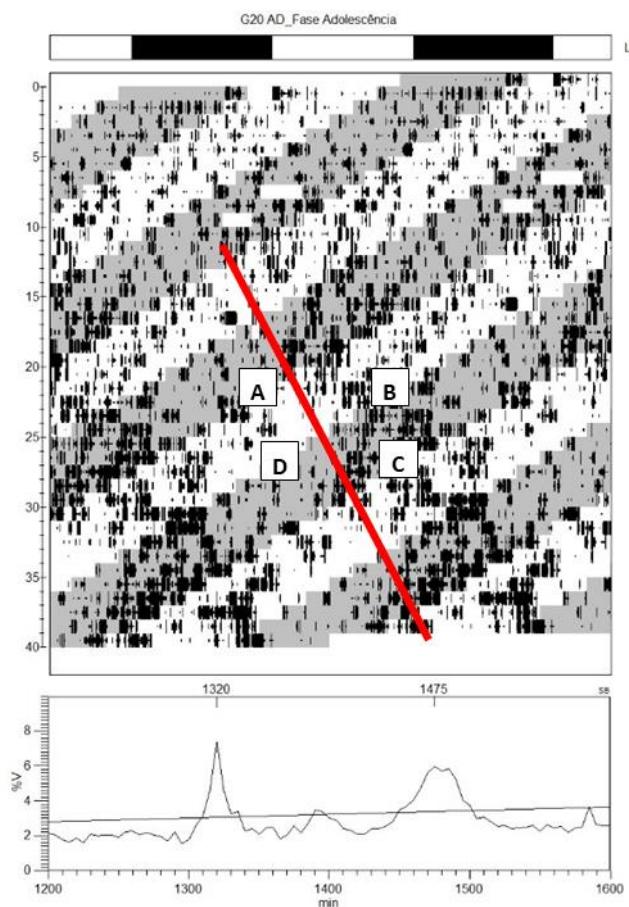


Figura 1.3. Actograma de rato mantido em ciclo CE simétrico de 22h representando as fases de coincidência (A e B) e não coincidência (C e D) da atividade locomotora, conforme descrito no texto. O registro apresenta-se em duplo plote no qual cada linha contém os dados de dois dias consecutivos. A faixa branca representa a fase de claro do protocolo e a faixa cinza representa a fase de escuro, enquanto a linha vermelha demarca o ritmo em livre-curso. Os tracejados em preto representam a atividade locomotora do animal distribuída ao longo dos dias. Abaixo do actograma, temos o periodograma com a identificação dos dois períodos rítmicos da atividade locomotora: 1320 (componente sincronizado ao T22) e 1475 (componente em livre-curso- T>24) .

Experimento realizado por de la Iglesia e colaboradores (2004) utilizando ratos *Wistar* machos com cerca de dois meses de idade, alocados individualmente e mantidos em ciclo claro escuro simétrico de 22 horas, demonstrou que estes animais além de exibirem o ritmo dissociado da atividade locomotora, também apresentavam diferenças na expressão gênica a depender da fase em que eram sacrificados, conforme demonstrado na Figura 1.4. Ao ser realizada a hibridização *in situ* do cérebro desses animais para avaliar a expressão dos genes *Period* (*Per1*) e *Bmal1*, foi identificado que nos momentos de coincidência *Per1* era expresso pelas duas porções (NSQs-VL e NSQs-DM) durante o dia subjetivo/fase claro e *Bmal1* era expresso na noite subjetiva/fase escuro em ambas as porções dos NSQs; enquanto nos

momentos de não-coincidência a expressão de *Per1* e *Bmal1* ocorriam em antífase nas porções NSQs-VL e NSQs-DM.

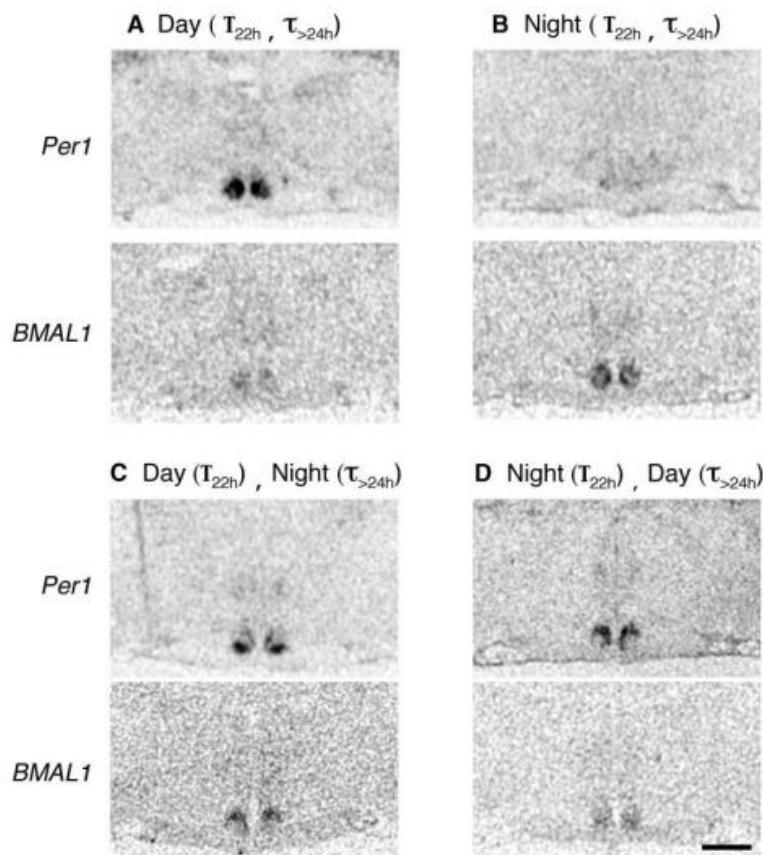


Figura 1.4. Corte coronal do cérebro de 4 animais sacrificados nas fases de coincidência (A, B) e não coincidência (C, D) mostrando o resultado da hibridização in situ com sondas de cRNA antisense para Per e Bmal 1. Retirado de “Forced Desynchronization of Dual Circadian Oscillators within the Rat Suprachiasmatic Nucleus” escrito por H. O. de la Iglesia, T. Cambras, W. J. Schwartz & A. Di’ez-Noguera (2004), p. 798. Copyright [2004] por Elsevier Inc.

O clássico estudo de Aschoff (1965) com os seres humanos submetidos ao isolamento total durante 3 ou 4 semanas, demonstrou que esses indivíduos apresentaram dessincronização em parâmetros como o ciclo sono-vigília, ritmos de temperatura corporal e de excreção de água e potássio pela urina. No caso de patologias, tanto em humanos quanto em modelos animais, mudanças na ritmidade de parâmetros como: temperatura corporal central, ciclo sono/vigília e liberação de hormônios como melatonina e cortisol, estão correlacionadas aos transtornos de humor (Vadnie & McClung, 2017) e doenças neurodegenerativas, como Parkinson e Alzheimer (Leng, Musiek, Hu, Cappuccio, & Yaffe, 2019).

O modelo de dessincronização forçada pelo protocolo T22 tem sido considerado pelo seu potencial translacional, visto que características-chave de dessincronização circadiana em humanos são exibidas por ratos *Wistar* submetidos ao protocolo, como: a dessincronização do sono REM, da temperatura corporal central e do ciclo sono/vigília (Cambras et al., 2007), além

das alterações na ritmicidade da síntese e liberação da melatonina, processo esse que também é coordenado pelos NSQs (Schwartz, 2009). A dessincronização estável de NSQs-VL e NSQs-DM promove um modelo neurologicamente intacto que pode ser utilizado como ferramenta para estudos sobre as características anatômicas, morfológicas e fisiológicas relacionadas ao papel diferencial dessas duas estruturas, bem como estudos sobre a base circadiana do desenvolvimento de patologias que podem ter a dessincronização circadiana como uma de suas causas ou sintomas principais (de la Iglesia et al., 2008).

1.4 Dessincronização Circadiana e Ontogênese

A influência da luminosidade nos fatores fisiológicos e comportamentais levam a um assunto preocupante na sociedade moderna, visto que a exposição inadequada à luz afeta grande parte da população, incluindo não apenas os trabalhadores em turno e os efeitos de *jet lag*, mas a emissão de luz de dispositivos móveis como tablets e smartphones (Touitou, Touitou, & Reinberg, 2016). Esses períodos prolongados de exposição anormal à luz podem resultar em perturbações circadiana que foram implicadas em alterações no metabolismo, sono e cognição, além de aumentar o risco de doenças metabólicas e cardiovasculares (Vosko, Colwell, & Avidan, 2010; Touitou et al., 2010, Arellanes-Licea et al., 2014)

A dessincronização circadiana pode ocasionar consequências diferentes a depender da faixa etária em que ocorre (Arellanes-Licea et al., 2014; Brooks & Canal, 2013; Christ, Korf, von Gall, 2012). Em mamíferos, os sinais maternos são importantes para a maturação e sincronização do sistema de temporização circadiano desde a fase embrionária, na qual as informações são fornecidas através do sistema placentário (Christ et al., 2012). Em fetos de roedores, ritmos circadianos já podem ser encontrados em estruturas como NSQs, a glândula adrenal e fígado, estes podem ser provocados por sinais maternos, como melatonina (impacto nos NSQs e na glândula adrenal), dopamina (NSQs) e alimentação materna (NSQs e fígado) (Amaral et al., 2014). Experimento realizado por Mendez e colaboradores (2012) demonstrou que a exposição de ratas grávidas ao claro constante ocasionou uma supressão do hormônio da melatonina materna, o que resultou na diminuição do peso e de parâmetros biométricos do feto, tendo causado retard de crescimento intrauterino, alteração na expressão de *Per2* e *Bmal1* e redução da corticosterona. Tais alterações foram revertidas quando as ratas prenhas em claro constante foram tratadas com melatonina (Mendez et al., 2012).

Após o nascimento, a interação social e os hormônios fornecidos pela mãe através do leite continuam atuando como um importante *Zeitgeber* do sistema circadiano dos filhotes (Christ et al., 2012). Em ambientes de laboratório, experimento realizado em ratos *Wistar* demonstrou que ritmos atípicos de luminosidade modificam a distribuição temporal do cuidado

materno, que pode atuar como agente sincronizador para a expressão rítmica dos filhotes (Schelstraete, Knaepen, Dutilleul, & Weyers, 1992). O sistema de temporização circadiano continua a se desenvolver ao longo do período pós-natal, até que a luz passe a ser o arrastador mais importante, coincidindo em roedores com a fase da plena formação dos receptores fóticos (Brooks & Canal, 2013).

A fase crítica de amadurecimento do sistema de temporização circadiano em ratos ocorre entre os dias 10 e 20 pós-natal, com a maturação dos mecanismos de sinalização que configuram a função sincronizada do sistema durante a vida adulta. Nos 20 primeiros dias pós-natal ocorrem eventos críticos nos NSQs como sinaptogênese, maturação glial, mudança nas respostas GABA e na expressão de neuropeptídeos. É nesse contexto que a conectividade entre a retina e os NSQs através do RHT atinge níveis adultos, formando a conexão base para o arrastamento fótico (Carmona-Alcocer, Rohr, Joye & Evans, 2020). Portanto, as experiências vividas nessa etapa, tais como privação materna, disponibilidade de alimentos e estímulos sociais e ambientais, influentes sobre o amadurecimento deste sistema, podem ocasionar impactos que persistem até a vida adulta desses animais (Brooks & Canal, 2013; Canal-Corretger, Cambras, Vilaplana & Diez-Noguera, 2000; Hut & Beersma, 2011).

Em relação à fase da adolescência, apesar das diferenças entre humanos e modelos animais, uma característica comum entre ambas as espécies é a associação dessa fase à maturação sexual e desenvolvimento gradual da função reprodutiva (Ebling & Foster, 1989). Na maioria dos mamíferos esse processo ocorre com a ativação do eixo gonadal hipotálamo-hipófise e aumento dos esteroides gonodais que conferem as características sexuais secundárias (Sisk & Foster, 2004). Em algumas espécies, os sinais fotoperiódicos sazonais podem influenciar o crescimento e o metabolismo. Estudo realizado por Yellon e Goldman (1987) (citado por Ebling & Foster, 1989) demonstrou que hamsters submetidos a fotofases curtas apresentam desenvolvimento testicular atrasado, enquanto dias longos e constantes servem como um sinal estimulador para a puberdade, com desenvolvimento testicular completo em torno de 2 meses. Em contrapartida, hamsters submetidos a dias curtos ao nascer, inicialmente têm uma taxa lenta de desenvolvimento testicular que é completado com cerca de cinco meses de idade.

No ponto de vista neural, enquanto ocorre um aumento da sinaptogênese na fase inicial da ontogênese, a fase da adolescência é caracterizada por um aumento da poda sináptica e mielinização, tanto em humanos quanto em modelos animais, muitos desses processos ocorrem durante o sono, sendo este considerado crucial para a maturação adequada da circuitaria neural, além de seu importante papel para a formação da memória de longo prazo (Hagenauer & Lee, 2013; Logan & McClung, 2019). Dessa forma, condições adversas durante a adolescência que

afetam o sono e a sincronização do sistema de temporização circadiano podem contribuir para o desenvolvimento de fisiopatologias subjacentes a vulnerabilidade a doenças que podem se manifestar a curto prazo ou em estágios posteriores da ontogênese (Hagenauer & Lee, 2013; Logan & McClung, 2019).

Devido aos efeitos deletérios da dessincronização circadiana, os organismos acabam desenvolvendo estratégias para a realização dos ajustes às condições ambientais, neste sentido os ritmos são ajustados mais facilmente aos atrasos de fase em relação aos avanços e essas mudanças possuem influência da idade, gênero, espécie e variável rítmica avaliada (Kott, Leacha & Yan, 2012; Albert, da Silva, Díez-Noguera, & Cambras, 2013;) A exposição ao ciclo T22 durante o período de lactação promoveu dissociação do ritmo circadiano da atividade locomotora pós-desmame em ratos nascidos em T24, porém os ratos que foram gerados sob a influência desse fotoperíodo (ratas prenhes em T22) só apresentaram as características de dissociação com a permanência neste protocolo. Tais resultados demonstram que a capacidade do sistema circadiano do rato para se dissociar sob ciclos-T é modificada caso os animais sejam mantidos nestas condições desde o nascimento e que as condições anormais de luminosidade podem modificar a plasticidade do marca-passo circadiano (Anglès-Pujolràs, Díez-Noguera & Cambras, 2007).

Experimento realizado por Albert e colaboradores (2013) demonstrou haver diferenças em relação ao ritmo circadiano da atividade locomotora em ratos *Wistar* adolescentes (21 dias) e adultos (71 dias) que foram submetidos a protocolos de mudanças de fotofase durante 60 dias. Os protocolos contavam com avanços ou atrasos de fotofase de 6 horas a cada 5 dias, bem como a alternância entre avanço e atraso com o mesmo intervalo. Apesar de os ratos adultos terem apresentado dissociação do ritmo circadiano da atividade locomotora no protocolo de avanço e alternância entre avanço e atraso de fase, nos ratos adolescentes foi registrado um único e estável ritmo circadiano de atividade locomotora em todas as condições de luminosidade, cujo período foi o resultado da integração dos horários da luz. Quando os ratos em alternância de fase foram posteriormente submetidos à escuridão constante, o grupo dos animais submetidos ao protocolo na adolescência apresentou período do ritmo em livre-curso mais curto em relação aos submetidos na idade adulta. Os autores sugerem que tais resultados podem indicar um acoplamento mais forte no sistema de temporização circadiano dos adolescentes, resultando em uma melhor adaptação às mudanças de fase que podem gerar mudanças permanentes neste sistema (Albert et al., 2013).

Contudo, a sincronização entre ciclo CE e a ritmicidade circadiana da atividade locomotora não persistiu para todas as condições experimentais a qual foram submetidos os ratos *Wistar* adolescentes que participaram do estudo de Campuzano e colaboradores (1998).

Estes animais a partir dos 22 dias pós- nascimento, foram expostos à protocolos luminosos simétricos com períodos de 21, 21.5, 22, 23 e 23.5 h, permanecendo nessa condição por 60 dias. Neste experimento, os ratos apresentaram ritmo dissociado da atividade locomotora nos períodos entre 21 e 23h, enquanto apenas um componente rítmico foi manifestado no período de 23,5h. Com exceção dos animais submetidos ao T21, o restante dos ratos apresentou o componente livre-curso sob escuro constante que foi influenciado pelo ciclo claro/escuro anterior, demonstrando que estes protocolos resultavam no processo de arrastamento parcial de um sistema multioscilitatório (Campuzano, Vilaplana, Cambras, & Díez-Noguera, 1998).

1.5 Dessincronização, Memória e Transtornos de Humor

Dentre os osciladores periféricos presentes no cérebro, os mamíferos apresentam: córtex pré-frontal, insula agranularrostral, amígdala e hipocampo (Chun, Woodruff, Morton, Hinds, & Spencer, 2015). Esses osciladores circadianos endógenos promovem a regulação local de funções como atenção, aprendizado e processos como a aquisição, recuperação e extinção da memória. Picos e vales de desempenho variam entre paradigmas de aprendizagem, espécie e horário do dia em que a tarefa é realizada. (Krishnan & Lyons, 2015; Ruby et al., 2013; Smarr, Jennings, Driscoll & Kriegsfeld, 2014).

Diminuições na neurogênese hipocampal têm sido encontradas em estudos com ratos e hamsters adultos submetidos a protocolos de avanço de fase crônicos (Gibson, Wang, Tjho, Khattar, & Kriegsfeld, 2010; Horsey et al., 2020; Kott, Leach, & Yan, 2012), estes achados estão correlacionados à prejuízos no desempenho desses animais em tarefas de memória, com efeitos que persistem mesmo após a interrupção do *jet lag* (Craig & McDonald, 2008; Gibson et al., 2010). Alterações de luminosidade fora dos limites de arrastamento impõem déficits proporcionais na recordação e quando aplicados de forma crônica afetam a aquisição e retenção da memória, especialmente em tarefas que envolvem o componente espacial (Craig & McDonald, 2008; Smarr et al., 2014).

No que se refere aos experimentos realizados com o protocolo T22, ratos *Wistar* demonstraram desempenhos diferentes a depender da fase ontogenética da dessincronização e das tarefas às quais foram submetidos. Ratos adultos demonstraram déficits no desempenho da tarefa de esquiva passiva, tarefa amígdala dependente devido ao seu componente emocional, porém não tiveram prejuízos no desempenho da tarefa de reconhecimento de objetos (Neto, Carneiro, Valentimuzzi, & Araújo, 2008). Ratos *Wistar* adultos dessincronizados no experimento de Koike (2013) apresentaram um padrão de comportamento ansioso na execução da tarefa de campo aberto, além de terem sido encontrados maior número de células marcadas para o receptor serotononérgico 5HT1A na região da amígdala, indicando uma maior inibição

desta área. Estudo realizado em nosso laboratório, com dados ainda não publicados, demonstrou que ratos *Wistar* machos dessincronizados na fase da adolescência demonstraram diferenças no perfil comportamental em relação aos ratos dessincronizados na fase adulta. Os ratos adolescentes não demonstraram prejuízos nas tarefas de campo aberto e esquiva passiva, que avaliam ansiedade e memória aversiva, respectivamente, apesar de demonstrarem prejuízos em tarefas de reconhecimento de objetos e reconhecimento espacial associativo (Araújo, 2017; Pereira, 2017).

Estudo realizado com ratos adultos da linhagem *Wistar*, envolvendo o protocolo T22 de dessincronização forçada, demonstrou também a correlação entre exposição anormal à luz, ritmos interrompidos e distúrbios do humor, sugerindo que a estimulação física do sistema circadiano através do trato retino-hipotalâmico é fundamental para a manutenção do humor. Ratos dessincronizados forçados que foram sacrificados em dia e noite de coincidência (coincidência do ritmo subjetivo com o ritmo objetivo) e submetidos à cromatografia apresentaram um aumento significativo dos níveis de Norepinefrina e Dopamina e do turnover de 5-HT no córtex pré-frontal, em relação aos controles sacrificados nas fases de repouso e atividade. Neste trabalho, o grupo também realizou testes comportamentais com ratos dessincronizados em momentos de coincidência e não coincidência, que resultou num score para depressão calculados a partir da soma padronizada (como valores z obtidos subtraindo a média e dividindo pelo desvio padrão) dos comportamentos de latência de montagem, latência de ejaculação padronizada, taxa de copulação padronizada e consumo de sacarose padronizado. Em conclusão, o score do grupo controle foi significativamente menor do que os dos grupos de animais submetidos ao protocolo T22, indicando que este protocolo induz a expressão do fenótipo depressivo em ratos *Wistar* adultos (Ben-Hamo et al., 2016).

1.6 Justificativa

A maturação dos NSQs ocorre no período pós nascimento e condições estressantes geradas durante o período gestacional de ratas prenhas podem vir a provocar um efeito de longo prazo nas taxas de renovação celular do eixo hipocampo-hipotálamo-hipófise-adrenal, importantes componentes de funções cognitivas como a memória, bem como envolvidos na regulação do humor (Baquedano et al., 2011). O trabalho de Vilches e colaboradores (2014) investigou os efeitos da exposição de ratas prenhas à luz constante no oscilador hipocampal fetal, estes animais apresentaram supressão das oscilações dos genes *Bmal* e *Per2* e dos genes que codificam as subunidades dos receptores NMDA. Filhotes gestados em cloro constante e criados em CE 24h após o parto tiveram expressão gênica reduzida no hipocampo, acompanhada por déficits na memória espacial, com prejuízos no desempenho da tarefa do

labirinto aquático de Morris. Em humanos, estudo recente demonstra que há correlação entre a dessincronização circadiana sofrida por mulheres grávidas, com sintomas de ansiedade e depressão presentes em seus filhos quando adolescentes e adultos jovens (Strohmaier et al., 2019). Com a influência da vida intrauterina no comportamento e fisiologia dos filhotes, unindo-se ao fato de que o sistema circadiano ainda está imaturo durante o nascimento, torna-se importante esclarecer sobre as consequências e permanência da perturbação circadiana.

No que se refere à fase da adolescência, para os humanos esta fase está associada a um atraso de fase em ritmos como ciclo sono-vigília e melatonina, mudança essa dependente da presença de hormônios gonadais e que coincide com a maturidade sexual. Além disso, também existe uma maior sensibilidade dos adolescentes em relação à exposição à luz, em especial no início da adolescência (Crowley, Cain, Burns, Acebo, & Carskadon, 2015). Outra questão a ser considerada é a influência da interrupção do sono e da dessincronização circadiana durante a adolescência no desenvolvimento cerebral, podendo contribuir para a vulnerabilidade a transtornos de humor e uso de substâncias psicoativas (cafeína, nicotina, álcool e maconha) (Logan & McClung, 2019). Neste panorama, é válido ressaltar o problema de saúde pública ocasionado pelas perturbações no ritmo circadiano de adolescentes dado o efeito do *jet lag* social ocasionado pelo uso indiscriminado das mídias eletrônicas (Touitou et al., 2016). Fadiga, sonolência diurna, déficits em funções cognitivas como atenção e memória, bem como comprometimento da regulação emocional, ansiedade e transtornos de humor, são algumas das consequências provocadas pela dessincronização circadiana em adolescentes, que podem levar à evasão escolar, abuso de drogas e substâncias químicas e obesidade (Touitou et al., 2010).

Os ritmos circadianos emergem durante a primeira infância e desde então várias mudanças ocorrem ao longo da vida, incluindo sensibilidade do cérebro à entrada de luz, nas entradas e saídas do NSQ e nas funções dos genes circadianos em tipos específicos de células e tecidos. (Brooks & Canal, 2012). Dada a relação entre a disfunção circadiana e os distúrbios cerebrais que têm início em diferentes estágios do desenvolvimento, se faz de grande importância estudos que avaliem as consequências da perturbação circadiana nas funções cognitivas e regulação do humor ao longo da ontogênese, investigando também a persistência desses impactos (Logan & McClung, 2019). Neste contexto, o protocolo T22 trata-se de uma forma não farmacológica e não invasiva de induzir o desacoplamento da atividade rítmica dos núcleos supraquiasmáticos, sendo este não apenas um fruto de mascaramento, dada a sua persistência na ausência de pistas fóticas (Cambras et al., 2007; de la Iglesia et al., 2004). Este paradigma tem sido utilizado para fornecer informações sobre as saídas produzidas pelos compartimentos das porções dos NSQs. Este arrastamento parcial pode ser utilizado como

abordagem comparativa para estudos das propriedades do circuito que permitem essa forma de plasticidade (de la Iglesia et al., 2008).

Estudos que associam ensaios comportamentais analíticos têm o potencial de oferecer uma visão acerca das regras que regem o funcionamento do circuito regido pelos NSQs, de forma a estabelecer correlação entre o desacoplamento das porções dos núcleos supraquiasmáticos e das funções cognitivas e de regulação do humor. Dessa forma, investigar a plasticidade circadiana no nível comportamental pode fornecer informações sobre os fatores de acoplamento dos NSQs e sua influência na circuitaria que envolve o sistema circadiano, podendo auxiliar no desenvolvimento de novas abordagens para mitigar os danos causados pela ruptura circadiana em humanos (Evans & Gorman, 2016).

Diante do exposto, o nosso estudo promoveu a exposição de ratos *Wistar* machos ao ciclo T22 durante dois momentos da ontogênese: um grupo submetido ao protocolo da vida intrauterina ao desmame (infância) (P0-P22) e outro grupo sendo exposto ao protocolo de dessincronização forçada na fase da adolescência (P22- P64), ao final dessas fases até a realização dos testes comportamentais na fase adulta, os animais permaneceram expostos ao ciclo claro/escuro simétrico de 24h. O intuito do trabalho foi avaliar os efeitos à longo prazo da dessincronização forçada em estágios anteriores da ontogênese sob os seguintes componentes: ritmicidade circadiana da atividade locomotora, parâmetros relacionados ao metabolismo, comportamento tipo ansioso, reconhecimento de objetos e espacial associativo, anedonia e memória aversiva. Para isso, foi realizado o acompanhamento da atividade locomotora desses animais durante todas as etapas do desenvolvimento, além de serem medidos os pesos e a quantidade de água e ração consumidas por esses ratos e realizadas as tarefas de campo aberto, reconhecimento de objetos novos, reconhecimento espacial associativo, preferência à sacarose e esquiva passiva.

1.7 Objetivos

1.7.1 Objetivo Geral

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

1.7.2 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 fase pós-natal (P1 à P22) ou após o desmame até a adolescência (P22 à P63);
- Avaliar os efeitos da exposição ao ciclo CE de 22 h na infância e adolescência sobre os seguintes aspectos de ratos adultos:
 - Peso
 - Consumo alimentar
 - Quantidade de água consumida
 - Comportamento do tipo ansioso
 - Desempenho na tarefa de reconhecimento de objetos de curto prazo
 - Desempenho na tarefa de reconhecimento espacial associativo de curto prazo
 - Comportamento do tipo depressivo
 - Desempenho na tarefa de memória aversiva de curto e longo prazo

2. MÉTODO

2.1 Animais

2.1.1 Procedência dos Animais e Etapas do Experimento

Para que o nascimento dos filhotes utilizados no experimento ocorresse dentro das cabines de claro/escuro, ratos machos e fêmeas, com aproximadamente 3 meses, foram transferidos do Biotério prof. Thomas George da UFPB para o biotério da Cronobiologia-Lemcog localizado no Centro de Ciências Humanas Letras e Artes. O experimento ocorreu em duas etapas, sendo uma realizada em 2018 (**etapa 1**) e outra em 2019 (**etapa 2**), com a seguinte distribuição de animais: Para a **etapa 1 (ET1)** foram utilizados 5 casais e 24 filhotes machos provenientes destes casais e para a **etapa 2 (ET2)** tivemos 4 casais com 12 ratos machos selecionados destes casais. Os filhotes machos de ambas as etapas foram selecionados aleatoriamente.

2.1.2 Critérios de Exclusão da Amostra

Na etapa 1, um dos animais do Grupo Controle fora sacrificado antes da realização dos testes, em decorrência de seu estado de saúde. Outros critérios utilizados para a exclusão foram: Defeitos nos sensores que impossibilitaram a análise de ritmicidade em alguma das fases do protocolo, fato este que ocorreu com 2 animais pertencentes a cada uma das etapas (Grupo Adolescência AD- Etapa 1, Grupo Controle- Etapa 2). Outro critério foi utilizado especificamente para o grupo Adolescência D, consistindo na exclusão dos animais que não apresentaram dissociação do ritmo circadiano da atividade locomotora, a dissociação era averiguada de forma visual por meio do actograma e confirmada através do periodograma e neste aspecto apenas um animal (Etapa 1) não atendeu aos critérios estabelecidos. Dessa forma, a amostra final contou com 36 animais.

2.1.3 Monitoramento do Estado de Saúde

Todos os animais obtiveram livre acesso à água e ração e tiveram seu estado de saúde monitorados por meio de medidas dos pesos corporais, quantidade de água e ração consumidas, bem como através da observação dos padrões de atividade locomotora, comportamento e aparência física (coloração e estado da pelagem, aparecimento de porfirina, presença de ferimentos) (Neves, Filho, & Menezes, 2013). A equipe também contou com treinamento e participação de cursos sobre manejo de animais, além de os animais terem sido acompanhados por um bioterista e médico veterinário. Os sujeitos experimentais foram tratados conforme as diretrizes da legislação brasileira para a utilização dos animais em pesquisa (Lei Arouca, nº

11.794/08). Todos os procedimentos aqui presentes foram submetidos e aprovados pelo comitê de Ética da Universidade Federal da Paraíba, nº. 047/2017.

2.1.4 Condições de Manutenção

Os ratos *Wistar* foram mantidos em gaiolas de polipropileno (40 x 32 x 17 cm), alocadas dentro de cabines de madeira (Figura 2.1) em uma sala com atenuação acústica e na qual a temperatura (23 ± 1) e umidade eram monitoradas pelo termômetro e controladas através do ar-condicionado e sistema de exaustão. A iluminação das cabines foi proveniente de duas fitas de luz branca feitas de diodos emissores de luz (fita led), com 1,5m de comprimento, que forneciam uma média de 150 lux dentro das gaiolas na fase de claro e < 1 lux na fase de escuro.

As cabines também contavam com sensores de atividade locomotora acoplados ao Sistema de Acionamento Programado (SAP), programa este desenvolvido pelo Laboratório de Neurobiologia e Ritmicidade Biológica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (Financiamento CNPq). Por meio deste software foi realizada a manipulação do ciclo claro/escuro, assim como o registro da atividade locomotora dos animais. A atividade locomotora dentro das gaiolas foi registrada diariamente, em intervalos de 5 minutos, durante toda a etapa experimental.



Figura 2.1. Gaiolas de polipropileno dentro das cabines de claro/escuro

2.2 Experimento de Dessincronização Forçada – Modelo T22

Ao serem transportados para o biotério de Cronobiologia- LEMCOG, os ratos *Wistar* fêmeas e machos utilizados para a reprodução foram mantidos em grupos de três animais do mesmo sexo para a realização da inversão do ciclo claro/escuro simétrico com duração de 24 horas (luzes acesas às 19:00 e apagadas às 07:00). Após a inversão de ciclo e habituação às cabines, que durou por volta de dez dias, houve o pareamento dos reprodutores e a submissão aleatória destes casais aos protocolos de luminosidade, condição na qual as fêmeas permaneceram até a fase de lactação e desmame dos filhotes.

Sendo assim, na junção das duas etapas, 6 casais permaneceram em ciclo Claro/ Escuro T24 (12h claro/12h escuro), enquanto 3 pares de reprodutores foram expostos ao protocolo de

dessincronização forçada – modelo T22 (11h claro/ 11h escuro) (Tabela 2.1). A permanência do macho na gaiola ocorreu até o dia do nascimento dos filhotes, tendo a fêmea permanecido para a etapa de lactação. Sendo P1 o dia do nascimento, aos 22/23 (P22/P23) dias pós-nascimento dos filhotes, foi realizado o desmame, seleção e alocação individual dos filhotes machos nas gaiolas e a divisão destes animais em três grupos (Figura 2.2):

- **T24L/T24 Grupo Controle:** 16 animais sob ciclo Claro/Escuro 12:12h durante todo o experimento.
- **T22L/T24 Grupo Dessincronização na Infância (Infância D):** 12 animais submetidos ao ciclo CE T22 (11 horas claro/ 11 horas escuro) do período intrauterino até o momento do desmame (dia 22/23 pós nascimento), que compreendeu a fase da infância desses animais neste experimento (Neves et al., 2013). No dia do desmame, estes roedores foram submetidos ao ciclo CE simétrico com duração de 24h e assim permaneceram até o fim do experimento.
- **T24L/T22 Grupo Dessincronização na Adolescência (Adolescência D):** 12 animais que nasceram no ciclo CE 12:12h e foram submetidos ao protocolo de dessincronização T22 durante 40/42 dias após o desmame, compreendendo o período da adolescência destes animais (Araújo, 2017; Pereira, 2017). Terminada essa etapa os roedores voltaram ao ciclo CE simétrico com duração de 24h, no qual permaneceram até o fim do experimento.



Figura 2.2. Condição luminosa dos progenitores e alocação dos filhotes nos grupos controle e experimentais (Infância D e Adolescência D) após o desmame. Ao lado de cada grupo está o protocolo de luminosidade ao qual os filhotes foram submetidos durante cada fase do desenvolvimento (infância (pareamento e lactação), adolescência e fase adulta).

	Número da gaiola dos ratos reprodutores	Protocolo luminoso executado durante o pareamento e a lactação	Quantidade de filhotes registrados em cada gaiola (quantidade de machos)	Grupo para o qual os filhotes foram alocados no pós-desmame (início da fase da adolescência)	Pareamento Tempo entre pareamento e nascimento (dias)	Lactação Tempo entre nascimento e desmame (dias)
Etapa 1	RMFG6	T24	8 (4 machos)	Controle/Adolescência D	25	23
	RMFG7	T22	10 (5 machos)	Infância D	25	23
	RMFG8	T24	9 (3 machos)	Controle/Adolescência D	26	22
	RMFG9	T22	9 (3 machos)	Controle/Adolescência D	25	23
	RMFG10	T24	13 (9 machos)	Infância D	26	22
Etapa 2	RMFD10	T22	14 (6 machos)	Infância D	27	22
	RMFD14	T24	12 (8 machos)	Controle/Adolescência D	25	22
	RMFD26	T24	6 (2 machos)	Controle	26	22
	RMFD30	T24	5 (3 machos)	Controle	25	22

Tabela 2.1. Descrição da alocação dos animais durante as etapas de pareamento e lactação. As colunas apresentam (1) a etapa do experimento; (2) o número da gaiola dos ratos reprodutores (3) o protocolo de iluminação nas etapas de pareamento (macho e fêmea) e lactação (fêmea e filhotes); (4) o número de filhotes por gaiola pós-nascimento (lactação), com destaque para a quantidade de machos descrita entre parênteses ;(5) o grupo para os quais os filhotes foram designados após o desmame (início da adolescência). Nota-se que os animais dos grupos Controle e Adolescência D foram provenientes das mesmas gaiolas de reprodutores que estavam em T24 durante o pareamento e lactação; (6) Tempo (em dias) da duração da fase de pareamento; (7) Tempo (em dias) da duração da fase de lactação.

2.3 Medidas do Consumo de Água, Ração e Registro do Peso

O consumo de água, ração e o peso dos animais, foram mensurados por meio de uma balança digital. A quantificação teve início entre os dias 31 e 33 pós-nascimento para os dados de peso e água. Os dados de peso foram contabilizados até o final do experimento, enquanto os de água foram contabilizados até o início do teste de preferência à sacarose. Como nos primeiros dias os ratos não alcançavam o topo da grade para se alimentarem, a ração foi disposta dentro das gaiolas e só começou a ser pesada a partir da segunda semana pós desmame, ou seja, o registro da ração consumida foi iniciado entre 38 e 40 dias pós-nascimento.

As pesagens ocorreram a cada sete dias, durante a realização da limpeza das gaiolas e troca de maravalha, ração e água. As trocas foram realizadas com mudança semanal do horário e turno, sendo feita a utilização da luz vermelha para quando o procedimento ocorria na fase de escuro e luz branca para as trocas na fase de claro, a fim de evitar interferência no ciclo claro/escuro dos animais. A variabilidade de 3 dias entre os animais deveu-se à uma limitação do método, devido à variação nas datas de nascimento. Para evitar que a abertura frequente das cabines interferisse nos registros da atividade locomotora, podendo se configurar em uma pista ambiental, as cabines só eram abertas duas vezes durante a semana: Uma no momento da troca

e outra no dia seguinte, para averiguar se houve algum vazamento de água das garrafas recém-trocadas.

2.4 Tarefas Comportamentais

Para que as tarefas comportamentais fossem realizadas na fase de maior atividade exploratória dos animais (Loss, Córdova, Callegari-Jacques & Oliveira, 2014; Krishnan & Lyons, 2015), os testes da etapa comportamental ocorreram no meio da fase de escuro do ciclo claro-escuro invertido (entre às 10:00 da manhã e 16:00 da tarde- entre ZT3 à ZT9). À fim de manter esta faixa de horário, os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos que realizavam as tarefas em quatro dias consecutivos (Grupo 1- dia 1, Grupo 2- dia 2, Grupo 3- dia 3, Grupo 4-dia 4). Estes grupos continham ratos pertencentes a todas as condições experimentais (Controle, Infância D e Adolescência D), que realizavam as mesmas tarefas e com o mesmo intervalo de tempo entre elas (a partir de 7 dias após o término da tarefa anterior).

As Tarefas Comportamentais tiveram início por volta do dia 98/99 pós-nascimento para o Grupo 1 (G1) da primeira etapa e por volta do dia 106/107/108 pós-nascimento para o Grupo 1 (G1) da segunda etapa, realizadas na seguinte ordem: Tarefa de campo aberto (CA), Tarefa de Reconhecimento de Objetos Novos (RON), Tarefa de Reconhecimento Espacial Associativo (REA), Teste de Preferência à Sacarose (PS) e Esquiva Passiva (EP). Os experimentos da primeira etapa tiveram 30 dias de duração e os da segunda etapa tiveram 37 dias, a contar da tarefa CA e RON realizada pelo Grupo 1 até a tarefa de Esquiva Passiva realizada pelo Grupo 4 (Figura 2.2). Na finalização da segunda etapa do experimento, por volta do P150, os animais da etapa 2 passaram por perfusão transcardíaca e posterior análise imuno-histoquímica.

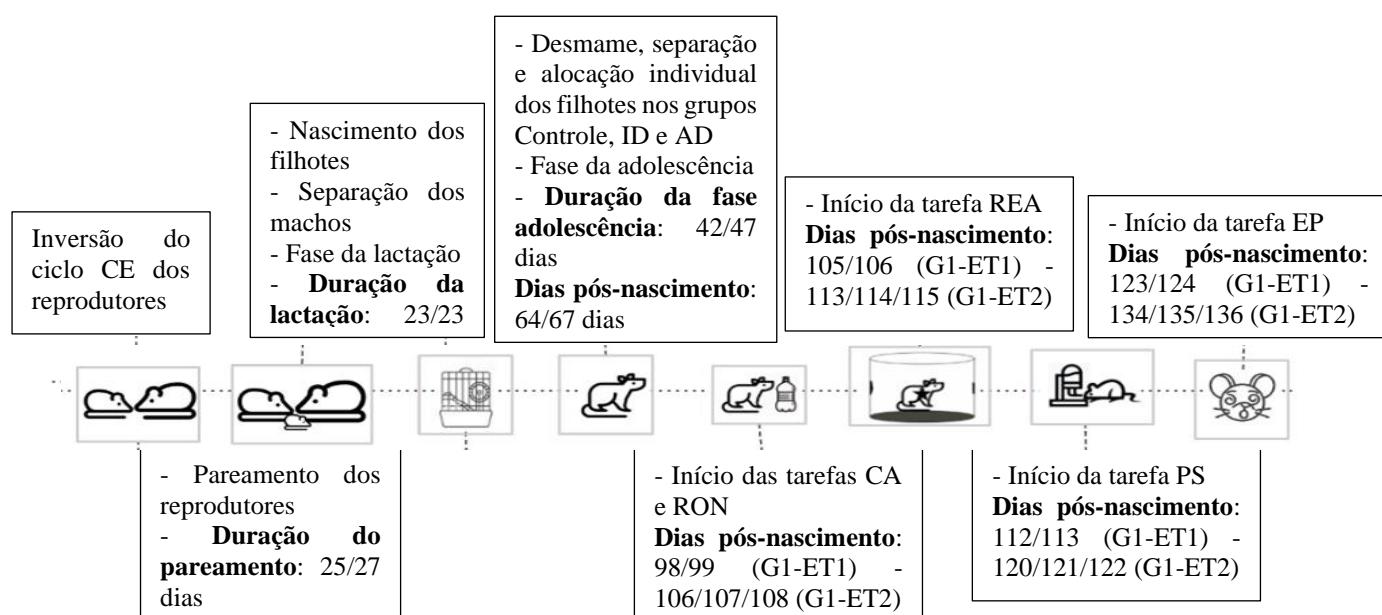


Figura 2.3. Linha do tempo contendo a discriminação das etapas experimentais e os dias em que os ratos realizaram cada procedimento.

Para a realização das tarefas CA, RON, REA e EP, 30 minutos antes do início das sessões, os ratos foram levados até a sala de comportamento do Laboratório de Estudos em Memória e Cognição – LEMCOG, a fim de ser realizada a habituação ao local. Um ruído branco (acesso em: <https://www.youtube.com/watch?v=4j7LQV7JCmQ&t=1274s>) era ligado anteriormente à chegada destes animais e permanecia durante a execução das tarefas, com a finalidade de minimizar os ruídos externos ao ambiente experimental. A temperatura e umidade da sala eram monitoradas por termômetro; o ar-condicionado ligado em 24°C+1; e a intensidade luminosa medida no centro e extremidades do campo aberto e esquina passiva permaneceu entre 5 e 7 lux.

Durante os experimentos, no intervalo entre treino e teste e na troca de um animal para outro, os aparelhos utilizados (campo e esquina), bem como os objetos que faziam parte dos testes de memória, foram limpos com solução de 5% de álcool e papel toalha, com o intuito de diminuir as pistas olfativas entre os ratos. Ao final das sessões todos os materiais utilizados eram limpos com álcool 70%.

As tarefas CA, RON, REA e EP foram filmadas com uma *webcam* para a posterior análise dos dados.

2.4.1 Campo Aberto

O Teste de Campo Aberto consistiu na Habituação 1 do experimento de Reconhecimento de Objetos Novos, sendo este o primeiro contato do animal com o aparato. Para este experimento, foi utilizada uma arena circular de material acrílico medindo 60 cm de diâmetro e 40 cm de altura, com parede transparente e piso preto, sendo colocada uma cartolina preta para impedir que o rato tivesse acesso às pistas proximais no momento da locomoção (Figura 2.3). Para a tarefa, cada animal foi colocado individualmente na arena, sendo gravado por meio de uma *webcam* durante 10 min (Pereira, 2017).

O teste teve como propósito avaliar o comportamento tipo ansioso, tendo como parâmetros: o tempo em que o rato passava no centro do campo e na zona externa (periferia), o padrão de atividade locomotora apresentado por esses animais (velocidade média e distância total percorrida) e as medidas comportamentais *rearing* e *grooming*. Por se tratar da primeira exposição do roedor ao local, espera-se que os animais menos ansiosos apresentem um número maior de comportamentos exploratórios. Sendo assim, um roedor ansioso acabaria apresentando uma redução na locomoção, no tempo passado no centro do campo, no comportamento do *rearing* e expressando o comportamento de *grooming* com uma maior frequência (Prut & Belzung, 2003; Zimcikova, Simko, Karesova, Kremlacek & Malakova, 2017).



Figura 2.4. Rato realizando a tarefa do campo aberto.

2.4.2 Reconhecimento de Objeto Novo

O local para a realização desta tarefa foi o mesmo utilizado no experimento anterior, com a arena coberta por cartolina preta a fim de retirar as pistas proximais e distais. O protocolo para RON consiste em quatro etapas: Duas sessões de habituação ao campo aberto, uma sessão de amostra e uma de teste, com intervalo de 30 minutos entre as sessões, para avaliação da memória de curto prazo. Os animais são colocados individualmente no campo para a realização das etapas (Araújo, 2017).

Nas sessões de habituação, os animais são colocados individualmente no campo para se locomoverem livremente durante dez minutos, resultando na familiarização do rato com o aparato. Para a sessão de Amostra dois objetos iguais (A A) são colocados em locais específicos do campo, sendo permitida a exploração dos mesmos durante 5 minutos. Na sessão de teste, os animais voltam ao campo aberto e são expostos durante cinco minutos a um dos objetos já apresentados na sessão de Amostra (objeto familiar) e um objeto que ainda não fora visto (objeto novo), estes objetos ocupam as exatas posições apresentadas aos animais na sessão anterior (Figura 2.4).

Os objetos utilizados nas sessões de Amostra e Teste foram randomizados entre os animais, sendo eles diferentes em forma, tamanho e cor. Os locais em que os objetos estavam posicionados também eram randomizados entre cada um dos ratos. Como os ratos *Wistar* são atraídos pela novidade, o bom desempenho na tarefa consiste no animal explorar por mais tempo o objeto novo em detrimento do já visto na sessão de amostra, indicando que reconhecem o objeto familiar (Barker, Bird, Alexander, & Warburton, 2007; Barker & Warburton, 2011).

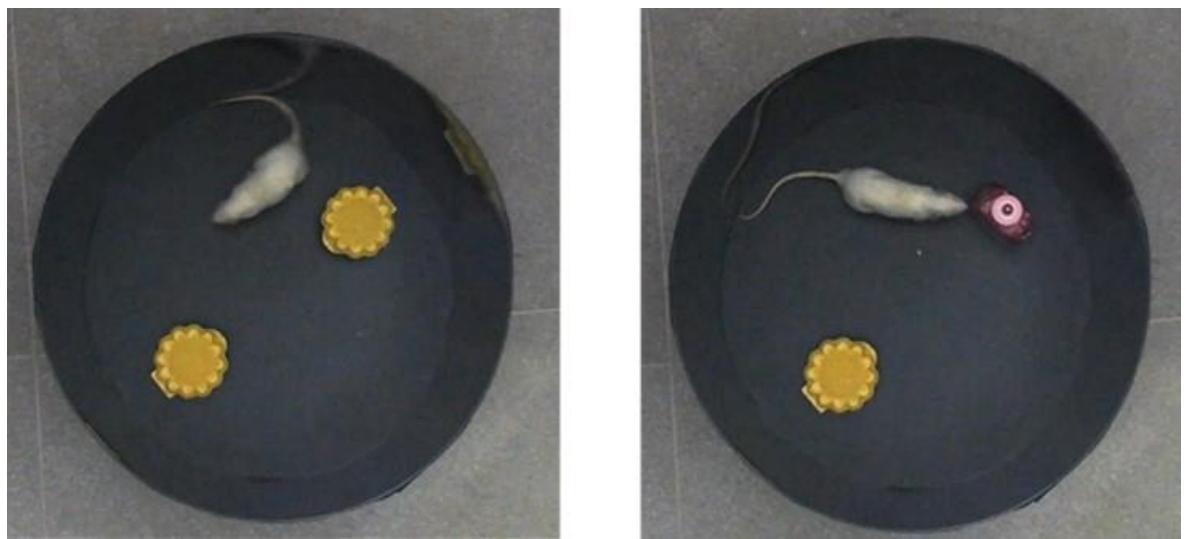


Figura 2.5. Rato executando a tarefa de reconhecimento de objeto novo. As imagens retratam a sessão de treino (esquerda) e a sessão de teste (direita).

2.4.3 Reconhecimento Espacial Associativo

Este protocolo foi composto por duas sessões de habituação, uma sessão de amostra e uma sessão de teste, com intervalos de 30 minutos entre as sessões para avaliação da memória espacial de curto prazo (Araújo, 2017). A arena foi a mesma utilizada nos experimentos anteriores, porém contando com pistas distais e proximais que permitiam ao rato se localizar em relação ao espaço (Figura 2.5).

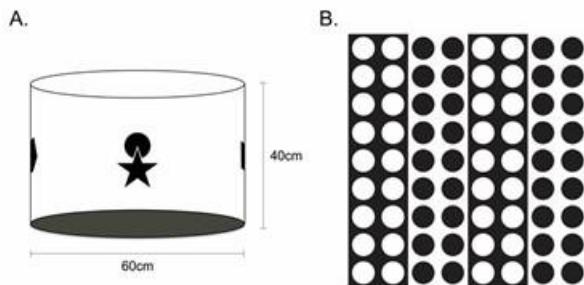


Figura 2.6. (A) Pistas proximais situadas no campo e (B) exemplo de uma das pistas distais posicionadas nas paredes da sala de experimento.

Durante as sessões de habituação, os animais eram colocados no campo aberto permanecendo durante 10 minutos. Esta etapa tinha como intuito promover a familiaridade do animal com o local de realização da tarefa, tornando os objetos apresentados a única novidade nas sessões de amostra e teste. Para a sessão de amostra eram posicionados dois objetos diferentes (A B) que os ratos poderiam explorar livremente durante cinco minutos. Na sessão de teste dois objetos iguais (A A) a um dos apresentados na sessão de amostra eram colocados na mesma posição da sessão anterior e novamente o rato teve cinco minutos para explorá-los (Figura 2.6). Assim como na tarefa RON, os objetos e locais eram randomizados entre os sujeitos e nenhum dos roedores entrava em contato com os objetos e locais já vistos no

experimento de Reconhecimento de Objetos Novos. O bom desempenho nesta tarefa consiste no animal explorar por mais tempo o objeto da sessão de teste localizado na posição ocupada pelo objeto diferente na sessão de amostra, indicando que são capazes de associar o objeto com sua localização.

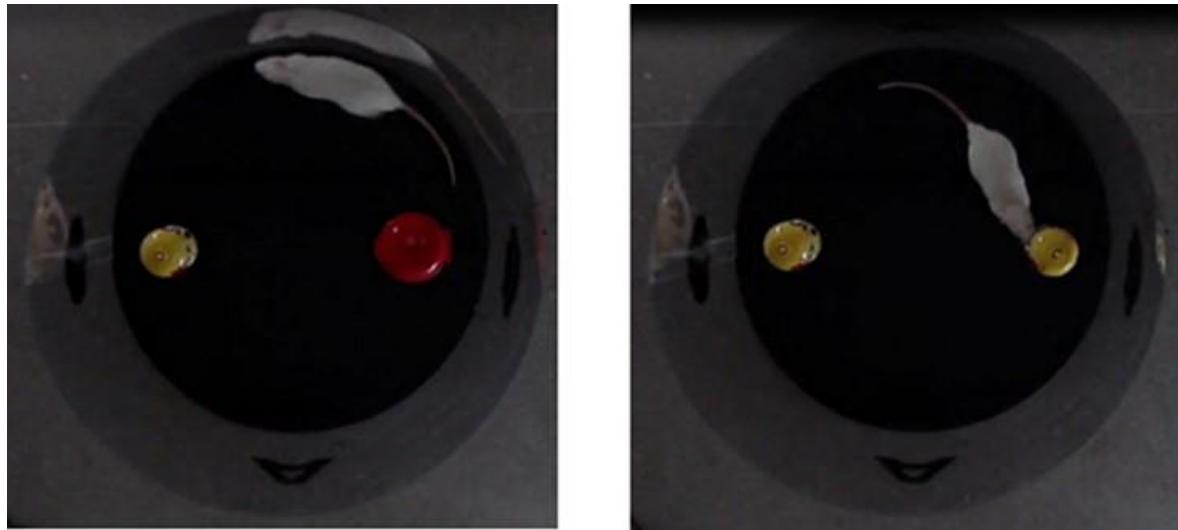


Figura 2.7. Rato executando a tarefa de reconhecimento espacial associativo, as imagens retratam a sessão de treino (esquerda) e a sessão de teste (direita).

2.4.4 Teste de preferência à sacarose

Para este experimento seguimos a metodologia presente no artigo de Martynhak e colaboradores (2011), na qual os roedores foram habituados durante três dias com a presença de duas garrafas de água iguais entre si em tamanho, forma, material, coloração e formato do bico dosador. As garrafas foram posicionadas à direita e à esquerda da grade acima da gaiola, tendo a ração assumido a posição central (Figura 2.7). Em ambas as garrafas, durante os dias de experimento, foram colocados 200 ml de água. Após 24 horas a partir da reposição das garrafas, elas eram retiradas novamente, pesadas, lavadas e novamente preenchidas com os 200 ml, a fim de diminuir as pistas olfativas e evitar uma preferência de local para o consumo da água. Este procedimento se repetiu durante os 3 dias de habituação, sendo no quarto dia realizado o teste.

Para o teste foi acrescentada uma solução de sacarose 0,5% a uma das garrafas. As posições (direita e esquerda) da água com sacarose foram aleatorizadas entre os animais de cada um dos grupos. Para as análises, a quantidade restante de água nas garrafas foi registrada por meio de uma proveta e uma balança digital, sendo subtraída a quantidade inicial para a obtenção do valor consumido. Este é um teste para a avaliação do comportamento tipo anedônico, que faz parte da sintomatologia da depressão e indica a capacidade do indivíduo em sentir prazer.

Sendo assim, em ratos com anedonia é verificada a diminuição da preferência por água com sacarose (Martynhak et. al., 2011).



Figura 2.8. Gaiola e garrafas utilizadas para a tarefa de preferência à sacarose.

2.4.5 Teste de Esquiva Passiva

O teste de Esquiva Passiva tem como intuito avaliar a memória aversiva do animal. O aparato utilizado tratou-se de uma caixa de esquiva passiva ($30,7 \times 33,3 \times 54,0$ cm) (Insight, Brasil) confeccionada em acrílico cinza, com teto de acrílico, porta divisória removível, piso em barras de aço inox, sensores de infravermelho e controlada por computador via saída USB. Foi utilizado apenas um lado desta caixa ($22,5 \times 22,5$ cm), com uma plataforma de madeira de dimensões 21×10 cm (Figura 2.8).

A tarefa consistia em uma sessão de treino e duas sessões de teste, cada uma das sessões com duração de cinco minutos. Para a realização da EP, os ratos foram colocados individualmente na plataforma de madeira e durante a sessão de treino passavam pelo condicionamento ao estímulo aversivo, com um choque elétrico de $0,5 \mu\text{A}$ (Neto et al., 2008) sendo aplicado sempre que desciam com as quatro patas sobre a superfície metálica. Nas sessões de teste, os ratos voltavam para a plataforma e permaneciam durante cinco minutos, neste momento o choque não era acionado.

Uma das sessões de teste ocorreu 30 minutos após o treino, a fim de avaliar a memória aversiva de curto prazo, enquanto a outra sessão ocorreu 24 horas após o treino, com a finalidade de avaliar a memória de longo prazo. Nesta tarefa foi analisado o tempo que o animal levava para descer da plataforma (latência de descida) durante os testes. O bom desempenho na tarefa consistia em um maior período de latência para descer da plataforma de madeira,

indicando que os mesmos recordavam do estímulo aversivo (choque) recebido na sessão de treino (Neto et al., 2008; Pereira, 2017).



Figura 2.9. Rato realizando a tarefa de esquiva passiva.

2.5 Análise dos Dados

2.5.1 Medidas do Consumo de Água, Ração e Registro do Peso

Para as medidas do consumo de água, ração e registro do peso, foi realizada uma Anova Mista para avaliar o efeito intra e intergrupal do consumo ao longo das semanas. Para as análises que apresentaram efeitos estatisticamente significativos ($p < 0,05$), foi realizado o post hoc Bonferroni para as comparações emparelhadas grupo x grupo e grupo x semana.

2.5.2 Ritmo Circadiano da Atividade Locomotora

Todas as análises rítmicas foram realizadas por meio do programa *El Temps* (Antoni Díez-Noguera, Universitat de Barcelona, <http://www.el-temps.com>). O ritmo circadiano da atividade locomotora de cada rato foi analisado e caracterizado ao longo do experimento através da inspeção visual dos actogramas a fim de avaliar qualitativamente o efeito do protocolo, assim como averiguar o estado de saúde dos ratos e funcionamento dos sensores.

Para as análises quantitativas dos dados rítmicos foram realizadas as análises do periodograma (periodograma Sokolove-Bushell) identificando o período (T) e o percentual de variância explicada pelo ritmo (%V) em cada uma das fases (Infância, Adolescência e fase Adulta) para cada animal, posteriormente foi realizada a análise descritiva (média e desvio padrão) para os dados completos (a duração total da fase) e para os dados equiparados.

A análise dos dados equiparados teve como objetivo comparar o número equivalente de dias entre os grupos, sendo excluídos fatores de interferência como: quedas de energia e

eventuais perdas de dados. Outro critério utilizado para equiparar os dados foi a análise dos actogramas dos ratos em T22, sendo selecionado o dia em que os animais sob esta condição luminosa haviam passado por pelo menos um ciclo de coincidência. Foram realizados teste t pareado ou Wilcoxon a fim de comparar os dados completos e padronizados para cada grupo. Os grupos Infância D e Controle também foram comparados com teste t de amostras independentes ou Mann Whitney, com a finalidade de averiguar as diferenças na robustez do ritmo após a ressincronização do grupo Infância D.

Na fase adulta, quando todos os animais se apresentavam sincronizados ao ciclo CE 24, os dias entre as duas etapas foram equiparados e foi calculado através do método cossinor os parâmetros: %V (porcentagem de variância explicada pelo ritmo, sendo este um indicador da robustez do ritmo), mesor (a média valor em torno do qual a variável oscila, sendo esta ajustada pelo ritmo circadiano com base no parâmetros de uma função cosseno), amplitude (e diferença entre o pico (ou vale) e o valor médio de uma onda) e acrofase (O momento em que o pico de um ritmo ocorre) (Reffinetti, 2006; Angle`s-Pujolra`s et.al., 2007). Os resultados obtidos para cada grupo foram comparados por meio da Anova de uma via, com posterior post hoc de Bonferroni para os resultados estatisticamente significativos.

2.5.3 Tarefas Comportamentais

Para a coleta de dados, os parâmetros comportamentais das tarefas de CA, RON, REA e EP foram analisados por uma dupla de pesquisadores(as) treinados(as), sendo pelo menos um deles cego para as condições entre os grupos. Após serem realizadas as análises de forma manual através do *software EthoWatcher* (UFSC, Brasil), que permite a visualização frame a frame do comportamento, os dados coletados passavam por uma análise de correlação de Pearson e apenas eram aceitos quando o valor da correlação estava acima de 0,95. Em casos de não cumprimento do critério era solicitada uma nova análise a um(a) terceiro(a) pesquisador(a) treinado(a).

Os parâmetros da atividade locomotora foram analisados de forma automática pelo *Toolbox Autotyping* (Patel et al., 2014) através do *software Matlab*. Após análise, os dados foram tabulados no software Excel e os procedimentos estatísticos realizados no programa SPSS para Windows, versão 21.0, considerando diferenças estatisticamente significativas para o valor de $p < 0,05$. Estatísticas paramétricas e não paramétricas foram utilizadas conforme o cumprimento dos critérios de distribuição normal e homocedasticidade de variância avaliados por meio do teste de normalidade de Shapiro-Wilk e teste de Levene, respectivamente.

Na tarefa do campo aberto foram analisados parâmetros relativos ao padrão de atividade locomotora do animal dentro do aparato, sendo eles: tempo de permanência no centro e periferia

do campo, distância total percorrida e velocidade média, dados estes analisados por meio do *Autotyping*. Além destas medidas, foram analisados os comportamentos de natureza exploratória por meio EthoWatcher: *grooming* (autolimpeza), medido pela frequência em que o animal realiza a autolimpeza no corpo, seja com a língua, dentes ou patas dianteiras, este comportamento foi dividido em duas categorias: *grooming* completo, com a limpeza seguindo o padrão céfalo-caudal dividido em 4 fases e o *grooming* incompleto, que possui uma alteração na ordem ou omissão de uma das fases, conforme indica o protocolo de análise publicado por Kalueff e colaboradores (2007).

Outro comportamento analisado durante a tarefa CA fora o *rearing*, que se caracteriza pela frequência em que o animal se levanta sobre as patas traseiras, numa posição de 45º com ou sem apoio no aparato, também foram diferenciados o momento em que os animais faziam o *rearing* no centro do campo ou apoiado nas laterais do aparato. Para estes comportamentos foram analisadas as variáveis *duração* e *frequência* e em conjunto também foram analisadas as quantidades de fezes excretadas pelo animal durante seu tempo no campo aberto. Todos os parâmetros citados anteriormente estão associados ao comportamento tipo ansioso (Cruz, Frei & Graeff, 1994; Lamprea, Cardenas, Setem & Morato, 2008; Zimcikova et.al, 2017) e por meio da realização da Anova de uma via ou Teste de Kruskal-Wallis, foram realizadas as comparações entre os grupos para as variáveis mencionadas.

Para a tarefa de Reconhecimento de Objetos Novos e Reconhecimento Espacial Associativo, foi considerado exploração quando o animal se aproximou (distância de pelo menos 1 cm) e apresentou contato físico com o objeto, com as vibrissas e focinho podendo ou não ter realizado o contato com as patas, foram desconsiderados os momentos em que o animal usava o objeto de apoio para explorar o ambiente (focinho não direcionado ao objeto), ou situações em que o rato encontrava-se imóvel em frente ao objeto (Araújo, 2017). Nas análises em RON e REA, foi utilizado o tempo de exploração dos objetos na sessão de Amostra e Teste, contabilizado através do EthoWatcher (UFSC, Brasil). As durações das explorações foram transformadas em uma taxa de exploração, na qual o tempo de exploração do objeto era dividido pela soma total da exploração, sendo assim para a tarefa RON: taxa de exploração = objeto familiar ou objeto novo / objeto familiar + objeto novo, enquanto em REA: taxa de exploração = obj. não deslocado ou obj. deslocado/ obj. não deslocado + obj. deslocado. Após ser constatada a distribuição normal dos dados ($p>0,05$ no teste de Shapiro-Wilk), foi realizado um teste *t* pareado para a comparação entre as taxas de exploração de cada um dos grupos.

Em relação ao resultado das Amostras e Testes em RON e REA foram analisadas as variáveis: *Latência* para a exploração do primeiro objeto; *Total de exploração* para os dois objetos; *Frequência de exploração* de ambos os objetos. Outro parâmetro analisado na sessão

de Amostra tratou-se da *Preferência de local*, na qual foi feita a comparação entre as médias das taxas de exploração dos objetos presentes na amostra, tomando como base a posição em que o objeto novo/deslocado (A) e objeto familiar/não deslocado (B) estariam no momento do teste. As taxas de *Preferência de local* foram analisadas através de teste t pareado para comparação intragrupo. Enquanto as demais variáveis foram analisadas por meia da Anova de uma via ou Kruskal-Wallis para comparações entre os grupos, a depender do atendimento aos critérios de cada um dos testes. Na RON foram analisados os dados dos 14 animais do grupo controle, 12 animais do grupo Infância D e 10 animais do grupo Adolescência D, totalizando 36 animais. Enquanto para a REA foram analisados os dados de 12 animais do grupo controle, 10 animais do grupo Infância D e 10 animais do grupo Adolescência D, totalizando 32 animais. Quatro animais foram excluídos por não terem explorado os dois objetos na sessão de Amostra, comprometendo assim a sua capacidade de associar os objetos às suas localizações na sessão teste.

Para analisar os dados obtidos pela tarefa de preferência à sacarose (OS), foram utilizados 33 animais, tendo sido feita uma taxa com o intuito de avaliar o consumo de água e sacarose corrigida pelo peso do animal, resultando na seguinte equação: consumo de água ou consumo de sacarose/peso do animal*100. Utilizamos o teste estatístico de postos assinados por Wilcoxon, visto que os dados não possuíam distribuição normal, a fim de comparar a quantidade de água e sacarose consumida pelos animais de cada um dos grupos na sessão teste. Na tarefa EP utilizamos o teste de Kruskal-Wallis para realizar a comparação entre os grupos da variável dependente “latência para descer da grade” tanto para a memória aversiva de curto prazo (intervalo de 30 minutos) quanto para a memória aversiva de longo prazo (intervalo de 24 horas), sendo também analisada a quantidade de fezes excretadas entre os animais nas sessões de condicionamento e testes. Nas tarefas de PS e EP foram utilizados os dados 14 animais do grupo controle, 12 animais do grupo Infância D e 10 animais do grupo Adolescência D, totalizando 36 animais.

3. RESULTADOS

3.1 Análise da Ritmicidade Circadiana da Atividade Locomotora

As análises da ritmicidade circadiana da atividade locomotora foram realizadas de acordo com as fases do desenvolvimento. Na Figura 3.1 temos os actogramas pertencentes a um animal de cada grupo, com a finalidade de fornecer o panorama geral do protocolo luminoso utilizado em cada fase avaliada (Infância (lactação e pareamento), Adolescência e Vida Adulta).

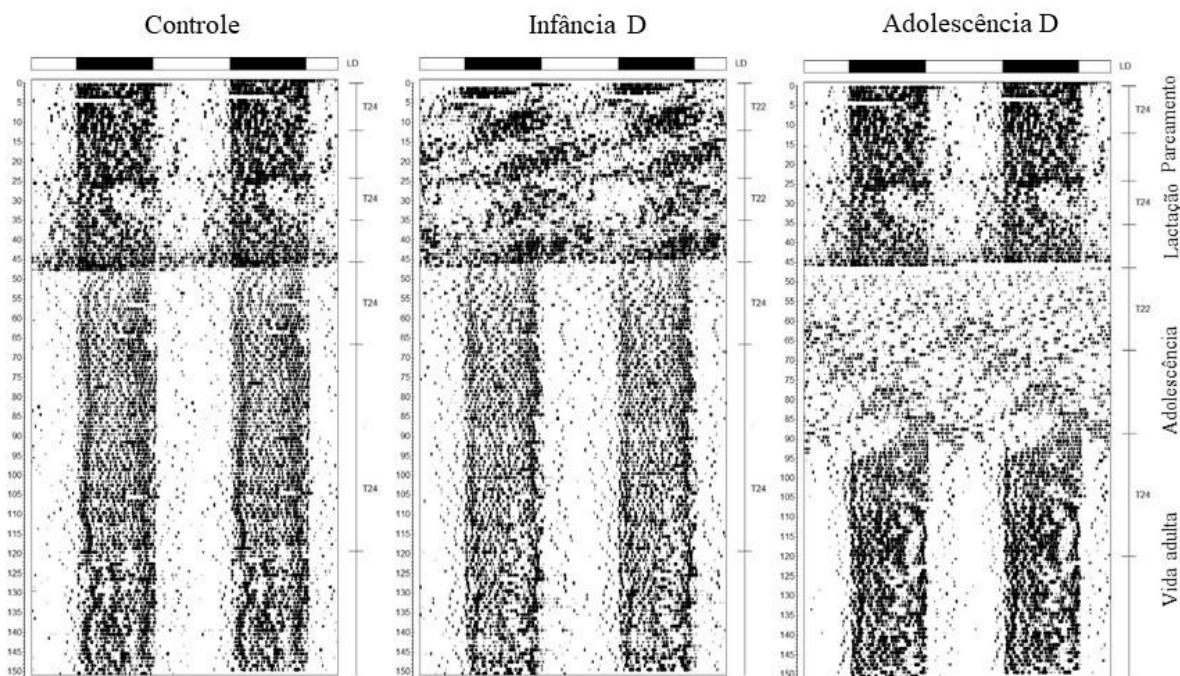


Figura 3.1. Actogramas representativos das fases experimentais para cada um dos grupos.

3.1.1 Fase Infância

O protocolo T22 foi executado desde o momento da reprodução no grupo Infância D, sendo assim, a fase infância contou com análises que foram subdivididas em dois momentos: **O Pareamento**, no qual os pais foram colocados em pares nas gaiolas, dando-se início ao protocolo T22 para os progenitores do grupo Infância D, que persistiu nesta condição até o final da fase de lactação; e a **Lactação**, fase na qual os machos haviam sido retirados das gaiolas e os filhotes permaneceram com suas mães até o desmame. Os registros coletados no pareamento e lactação correspondiam à atividade locomotora dos animais em grupo. Os filhotes machos cujos genitores estavam em T24 durante o pareamento e lactação foram divididos aleatoriamente entre os grupos Controle e Adolescência D na fase do desmame (início da adolescência). Enquanto os machos com os genitores em T22 foram designados ao grupo Infância D.

3.1.1.1 Pareamento

Para a construção dos actogramas e periodogramas da série temporal completa foram incluídos o primeiro dia pós-formação (D0) das duplas, até o dia anterior ao nascimento dos filhotes, resultando em séries temporais entre 23 e 25 dias. Para o grupo pareado em T24 tivemos período equivalente a 1440 e percentual de variância explicada pelo ritmo (%V) com média de $36,04 \pm 3,20$. No que se refere ao grupo pareado em T22, os três casais submetidos ao protocolo apresentaram o ritmo dissociado de atividade locomotora: Ritmo Sincronizado ao ciclo CE 1320, com média de %V $15,47 \pm 4,28$ e Ritmo Endógeno $1468,33 \pm 10,40$ min, com média de %V $13,422 \pm 1,15$.

Com o objetivo de comparar o mesmo número de dias entre os animais (segundo os critérios descritos na metodologia) com os resultados encontrados na série temporal completa, foram analisados 13 dias de registro para cada um dos animais (D10 a D22 do pareamento, demarcados em amarelo na Figura 3.2), e realizada a comparação com os cerca de 25 dias da série temporal completa. Para o grupo pareado em T24, o ritmo circadiano da atividade locomotora permaneceu sincronizado ao ciclo CE, com período médio entre os animais de $1440,83 \pm 2,041$. Houve também um aumento na média do percentual de variância explicada pelo ritmo $42,224 \pm 6,727$ na análise dessa série temporal (13 dias), sendo o aumento em %V estatisticamente significativo conforme resultado do teste t pareado $t(5) = 3,286$, $p=0,022$.

Para o grupo pareado em T22, os animais continuaram a expressar os dois componentes rítmicos de atividade locomotora, conforme demonstrado nos periodogramas (Figura 3.2c): O período do ritmo Sincronizado ao ciclo claro/escuro permaneceu 1320, enquanto a média de %V aumentou significativamente em comparação com os dias completos $19,54 \pm 4,81$, $t(2) = -12,291$ $p=0,007$; em relação ao componente rítmico endógeno, a média do período de $1508 \pm 66,83$ não obteve significância estatística $t=-1,220$ $p=0,347$, enquanto a média de %V permaneceu estável $13,619 \pm 0,943$, $t=-0,381$ $p=0,740$ (Tabela 3.1).

Pareamento												
Dias completos							Dias padronizados (13 dias) D10-D22					
Animais em T24		Animais em T22				Animais em T24	Animais em T22					
		T22 h		T>24 h			T22 h		T>24 h			
T	%V *	T	%V*	T	%V	T	%V *	T	%V*	T	%V	
1440	36,04±3,20	1320	15,47±4,28	1468,33 ±10,40	13,422±1,15	1440,83 ±2,041	42,224±6,727	1320	19,54±4,81	1508 ±66,83	13,619 ±0,943	

Tabela 3.1. Média e desvio padrão dos resultados encontrados para a série temporal completa (esquerda) e padronizada (direita) sendo incluídos os animais da etapa 1 e 2 alocados nos protocolos de luminosidade T24 e T22. Os valores em negrito, demarcados com * obtiveram $p < 0,05$ ao serem comparados via teste t pareado, ou seja, com a diminuição da série temporal estes valores apresentaram mudanças estatisticamente significativas.

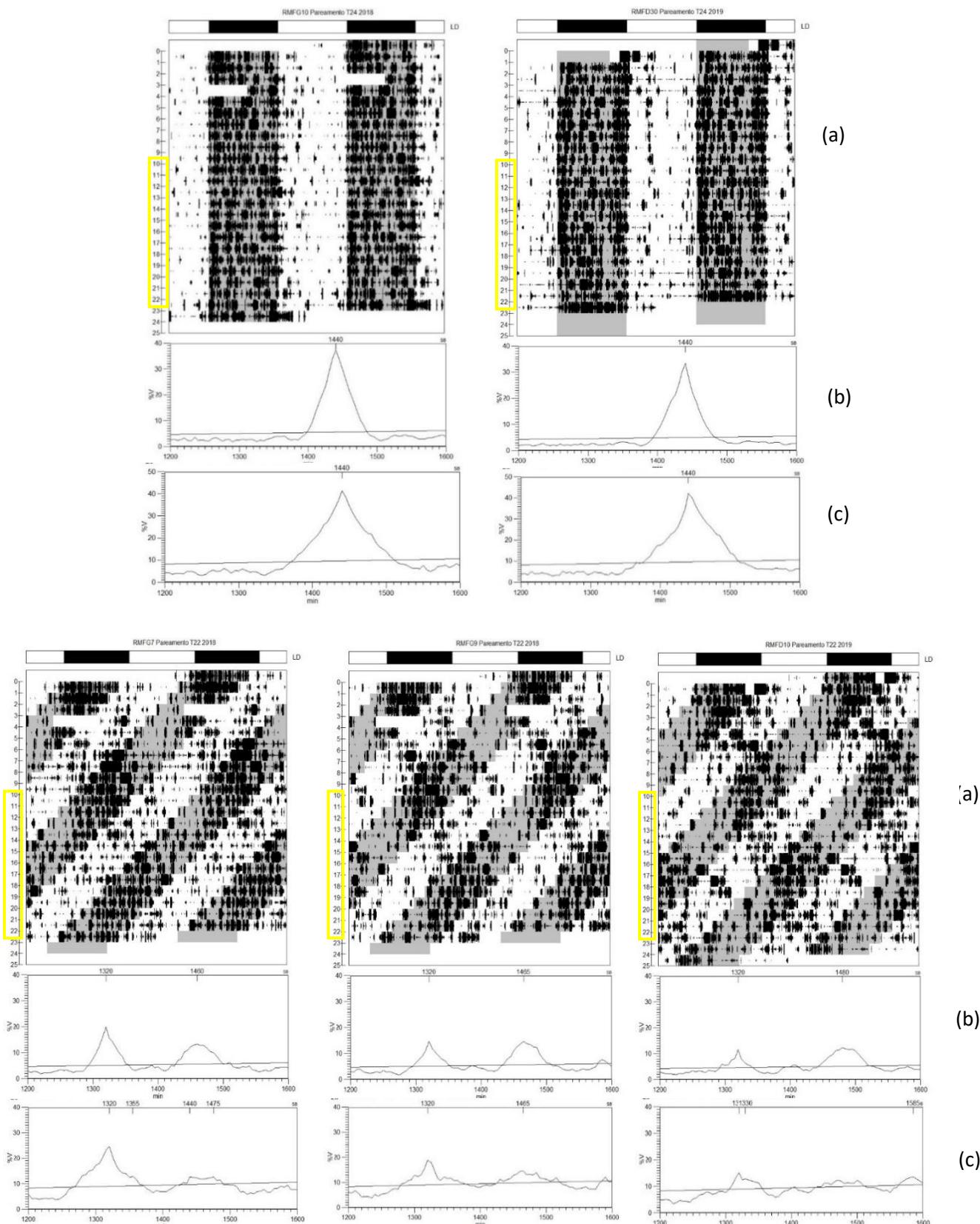


Figura 3.2. Actogramas e periodogramas referentes à fase de pareamento de animais alocados em T24 (cima) e T22 (baixo) nas etapas 1 e 2, os ratos pareados em T22 foram os progenitores dos animais selecionados para o grupo Infância D, enquanto os pareados em T24 tiveram seus filhotes divididos entre os grupos Controle e Adolescência D. **(a)** Actograma contendo os dias completos de pareamento, em amarelo está demarcada a série temporal utilizada para as análises com os dias padronizados entre os animais. **(b)** periodogramas referentes à série temporal completa. **(c)** periodogramas referentes à série temporal com os dias padronizados demarcados em amarelo.

3.1.1.2 Lactação

No que se referem aos dados da Lactação, foi analisado o ritmo circadiano da atividade locomotora da mãe e seus filhotes na gaiola. Como os dados coletados não apresentaram falhas de registro durante esta fase e a movimentação dos filhotes no final da lactação acabou por inviabilizar a distinção da dissociação na análise visual, foi realizada apenas a análise completa com todos os dias de lactação, sendo D0 o seguinte ao nascimento e o último dia tratou-se do dia anterior ao desmame, resultando em séries temporais de 20 e 21 dias.

Os animais em T24 apresentaram período 1440, com média de %V $19,04 \pm 5,11$ demonstrando estarem sincronizados ao ciclo CE ambiental, apesar de ter havido uma diminuição da média do percentual de variância explicada pelo ritmo em relação a fase de pareamento. Ao ser realizado o teste t pareado comparando o %V da fase padronizada do pareamento (13 dias) e o %V da lactação, tivemos diferença estatisticamente significativa $t(5)=6,002$, $p=0,002$, ao ser realizada a comparação entre o %V da lactação e do pareamento com os dias completos a diferença estatística ainda persiste $t(5)=8,003$, $p<0,001$ (Figura 3.3). Para os dados de atividade locomotora coletados na lactação do grupo em T22, os ratos da gaiola G7 apresentaram três componentes rítmicos da atividade locomotora 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. Os ratos das gaiolas G9 e D10 apresentaram padrão arrítmico (Fig. 3.4).

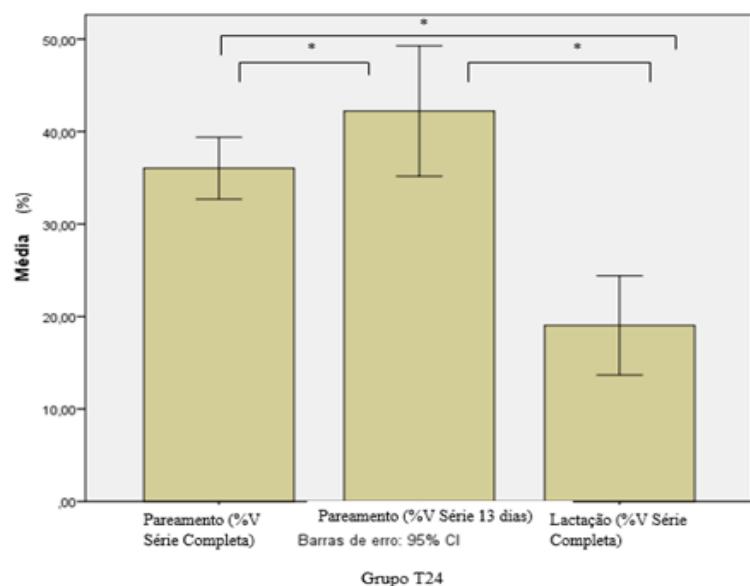


Figura 3.3. Média do percentual de variância explicada pelo ritmo (%V) para os animais do grupo alocado em T24 nas fases de pareamento completo (todos os dias), pareamento padronizado entre os animais (13 dias) e lactação. O período foi o mesmo para todas as fases (1440minutos). Barras de erro indicam intervalo de confiança de 95%.

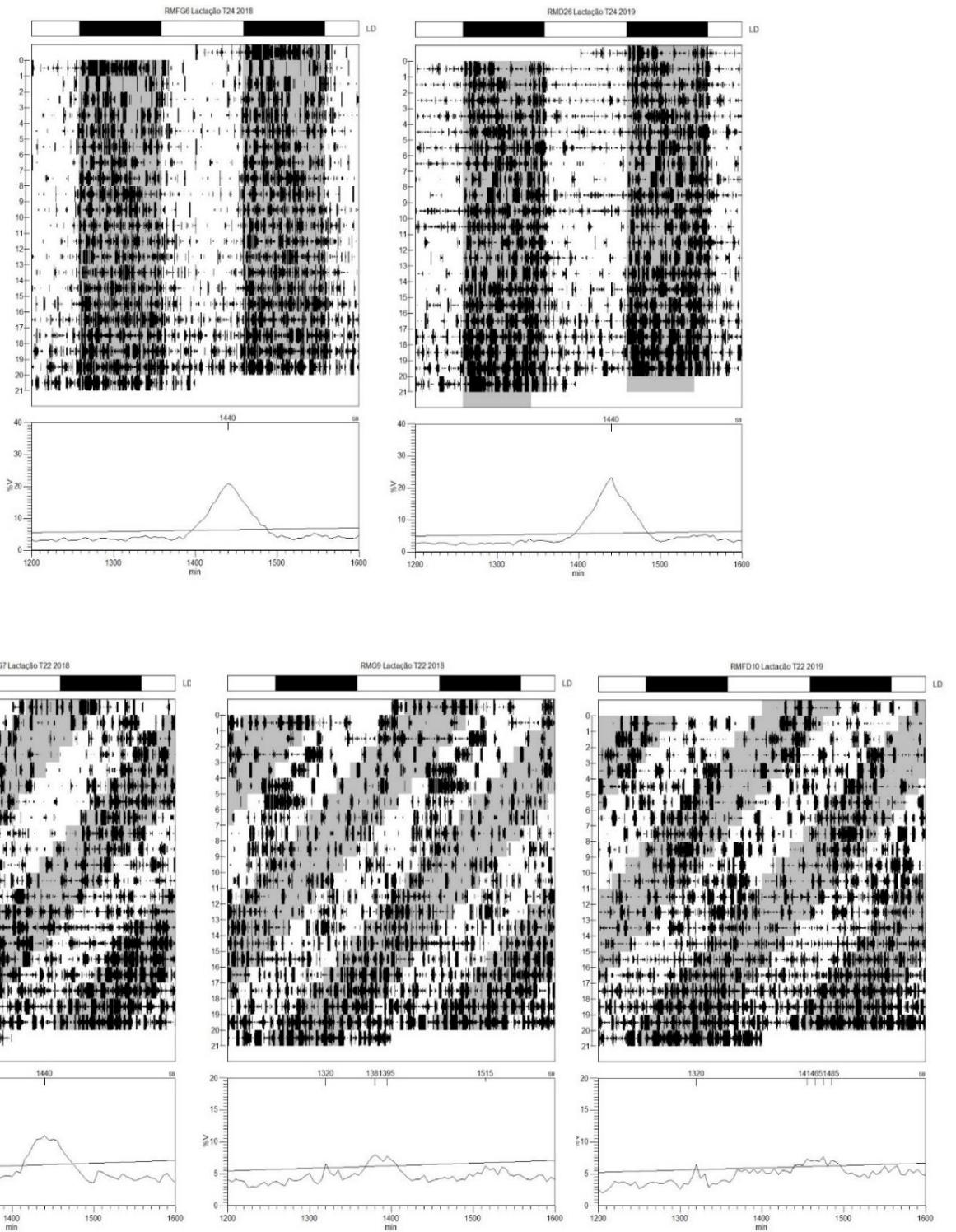


Figura 3.4. Actogramas e periodogramas referentes a fase de lactação de animais alocados em T24 (cima) e T22 (baixo) nas etapas 1 e 2, em cada gaiola estava presente uma mãe com sua ninhada.

3.1.2 Fase Adolescência

Na fase adolescência, que foi iniciada no desmame, os ratos foram distribuídos em gaiolas individuais, dando origem aos seguintes grupos: Grupo Infância D que estava em T22 e passou para o ciclo CE 24 horas até o final do experimento (T22L/T24), enquanto os animais que estavam em T24 foram aleatoriamente divididos entre: grupo Controle (T24L/T24) e grupo Adolescência D (T24L/T22), tendo este último iniciado o protocolo T22 no dia do desmame.

O grupo Adolescência D ficou exposto ao protocolo T22 entre 42-44 dias, sendo excluídos os momentos de transição (dias em que foi realizada a alteração do protocolo T24 para T22), resultando em um total de 40-42 dias para análise. Com a finalidade de equiparar os animais das duas etapas quanto ao número de dias, foi realizada um teste t pareado para a análise do %V sincronizado ao CE 22h e CE endógeno nos animais da etapa 1 que passaram por dois dias adicionais de protocolo (6 animais). De acordo com os resultados, não houve diferenças estatisticamente significativas para esses parâmetros rítmicos entre os dias 40 e 42 de submissão ao protocolo $t(6) = 0,182$ $p = 0,861$ e $t(6) = 1$, $p = 0,356$, respectivamente. O período sincronizado ao claro/escuro foi o mesmo para ambas as séries temporais ($T= 1320$) e o período do componente rítmico endógeno também não apresentou diferenças estatisticamente significativas Wilcoxon=1 $p= 0,317$

Para os dados com 40 dias, o Grupo Controle apresentou ritmicidade da atividade locomotora com período de 1440 e média de %V 22, $26 \pm 3,74$. O grupo Infância D, por sua vez, apresentou período de 1440 com %V médio de $18,88 \pm 4,77$. Para o grupo Adolescência D, foram selecionados os animais que apresentavam a dissociação do ritmo de atividade locomotora, com um dos componentes sincronizado ao CE 22 horas 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 $5,17 \pm 0,96$.

Com o objetivo de comparar o número equivalente de dias entre os grupos de ambas as etapas, foram analisados 14 dias da série temporal total (D27 ao D40 em relação aos dias de protocolo) e os resultados obtidos foram (Tabela 3.2): O Grupo Controle apresentou ritmicidade da atividade locomotora com período $1440,71 \pm 1,81$, ou seja, permaneceu sincronizado ao ciclo claro/escuro e houve um aumento no percentual de variância explicada pelo ritmo com média de $32,94 \pm 6,6$, sendo o resultado da comparação entre os dias completos e padronizados $t(13)= -8,224$ $p<0,001$; O Grupo Infância D, por sua vez, também manteve a sincronização ao ciclo claro/escuro e apresentou período de $1441,25 \pm 2,26$, com aumento na média de %V $27,46 \pm 5,7$, $z= 3,059$ $p=0,02$. Ao realizar a comparação do %V entre os grupos Controle e Infância D com o teste t para os dias completos $t (24)= 0,055$ $p=0,55$ e Mann-Whitney para os dias

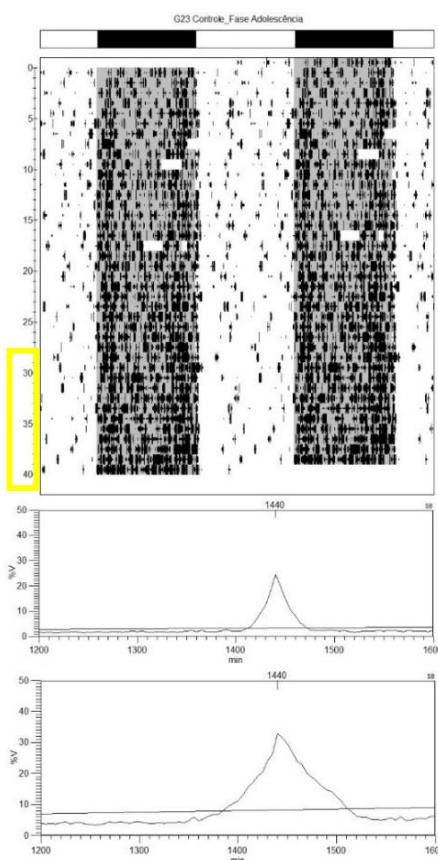
padronizados tivemos $z=-1,852$ $p=0,067$, foi encontrada uma tendência para diferença estatisticamente significativa, tendo o grupo Controle maior %V em ambos os casos.

Em relação ao Grupo Adolescência D, foi encontrado o Período equivalente ao ritmo sincronizado ao ciclo CE 1320 com aumento na média do percentual de variância $12,23 \pm 2,04$, $t(9) = -8,884$ $p < 0,001$, enquanto o componente rítmico endógeno apresentou uma estabilidade na média de período de $1486,5 \pm 36,44$ com aumento na média de %V $13,06 \pm 1,9$, $z=2,803$ $p=0,05$. Os dias utilizados para a análise estão destacados no actograma abaixo, sendo o dia 0 equivalente ao primeiro dia completo no protocolo T22 para o grupo AD e primeiro dia completo em T24 para o grupo ID (excluindo o dia de mudança de protocolo) (Fig. 3.5).

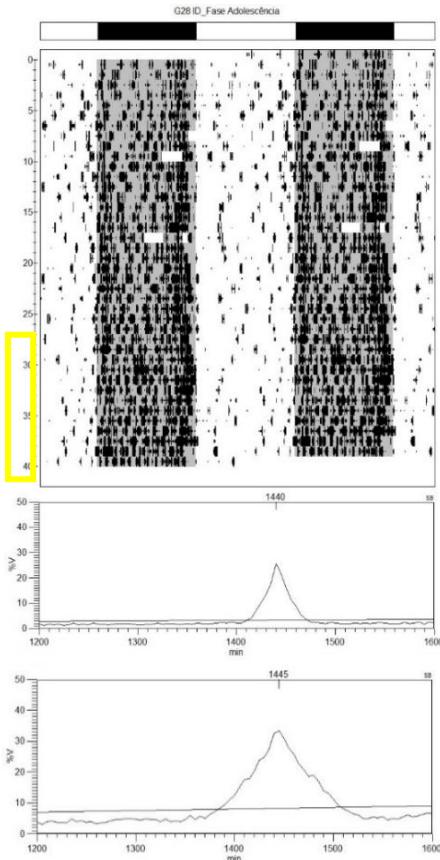
Fase Adolescência															
Dias completos								Dias padronizados (14 dias)							
Grupo Controle		Grupo Infância D		Adolescência D				Grupo Controle		Grupo Infância D		Adolescência D			
				T22 h		T>24 h						T22 h		T>24 h	
T	%V *	T	%V *	T	%V *	T	%V *	T	%V *	T	%V *	T	%V *	T	%V *
144 0	22, 3± 3,74	1440	18,9± 4,77	132	6,68± 1,75	1484,5 ± 15,53	5,17 ± 0,96	1440,7 ± 1,81	32,94 ± 6,6	1441,2 5 ± 2,26	27,5 ± 5,7	1320	12,23 ± 2,04	1486,5 ± 36,44	13,0 6 ± 1,9

Tabela 3.2. Média e desvio padrão dos resultados encontrados para a série temporal completa (esquerda) e padronizada (direita) sendo incluídos os animais da etapa 1 e 2 alocados nos grupos Controle (T24L/T24), Infância D (T22L/T24) e Adolescência D (T24L/T22). Os valores em negrito, demarcados com * obtiveram $p < 0,05$ ao serem comparados via teste t pareado, ou seja, com a diminuição da série temporal estes valores apresentaram mudanças estatisticamente significativas.

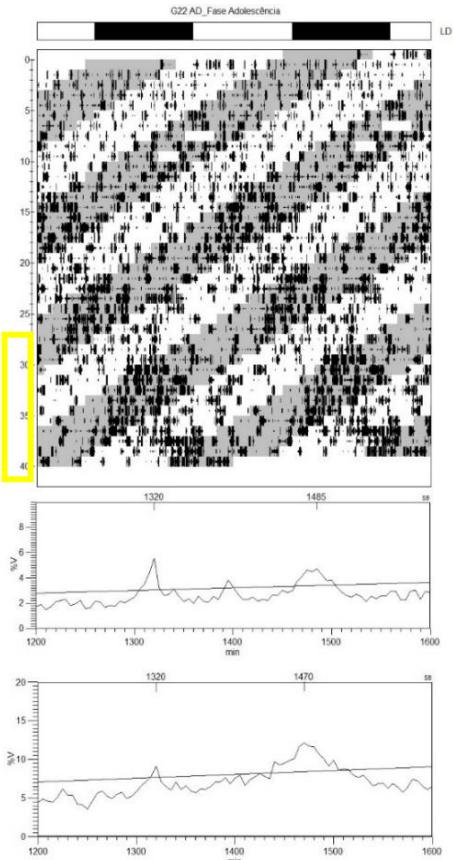
Controle



Infância D



Adolescência D

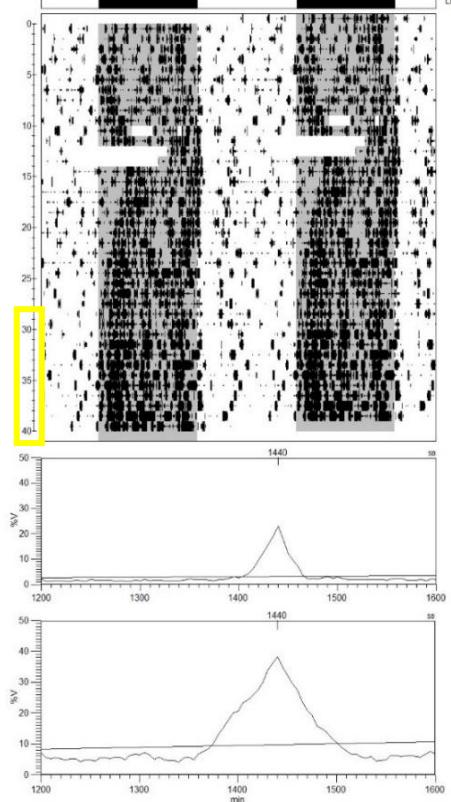


a)

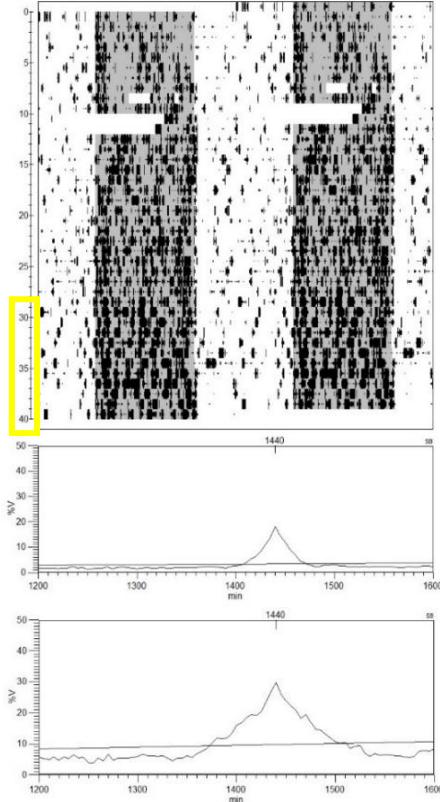
b)

c)

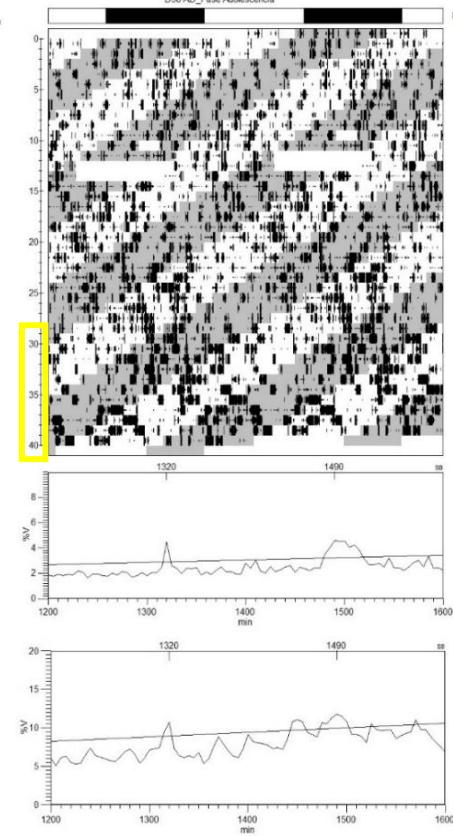
D29 Controle_Fase Adolescência



D15 ID_Fase Adolescência



D36 AD_Fase Adolescência



a)

b)

c)

Figura 3.5. Actogramas e periodogramas referentes a fase da adolescência das etapas 1 e 2. (a) Actograma contendo os dias completos de pareamento, em amarelo está demarcada a série temporal utilizada para as análises com os dias padronizados entre os animais. (b) periodogramas referente a série temporal completa. (c) periodogramas referente à série temporal com os dias padronizados demarcados em amarelo.

3.1.3 Fase Adulta

Nesta fase todos os animais haviam sido submetidos ao ciclo simétrico CE 12:12. Para a construção dos actogramas completos foi utilizada a série temporal tendo como dia 0 o dia seguinte ao início do protocolo T24 para o grupo Adolescência D, e o último dia como o dia final da realização da tarefa de esquiva passiva (última tarefa do protocolo). Como os animais não realizaram as tarefas no mesmo dia, os ratos passaram entre 59 e 78 dias nesta condição luminosa e concluíram os testes com idade entre 125 à 142 dias, conforme especificado na Tabela 3.3.

Etapa 1				Etapa 2			
Rato	Grupo	Dias no protocolo	Dias Pós-Nascimento (final do experimento)	Rato	Grupo	Dias no protocolo	Dias pós nascimento (final do experimento)
G12	CT	59	125	D38	AD	73	137
G13	CT	62	128	D09	AD	72	136
G14	CT	61	127	D10	AD	72	136
G16	AD	62	130	D11	AD	71	135
G17	AD	61	128	D12	ID	72	136
G18	AD	63	131	D13	ID	71	135
G19	AD	61	129	D14	ID	72	136
G20	AD	62	130	D15	ID	76	140
G22	AD	63	131	D24	CT	71	135
G23	CT	63	128	D25	CT	78	142
G24	CT	61	127	D26	CT	78	142
G25	CT	63	128	D28	CT	73	137
G26	CT	59	125	D29	CT	77	141
G27	ID	59	124	D30	CT	72	136
G28	ID	63	128	D31	CT	73	137
G29	ID	61	126				
G30	ID	62	127				
G31	ID	63	128				
G32	ID	59	124				
G33	ID	62	127				
G34	ID	61	126				

Tabela 3.3. Descrição da fase adulta nas etapas 1 e 2, incluindo a especificação dos animais e seus respectivos grupos. A terceira coluna equivale a quantos dias o rato passou exposto ao protocolo T24 na fase adulta, que foi contabilizado desde o término do protocolo T22 para o grupo AD até o dia do último teste comportamental. A quarta coluna diz respeito ao dia em que foi finalizada a fase adulta, que equivale aos dias pós-nascimento até a realização do último dia da tarefa de esquiva passiva (final dos experimentos comportamentais).

Para a análise dos parâmetros rítmicos: Mesor, Amplitude, Acrofáse e Percentual de Variância (Tabela 3.4), foram excluídos todos os momentos em que ocorreram perda de dados. Sendo assim, foi realizado um recorte de 23 dias da série temporal, equivalente aos dias D18-D40 do protocolo, sendo D0 o dia pós finalização do protocolo T22 para o grupo Adolescência D. Neste sentido foi analisada a série temporal dos animais com cerca de 82 dias até 104 dias pós nascimento.

Em relação aos resultados da análise, foi executada a Anova de uma via para avaliar se havia diferenças entre grupos para as variáveis mencionadas. Não foram encontradas diferenças significativas para as variáveis: Mesor $F(2,33) = 0,839$, $p = 0,441$; Amplitude $F(2,33) = 1,808$, $p = 0,180$; e Acrofáse $F(2,33) = 0,554$, $p=0,580$. Para a variável percentual de variância explicada pelo ritmo 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 robustez no ritmo em relação aos outros dois grupos (Fig. 3.6.).

Vida Adulta														
Grupo Controle					Grupo Infância D					Grupo Adolescência D				
T	%V	Mesor	Amplitude	Acrofáse	T	%V	Mesor	Amplitude	Acrofáse	T	%V	Mesor	Amplitude	Acrofáse
1441,4 +-2,34	36,3 +6,5	29,3 +-7	32,1 +-8,5	778,5+ -38,9	1440,8 +-1,9	30,2 +6,1	25,7 +-10,5	26,4 +-11	769,4 +-19,78	1440	37,4 +5,64	29,7 +-6,5	33,2 +-7,9	781,9 +-26,9

Tabela 3.4. Média e desvio padrão dos resultados encontrados para as variáveis período, percentual de variância explicada pelo ritmo (% V), mesor, amplitude e acrofáse em cada um dos grupos (Controle, Infância e Adolescência D) para a série temporal padronizada entre as duas etapas.

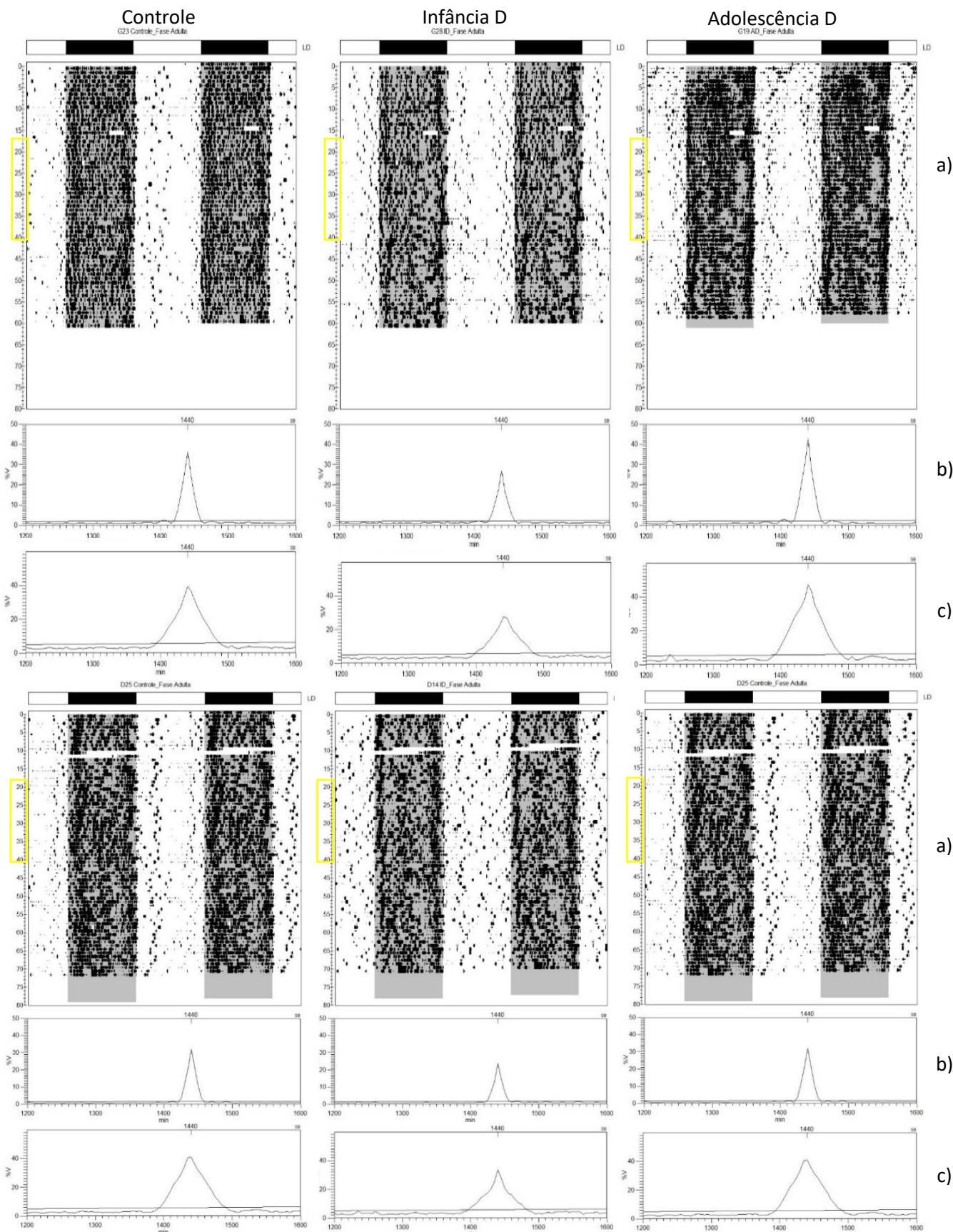


Figura 3.6. Actogramas e periodogramas referentes a fase adulta das etapas 1 (cima) e 2 (baixo). (a) Actograma contendo os dias completos de pareamento, em amarelo está demarcada a série temporal utilizada para as análises com os dias padronizados entre os animais. (b) periodogramas referente a série temporal completa. (c) periodograma referente à série temporal com os dias padronizados demarcados em amarelo.

3.2 Análise do Peso Corporal e do Consumo de Água e Ração

3.2.1 Peso Corporal

As pesagens foram executadas semanalmente com início no dia 10 pós-desmame (entre P31 e P34), totalizando 14 registros. Para a análise dos dados foi executada a ANOVA mista e os resultados foram interpretados a partir da correção de Greenhouse-Geisser, visto que o teste de Mauchy não aferiu esfericidade. Foi demonstrado efeito entre as semanas [$F(3,685; 114,238) = 1397,87; p < 0,001$]; efeito de interação das semanas entre os grupos [$F(7,370; 114,238) = 4,208; p < 0,001$]; e efeito entre os grupos analisados [$F(2,31) = 3,917, p = 0,03$].

O teste de comparação entre pares, com correção de Bonferroni, foi realizado com o objetivo de comparar a diferença de pesos entre os grupos ao longo de cada semana. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos durante as semanas 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 8, $p > 0,05$. A partir da semana 7 o grupo Infância D (média: 308,364) apresentou média de peso maior em relação ao grupo Adolescência D (média: 275,889) $p = 0,036$; na semana 9 o grupo Adolescência D (média: 294) apresentou peso menor em relação ao grupo Infância D (média: 336,273) $p = 0,015$ e tendência de resultado significativo em relação ao grupo Controle (média: 327,214) $p = 0,054$; e na semana 11, a média de peso do grupo Adolescência D (média: 308,556) apresentou-se significativamente menor em relação à média de pesos dos grupos Infância D (média: 363,818) $p = 0,001$ e Controle (média: 345,571) $p = 0,025$. Para as semanas 10, 12, 13 e 14 a diferença entre o Grupo Infância D e Adolescência D persistiu, com o grupo AD apresentando média de peso menor em relação ao ID $p < 0,05$ (Figura 3.7).

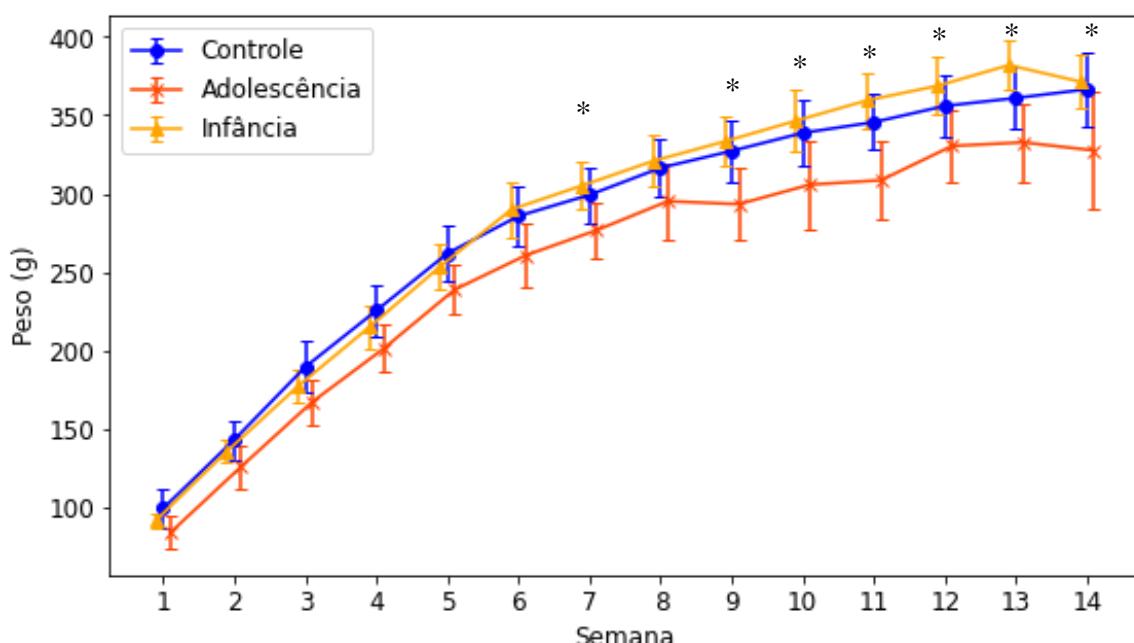


Figura 3.7. Médias da massa corporal (em gramas) dos animais ao longo das semanas, para os três grupos: Controle, Adolescência D e Infância D. As barras de erro indicam intervalos de confiança de 95% para as médias.

3.2.2 Consumo de Ração

O registro dos dados do consumo de ração foi executado durante 13 semanas, com início na semana 2 do registro de consumo de ração. Para a análise dos dados foi executada a ANOVA mista e os resultados foram interpretados a partir da correção de Greenhouse-Geisser. Foi demonstrado efeito entre as semanas [$F(3,473; 114,609) = 92,483; p<0,001$], assim como efeito de interação das semanas entre os grupos [$F(6,946; 114,609) = 2,199; p=0,04$]. No entanto não foi constatado efeito entre os grupos analisados [$F(2,33) = 2,109, p=0,137$].

O teste de post hoc, com correção de Bonferroni, foi realizado com o objetivo de comparar a diferença do consumo de ração entre os grupos ao longo de cada semana. Os resultados encontrados demonstram não haver diferenças estatisticamente significativas das médias de ração consumida entre os grupos nas semanas 2, 4, 5, 6, 7, 12, 13 e 14 $p>0,05$. As diferenças foram encontradas nas semanas: Semana 3 com o Grupo Controle (média: 151,5) apresentando consumo médio maior em relação ao Adolescência D (média: 133) $p=0,025$; Semana 8, na qual o Grupo Infância D (média: 181,9) apresentou tendência para consumo de ração maior em relação ao Controle (média: 175,28) $p=0,074$ e em relação ao Grupo Adolescência D (média: 159,7) $p=0,008$; Na Semana 9, o grupo Infância D (média: 176,16) apresentou consumo maior em relação ao grupo Adolescência D (média: 160,3) ($0,043$) e na semana 11 o grupo Infância D (média: 198,83) apresentou consumo maior em relação ao grupo Controle (média: 166,64) $p=0,04$ e Adolescência D (média: 166) $p=0,06$ (Figura 3.8).

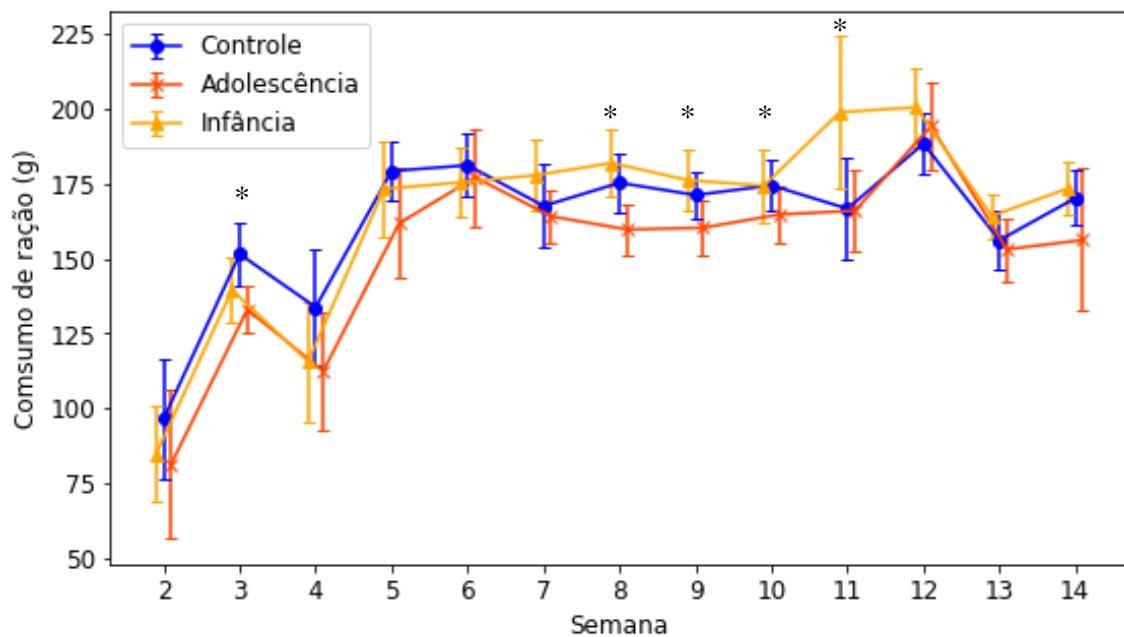


Figura 3.8 Médias da ração consumida (em gramas) pelos animais ao longo das semanas, para os três grupos: Controle, Adolescência D e Infância D. As barras de erro indicam intervalos de confiança de 95% para as médias.

3.2.3 Consumo de Água

O registro dos dados do consumo de água foi executado em conjunto com o consumo de ração, até o momento da realização do teste de preferência à sacarose, totalizando 12 semanas (Figura 3.9). Para a análise dos dados foi executada a ANOVA mista e os resultados foram interpretados a partir da correção de Greenhouse-Geisser. Foi demonstrado efeito entre as semanas [$F(3,720; 122,749) = 25,449$; $p < 0,001$], no entanto, não foi constatado efeito de interação das semanas entre os grupos [$F(7,439; 122,749) = 0,959$; $p = 0,467$], assim como não houve efeito entre os grupos analisados [$F(2,33) = 1,532$, $p = 0,231$].

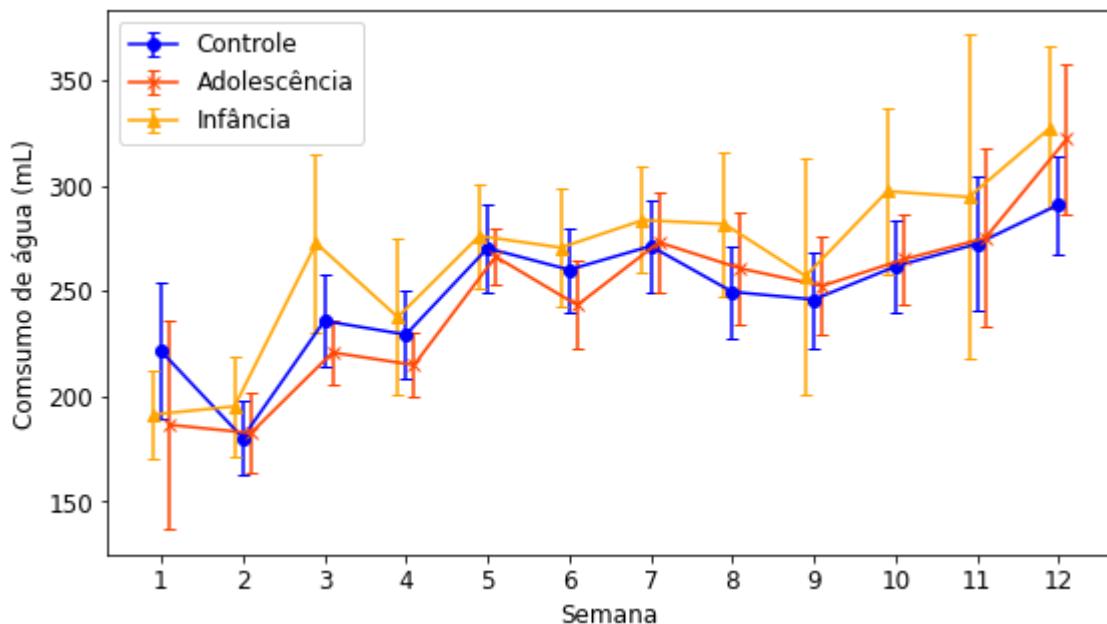


Figura 3.9. Médias da quantidade de água consumida (em mililitros) pelos animais ao longo das semanas, para os três grupos: Controle, Adolescência D e Infância D. As barras de erro indicam intervalos de confiança de 95% para as médias.

3.3 Tarefas Comportamentais

3.3.1 Campo Aberto

3.3.1.1 Dados da atividade locomotora

Para os dados do padrão de atividade locomotora no campo aberto, por meio da Anova de uma via, foi constatado que o Tempo que os animais passaram no *Centro do Campo* não diferiu entre os três grupos $F(2,33) = 0,401$, $p = 0,673$. Conforme o encontrado na análise de Kruskal-Wallis de Amostras Independentes, 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* ($2 = 1,437$, $p = 0,487$) (Fig. 3.10).

O teste de Wilcoxon de amostras relacionadas foi utilizado para avaliar a diferença no tempo de locomoção na Periferia e no Centro do campo durante os primeiros cinco minutos e

os últimos cinco minutos da tarefa (Centro 1 (C1) e Centro (2); Periferia 1 (P1) e Periferia (2)). Para o grupo **Controle** não houve diferença estatisticamente significativa ao longo da sessão no tempo despendido no *Centro* do campo (C1 Mdn=29, C2 Mdn=36) e no tempo da *Periferia* (P1 Mdn= 270, P2 Mdn=263), *Centro* $z= 0,973$, $p=0,331$, $r=0,26$ e *Periferia* $z= -0,973$, $p=0,331$, $r= -0,26$. O Grupo **ID** apresentou diminuição do tempo passado no *Centro* nos últimos 5 minutos (C1 Mdn=28, C2 Mdn=14) e aumento no tempo na *Periferia* (P1 Mdn=271, P2 Mdn=285), *Centro* $z= -2,040$, $p=0,041$, $r= -0,59$ e *Periferia* $z= 2,040$, $p=0,041$, $r= 0,59$. Enquanto o Grupo **AD** também não diferiu com significância estatística no tempo passado no *Centro* (C1 Mdn=37, C2 Mdn=17), e na *Periferia* (P1 Mdn=262, P2 Mdn=282) ao longo da sessão, *Centro* $z= -0,866$, $p=0,386$, $r= -0,27$ e *Periferia* $z= 0,866$, $p=0,386$, $r= 0,27$.

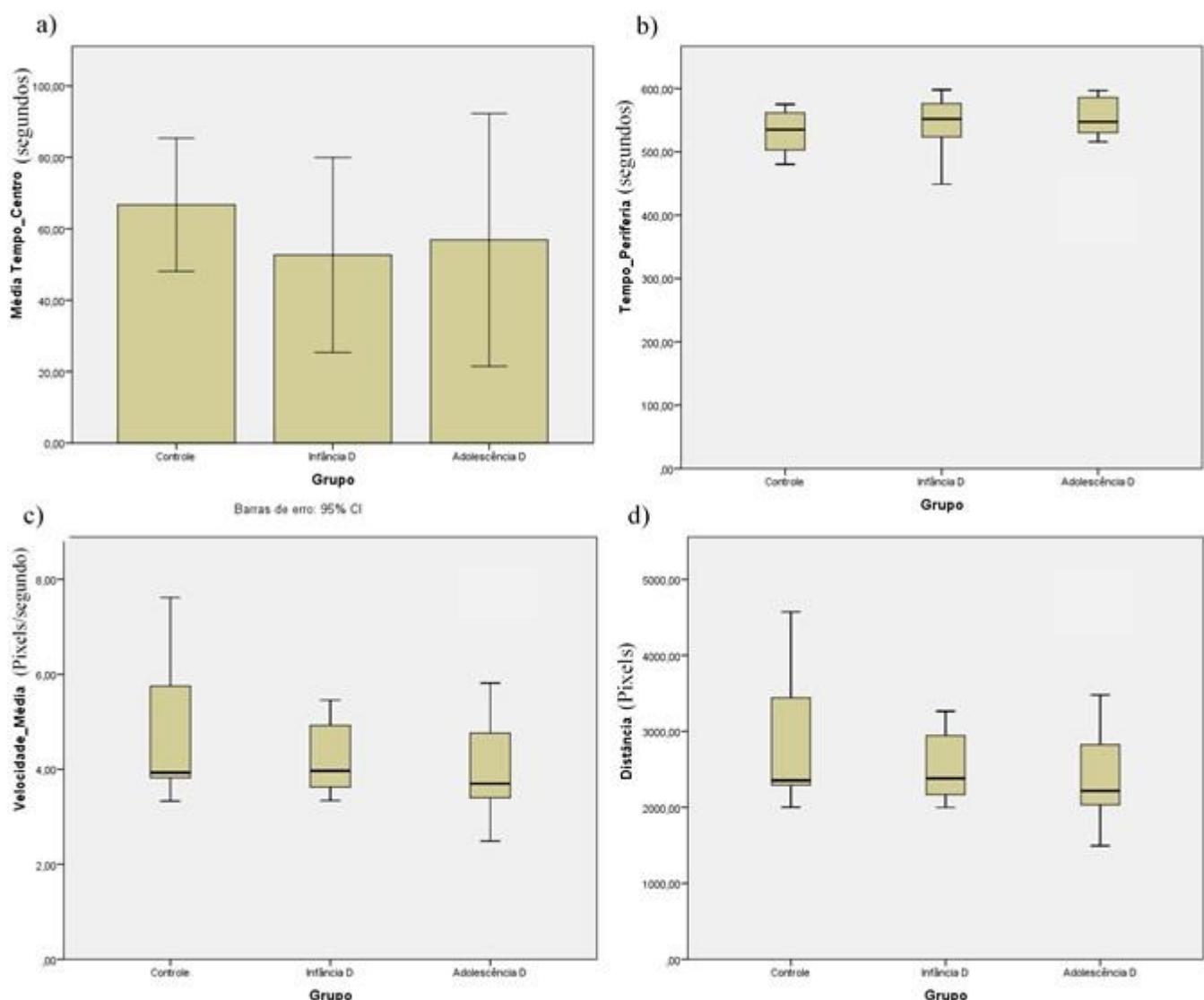


Figura 3.10. Gráficos com as médias dos dados das variáveis da atividade locomotora durante a tarefa de campo aberto para os grupos Controle, Infância D e Adolescência D: a) Média (em segundos) do tempo que os animais passaram no centro do aparato b) Média (em segundos) do tempo em que os animais estiveram 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.

3.3.1.2 Rearing

A Anova de uma via foi executada a fim de comparar entre os grupos a *duração* e a *frequência* do Rearing total (soma do rearing apoiado e sem apoio), a Anova demonstrou não haver diferenças estatisticamente significativas entre os parâmetros analisados $F(2,33)= 1,999$ $p= 0,152$ e $F(2,33) = 2,280$, $p= 0,118$, respectivamente.

Foi realizado o teste de Kruskal-Wallis de Amostras Independentes para comparar as variáveis *duração* e *frequência* para o *Rearing apoiado* e *sem apoio* entre os grupos. Para as variáveis *duração* e *frequência* do *Rearing apoiado* não foram encontradas diferenças com significância estatística entre os grupos, sendo encontrados os resultados $H(2)= 0,842$, $p=0,656$ e $H(2)= 1,921$, $p=0,383$, respectivamente. Em relação ao *Rearing sem apoio* foi encontrada uma tendência para diferenças estatisticamente significativas entre os grupos para a variável frequência $H(2)= 5,789$, $p=0,055$, enquanto a variável duração apresentou $H(2) =5,309$, $p=0,07$ (Fig.3.11).

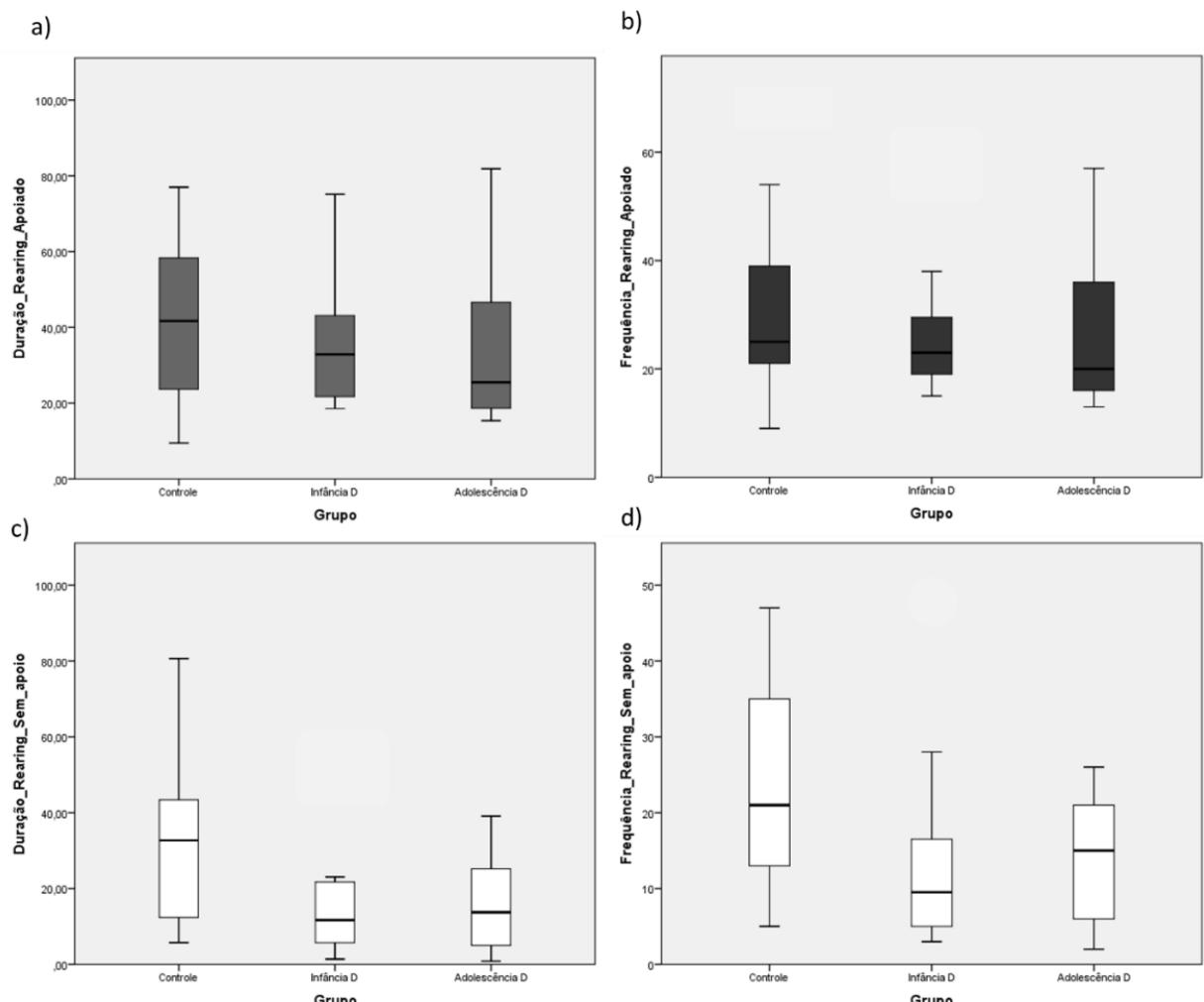


Figura 3.11. a) Média da duração em segundos dos episódios de rearing apoiado b) Média da frequência dos episódios de rearing apoiado c) Média da duração em segundos dos episódios de rearing sem apoio d) Média da frequência dos episódios de rearing sem apoio Controle, AD e ID

3.3.1.3 Grooming

Foi realizado o teste Kruskal-Wallis de Amostras Independentes para comparar a duração e a frequência do Grooming total (soma do grooming completo e incompleto) entre os grupos, os resultados do teste não apresentaram diferenças estatisticamente significativas para as variáveis analisadas $H(2) = 0,797$ $p= 0,671$ e $H(2) = 4,149$, $p= 0,126$, respectivamente.

Para as variáveis *duração* e *frequência* do *Grooming completo* não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, $H(2)= 0,794$, $p=0,672$ e $H(2)= 1,183$, $p=0,553$, respectivamente. Em relação ao *Grooming Incompleto* não houve diferença estatisticamente significativa para a variável *duração* $H(2)= 5,124$ $p=0,077$; enquanto para a variável *frequência* foram encontradas diferenças entre os grupos $H(2)= 7,038$, $p=0,030$, com a realização da comparação entre pares foi constatado que a diferença se apresentava entre os grupos Infância D ($Mdn= 1,50$) e Adolescência D ($Mdn=6$) $p=0,025$ (Fig 3.12).

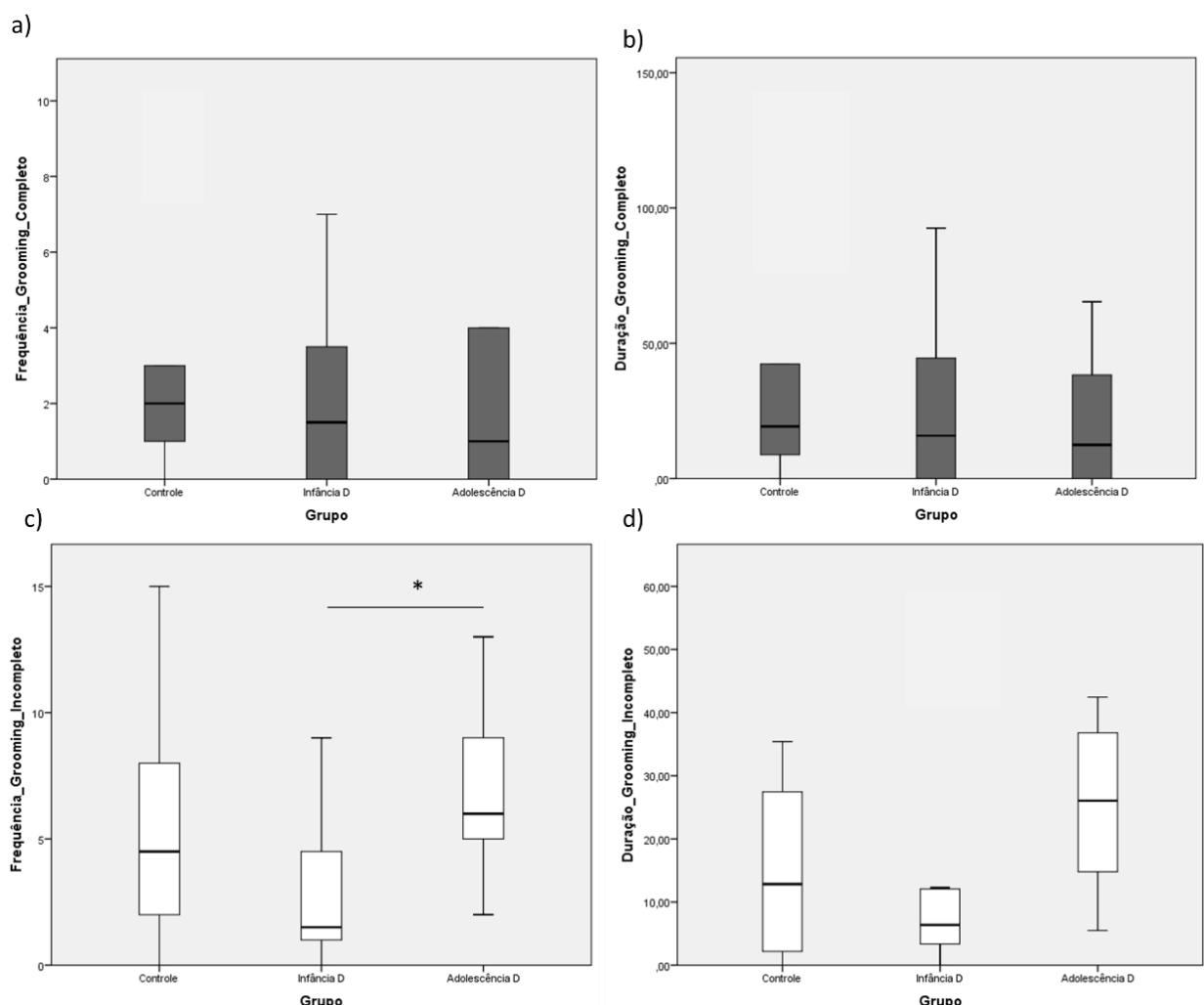


Figura 3.12. a) Média da frequência dos episódios de grooming completo b) Média da duração em segundos dos episódios de grooming completo c) Média da frequência dos episódios de grooming incompleto d) Média da duração em segundos dos episódios de grooming incompleto para os grupos Controle, AD e ID

3.3.1.4 Fezes

O teste Kruskal-Wallis de Amostras Independentes também foi utilizado para comparar a *quantidade de fezes* excretadas pelos animais durante a sessão de Campo Aberto. Conforme os resultados apresentados, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos H (2)= 0,677, p=0,713 (Fig. 3.13).

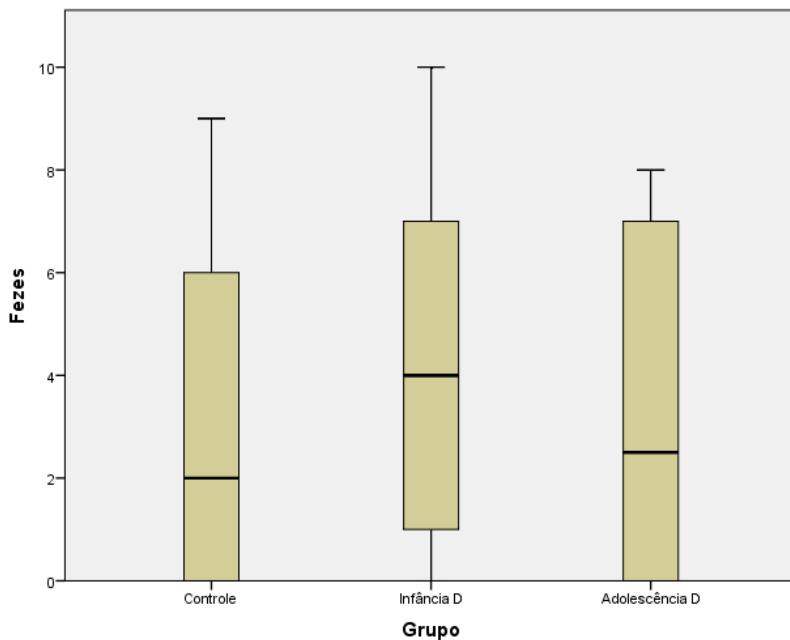


Figura 3.13. Quantidade de fezes excretadas pelos animais dos grupos Controle, Infância D e Adolescência D durante a tarefa de campo aberto.

3.3.2 Reconhecimento de Objetos Novos

3.3.2.1 Amostra

Conforme o resultado obtido através da ANOVA de uma via para amostras independentes, não houve diferença estatisticamente significativa para a variável *total de exploração* F(2,33): 0,732; p = 0,488, no entanto para a *frequência de exploração* foi encontrada uma tendência para a diferença entre os grupos F(2,33): 3,261; p= 0,051. Para a variável *latência* o teste de Kruskal-Wallis de Amostras Independentes não apresentou diferenças significativas entre os grupos H(2)= 0,259, p= 0,879 (Fig 3.14).

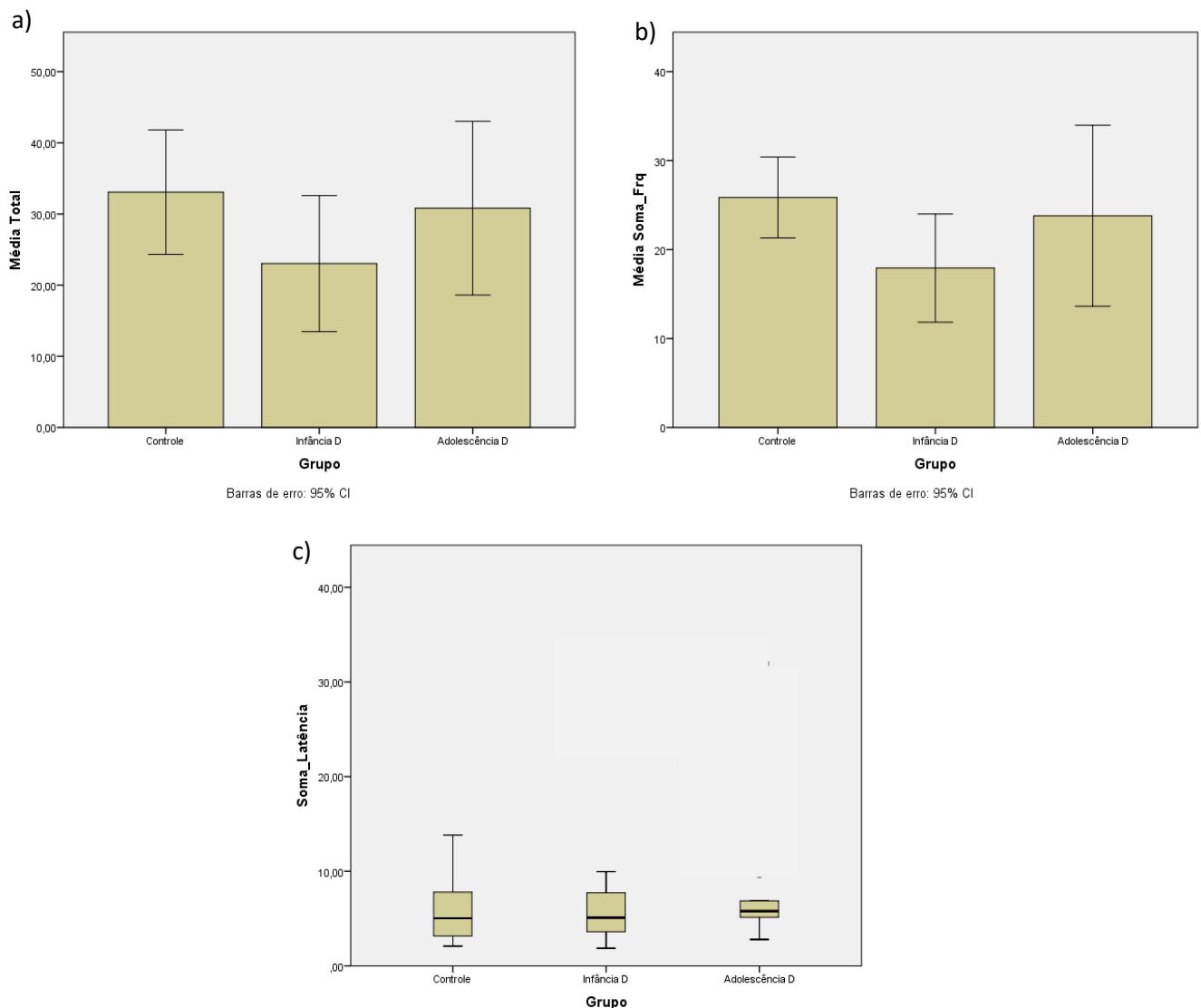


Figura 3.14. Variáveis analisadas na sessão de amostra da tarefa de Reconhecimento de objetos novos:
a) Média em segundos do total de exploração dos objetos b) Média da soma da frequência de exploração dos objetos c) Latência para a exploração do primeiro objeto em segundos.

Foi realizado o teste t pareado para cada um dos grupos comparando a variável *taxa de exploração* entre o objeto alocado no lugar em que esteve o objeto familiar durante o teste (objeto no local familiar) e o objeto alocado no lugar em que esteve o objeto novo durante o teste (objeto no local novo).

Para o **grupo Controle** a diferença entre a taxa de exploração do local em que estava posicionado o objeto familiar no teste (média= 0,55) em relação ao local em que estava posicionado o objeto novo (média= 0,45), não foi estatisticamente significativa $t(13)=-1,754$ $p=0,103$, $d= -0,41$, $r= -0,9$. O mesmo ocorreu no **grupo Infância D** em relação a exploração do local em que estava posicionado o objeto novo do teste (média= 0,54)e o local em que estava posicionado o objeto familiar (média= 0,46), $t(11)=1,090$ $p=0,299$, $d= 0,61$, $r= 0,29$. Para o grupo **Adolescência D** a taxa de exploração do local em que estava posicionado o objeto familiar do teste (média= 0,49) em relação ao local em que estava posicionado o objeto novo

(média= 0,51), também não obteve diferença estatisticamente significativa $t(9)= 0,279$; $p=0,787$, $d= 0,14$ $r= 0,071$ (Fig. 3.15).

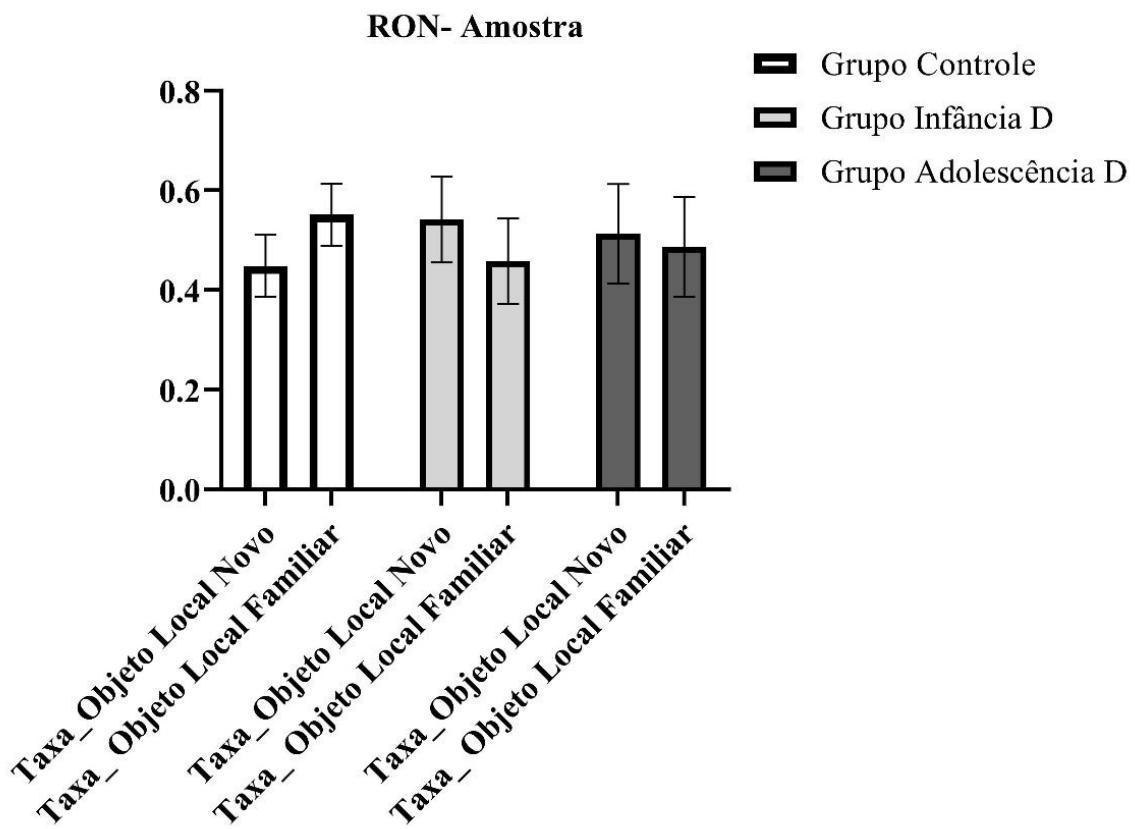


Figura 3.15. Taxa de exploração do objeto no local novo e familiar para os grupos: Controle, Infância D e Adolescência D (respectivamente) na sessão de amostra da tarefa de reconhecimento de objetos novos. Barras de erro indicam intervalo de confiança de 95%.

3.3.2.2 Teste

No que se refere à sessão de teste, por meio da Anova de uma via 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 detectou diferença estatisticamente significativa para a variável *latência de exploração* $H(2) = 0,849$, $p= 0,654$ (Figura 3.16).

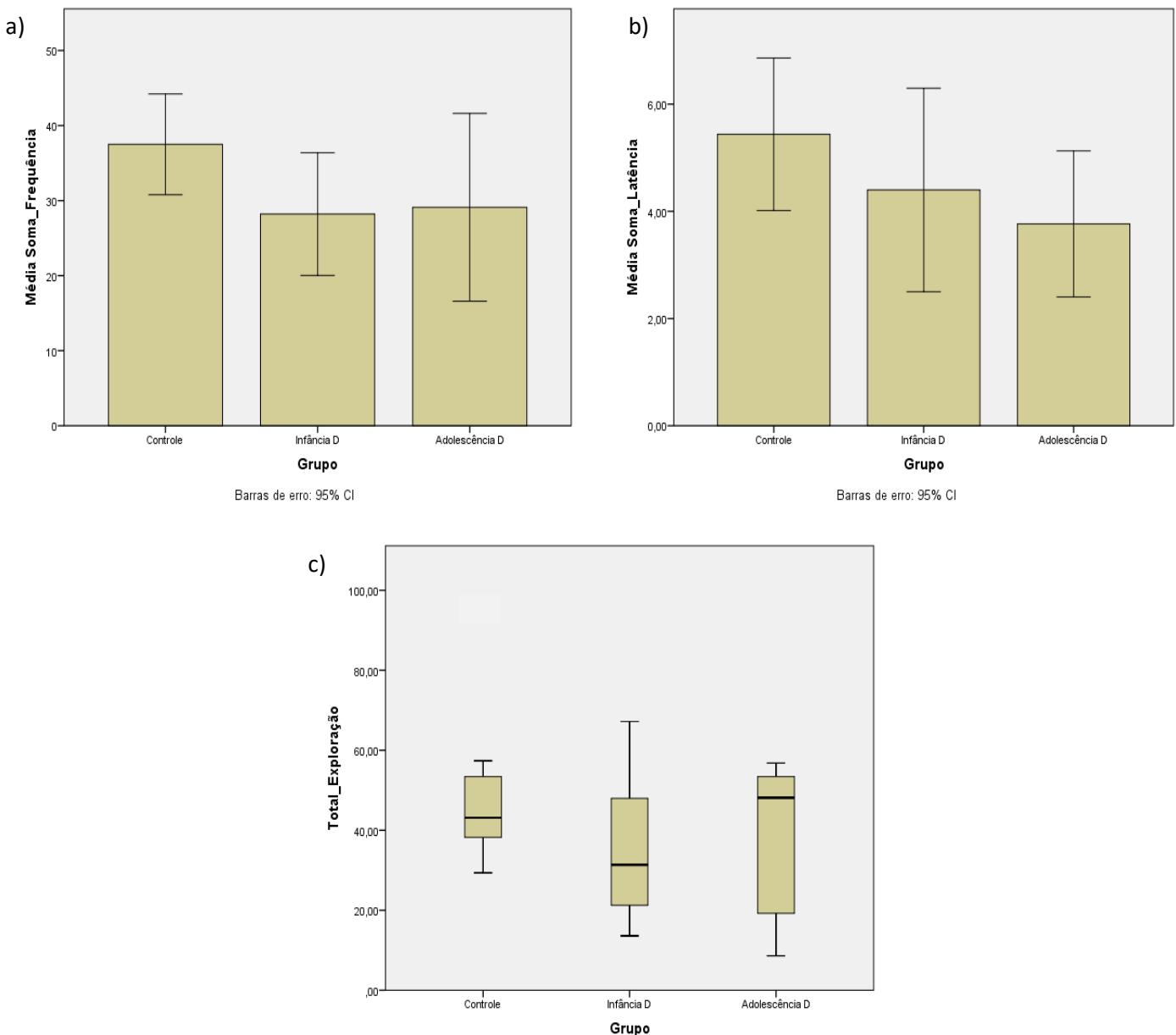


Figura 3.16. Variáveis analisadas na sessão de teste da tarefa de Reconhecimento de objetos novos: a) Média em segundos do total de exploração dos objetos b) Média da soma da frequência de exploração dos objetos c) Latência para a exploração do primeiro objeto em segundos.

O teste t pareado foi realizado para cada um dos grupos com o objetivo de averiguar se existiam diferenças entre as *taxas de exploração* para o objeto novo e objeto familiar. O **grupo Controle** apresentou diferença significativa para esta variável $t(13)= 2,450$, $p=0,029$, $d= 1,33$, $r= 0,55$; tendo o objeto novo (média= 0,60) sido mais explorado do que o objeto familiar (média= 0,40). Para o grupo **Infância D** a taxa de exploração do objeto novo (média= 0,56) não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação a taxa de exploração do objeto familiar (média = 0,44), $t(11)= 1,246$ $p= 0,239$, $d=0,76$, $r= 0,36$. O grupo **Adolescência D** apresentou 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) (Fig. 3.17) .

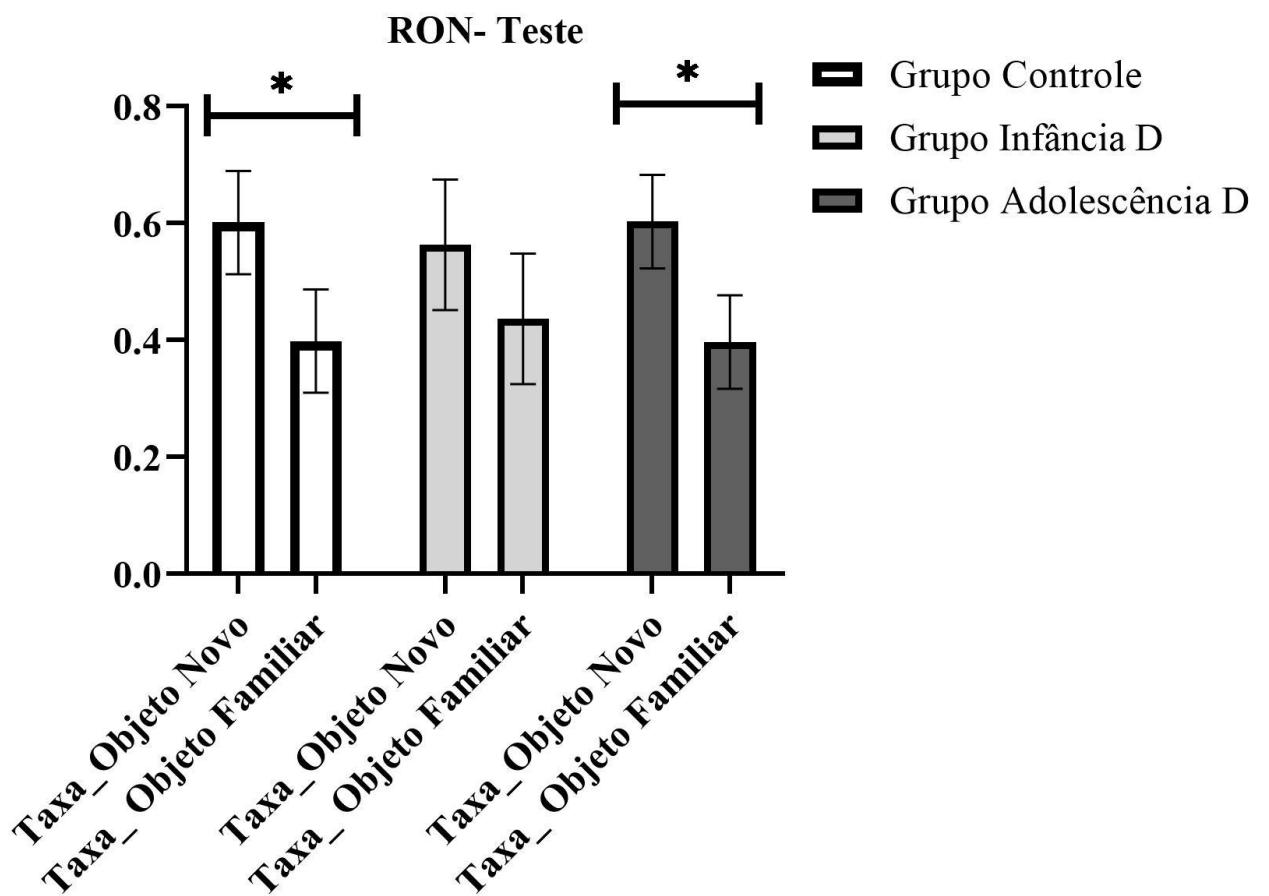


Figura 3.17. Taxa de exploração dos objetos novos e familiar para os grupos: Controle, Infância D e Adolescência D (respectivamente) na sessão de teste da tarefa de reconhecimento de objetos novos. Barras de erro indicam intervalo de confiança de 95%. Em asterisco estão destacadas as comparações com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

3.3.3 Reconhecimento Espacial Associativo

3.3.3.1 Amostra

O resultado obtido através da ANOVA de uma via para amostras independentes, demonstrou 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 *Latênciac* 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 $H(2)= 1,663$, $p= 0,435$ (Fig 3.18) .

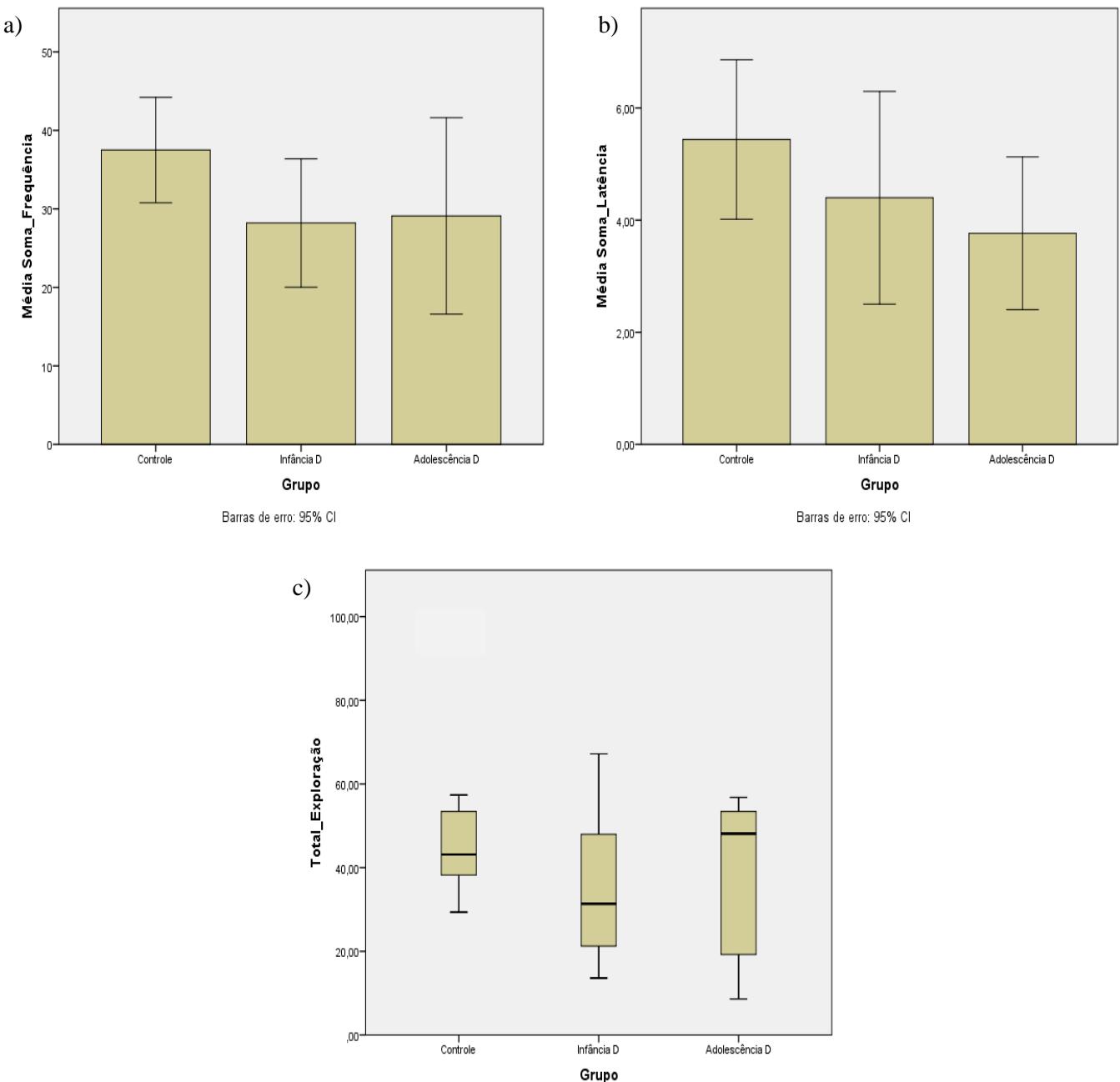


Figura 3.18. Variáveis analisadas na sessão de amostra da tarefa de Reconhecimento espacial associativo: a) Média da soma da frequência de exploração dos objetos b) Latência para a exploração do primeiro objeto em segundos c) Média em segundos do total de exploração dos objetos.

Foi realizado o teste t pareado para cada um dos grupos comparando as variáveis *taxa de exploração* do objeto no local em que esteve o objeto novo/deslocado durante o teste (objeto local deslocado) e no local em que esteve o objeto não deslocado/familiar durante o teste (objeto local não deslocado). Para o **grupo Controle** a taxa de exploração do local em que estava posicionado o objeto deslocado/novo do teste (média= 0,52) relação ao local em que estava posicionado o objeto não deslocado (média= 0,48), não obteve diferença estatisticamente significativa $t(11)= 0,623$ $p= 0,546$, $d= 0,36$, $r= 0,17$. O mesmo ocorreu para o **grupo Infância D**, no qual a diferença entre a taxa de exploração do local em que estava posicionado o objeto

deslocado/novo do teste (média= 0,53) em relação ao local em que estava posicionado o objeto não deslocado (média= 0,46), 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 local em que estava posicionado o objeto deslocado do teste (média= 0,47) e o objeto não deslocado (média= 0,53), também não apresentou diferença estatisticamente significativa $t(9)=- 0,561$ $p=0,588$, $d=-0,35$, $r=-0,17$ (Fig 3.19).

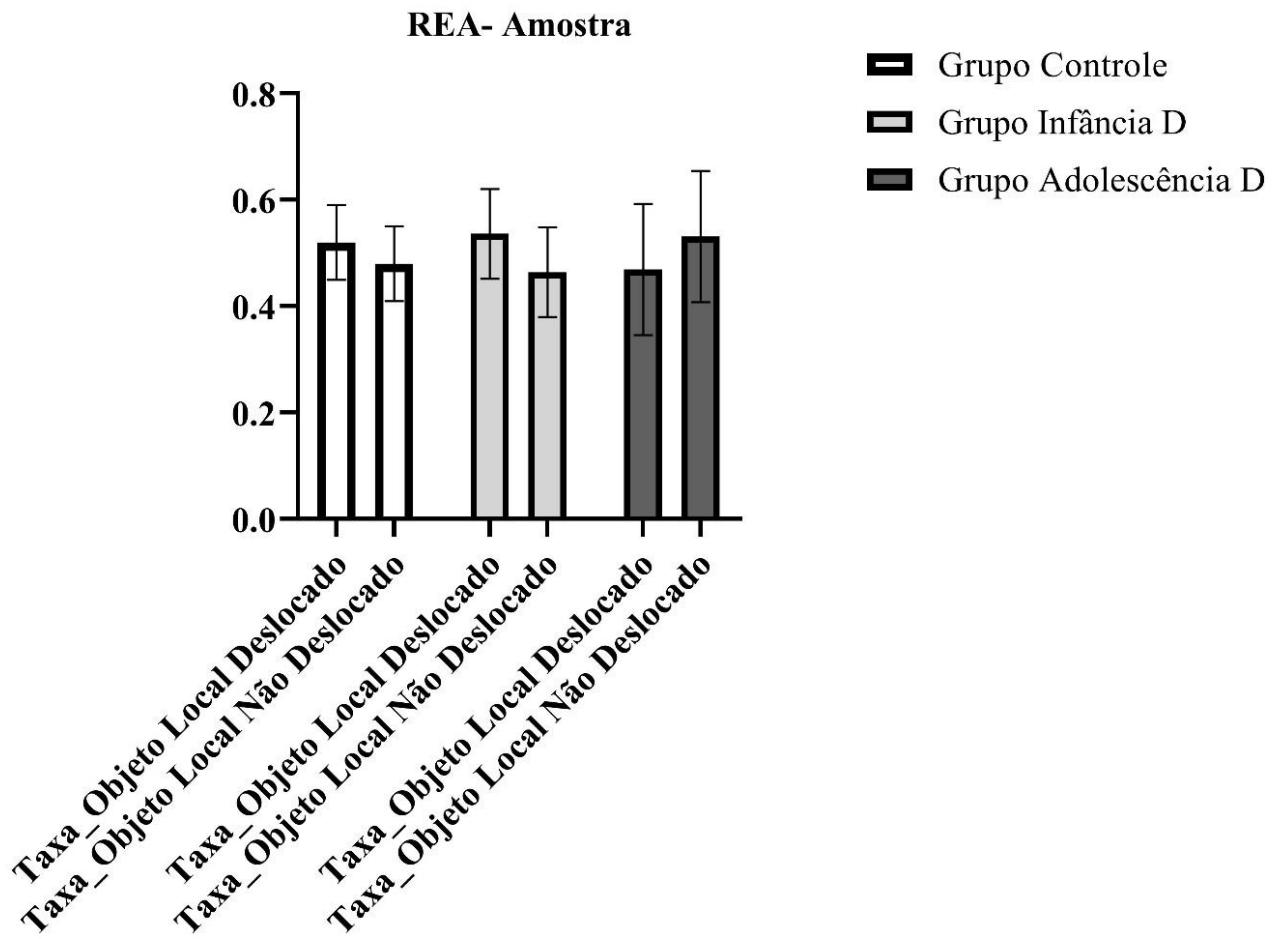


Figura 3.19. Taxa de exploração do objeto no local deslocado e não deslocado para os grupos: Controle, Infância D e Adolescência D (respectivamente) na tarefa de reconhecimento espacial associativo. Barras de erro indicam intervalo de confiança de 95%. **3.3.3.2 Teste**

O Teste de Kruskal Wallis de Amostras Independentes foi utilizado para comparar entre os grupos as variáveis *total de exploração* $H (2)= 1,279$, $p= 0,527$, *frequência de exploração* $H(2)= 2,894$, $p= 0,235$ e *latência de exploração* $H (2)=0,113$, $p=0,945$, no entanto não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas (Fig. 3.20).

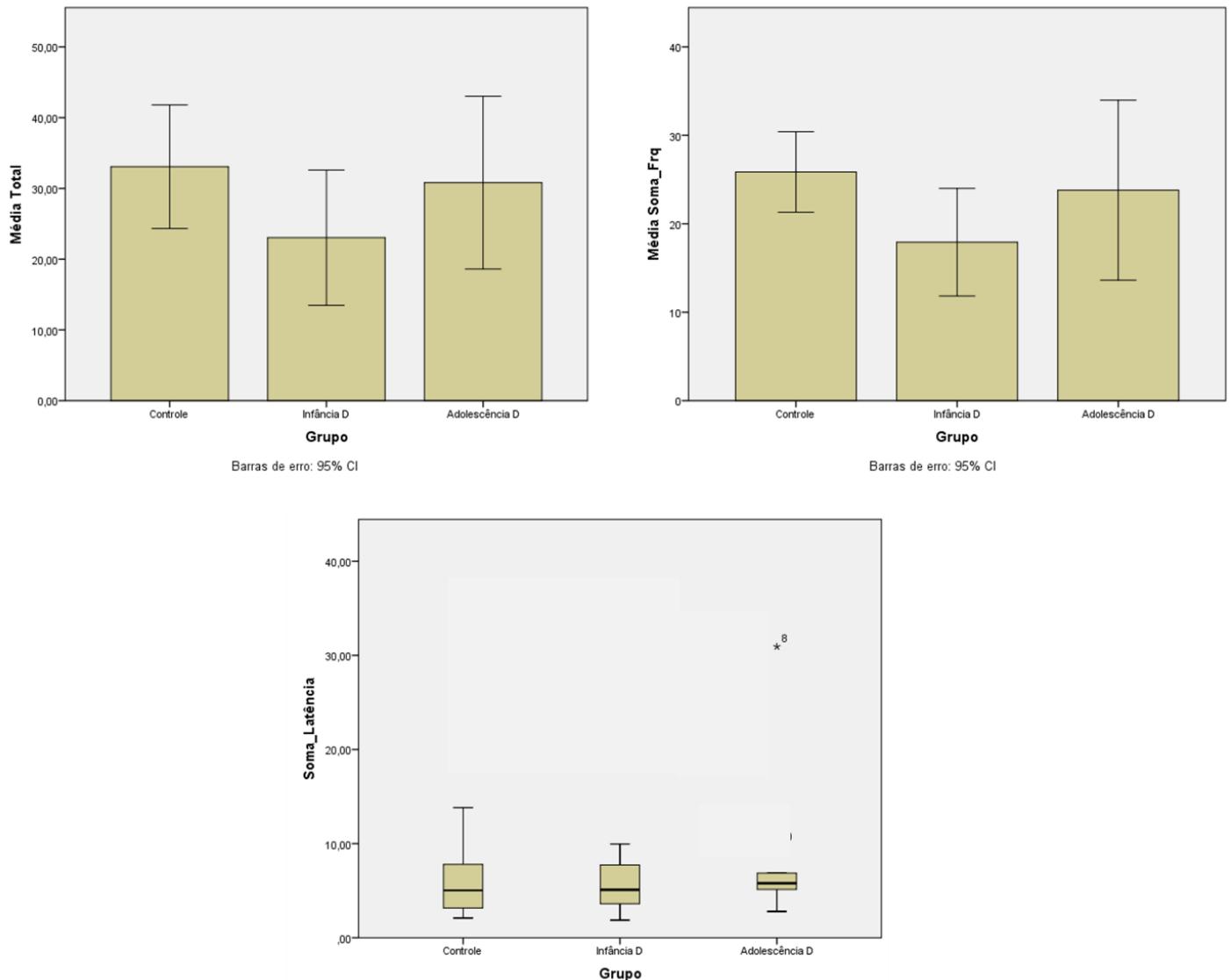


Figura 3.20. Variáveis analisadas na sessão de teste da tarefa de Reconhecimento espacial associativo:
a) Média em segundos do total de exploração dos objetos. b) Média da soma da frequência de exploração
dos objetos c) Latência para a exploração do primeiro objeto em segundos.

O teste t pareado foi realizado para cada um dos grupos com o objetivo de averiguar se existiam diferenças entre as *taxas de exploração* para o objeto deslocado/novo e objeto familiar. O grupo **Controle** apresentou diferença significativa para esta variável $t(11)= 2,738$, $p=0,019$, $d=1,64$, $r=0,63$; tendo o objeto deslocado (média= 0,59) sido mais explorado do que o objeto não deslocado (média= 0,41). Para o grupo **Infância D** a taxa de exploração do objeto deslocado (média= 0,55) e do objeto familiar (média= 0,45), não apresentou diferença estatisticamente significativa $t(9)= 1,417$ $p= 0,190$, $d=0,91$, $r=0,41$. O grupo **Adolescência D** não apresentou diferença significativa para a taxa de exploração $t(9)= 0,675$, $p=0,517$, $d=0,46$, $r=0,22$ entre o objeto deslocado (média= 0,53) e objeto não/deslocado (média= 0,47) (Fig. 3.21).

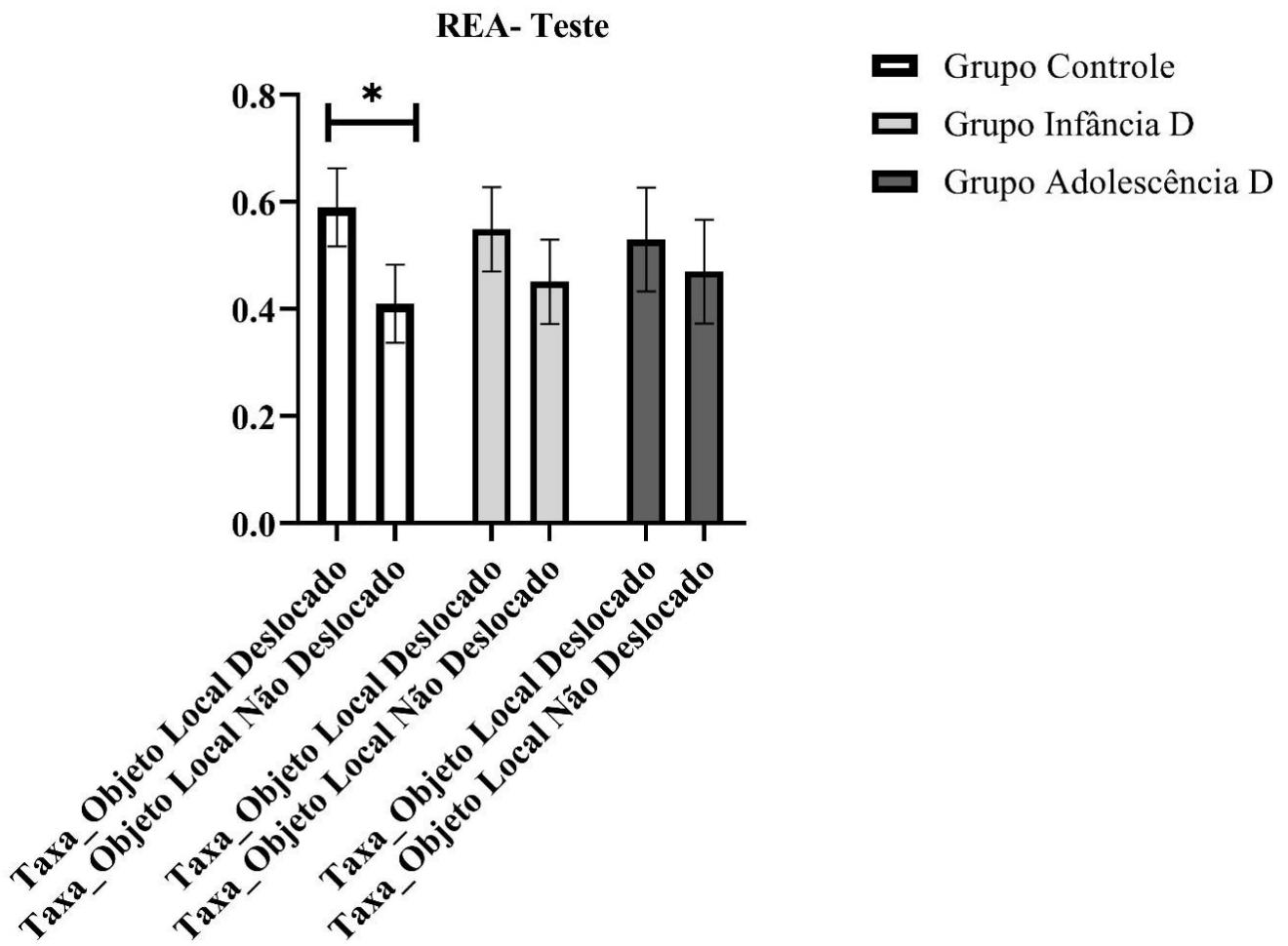


Figura 3.21. Taxa de exploração do objeto não deslocado e deslocado dos grupos: Controle, Infância D e Adolescência D (respectivamente), para a tarefa de reconhecimento espacial associativo. Barras de erro indicam intervalo de confiança de 95%. Em asterisco está destacada a comparação com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

3.3.4 Preferência à sacarose

3.3.4.1 Teste

O teste dos postos sinalizados de Wilcoxon de amostras relacionadas foi utilizado a fim de comparar o *consumo de água e sacarose* em cada um dos grupos. Para o **grupo Controle**, os animais preferiram sacarose ($Mdn= 13,4$) em relação à água ($Mdn= 9,2$) $z= 1,988$ $p=0,047$, $r=0,60$. O grupo **Infância D**, também apresentou um maior consumo de sacarose ($Mdn=18,3$) em detrimento da água ($Mdn=9,9$), $z= 2,934$, $p=0,003$, $r=0,85$. No entanto, para o grupo **Adolescência D**, não houve diferença estatisticamente significativa entre o consumo de sacarose ($Mdn=18,5$) e água ($Mdn=10,2$) $z=-1,785$, $p=0,074$, $r=0,56$ (Fig. 3.22).

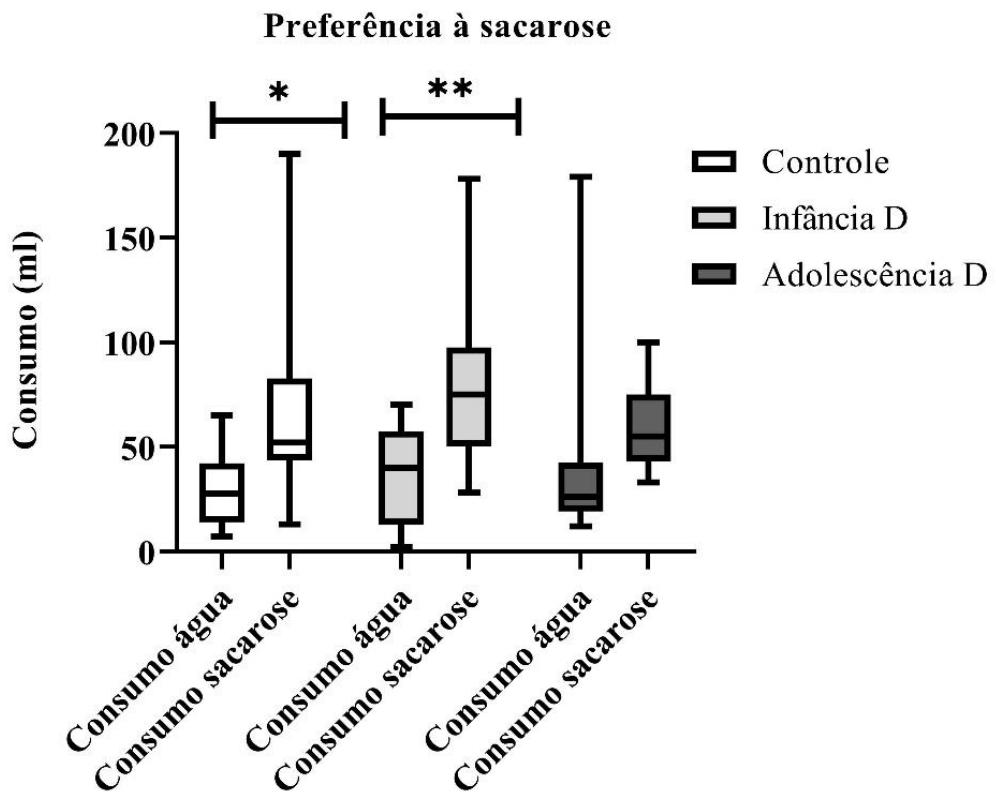


Figura 3.22. Quantidade em mililitros (ml) de água (barra azul) e sacarose (barra verde) consumidas e corrigidas pelo peso do animal em gramas (g) pelos ratos do grupo Controle, Infância D e Adolescência D. Em asterisco estão destacadas as comparações com diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

3.3.5 Esquiva Passiva

3.3.5.1 Latênciа Para Descer

Foi realizado o teste Kruskal-Wallis de Amostras Independentes para comparar a variável *latênciа para descer* entre os grupos. Os resultados encontrados demonstraram não haver diferenças estatisticamente significativas para a variável no curto prazo $H(2)= 2,080$, $p=0,354$ e no longo prazo $H(2)= 3,022$, $p=0,221$ (Fig. 3.23).

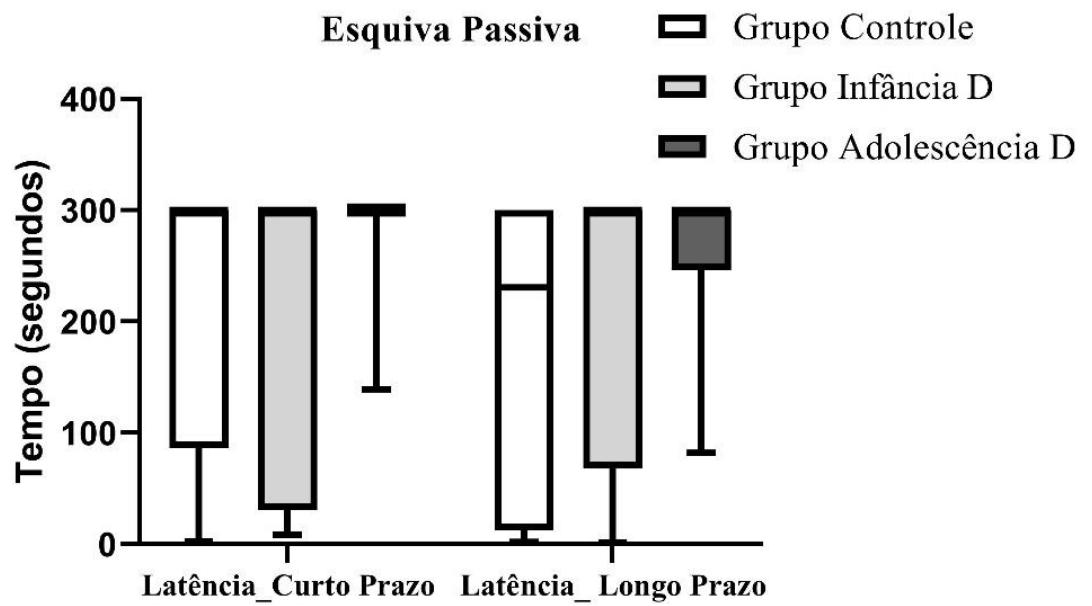


Figura 3.23. Tempo em segundos da latência para descer na plataforma nos testes de curto e de longo prazo para os grupos Controle, Infância D e Adolescência D.

4. DISCUSSÃO

Estudos realizados com humanos e modelos animais demonstram a influência da dessincronização circadiana em variáveis fisiológicas como metabolismo (Plano et al. 2017), memória (Krishnan & Lyons, 2015) e transtornos de humor (Vadnie & McClung, 2017). Os efeitos da dessincronização circadiana possuem variações conforme a fase ontogenética em que ocorre a ruptura circadiana e podem causar danos permanentes à saúde dos indivíduos (Logan & McClung, 2019). Dessa forma, em nosso trabalho tivemos como objetivo avaliar se a dessincronização circadiana durante períodos críticos da maturação orgânica (infância e adolescência) promove prejuízos persistentes em parâmetros comportamentais associados ao metabolismo, memória e transtornos de humor em ratos *Wistar* adultos.

A dessincronização forçada foi promovida no presente estudo por meio da alteração do ciclo CE para 11 horas de claro e 11 horas de escuro (T22), descrito na literatura como capaz de promover o desacoplamento funcional entre os núcleos supraquiasmáticos ventrolateral e dorsomedial (Campuzano et al., 1997; Anglès-Pujolràs et al., 2007; de la Iglesia et al., 2008). A tabela abaixo apresenta os principais resultados comportamentais encontrados para as tarefas, que são discutidas nesta sessão (Tabela 3.5).

Grupo	Ritmidad e Vida Adulta	Peso, ração e água	Campo Aberto			RON	REA	PS	EP
			Padrão de ativida de	Grooming	Rearing				
Controle	#	#	#	#	#	#	#	#	#
Infância D	Menor % V	Maior peso comparado ao AD	#	Menor freq. GI comparado a AD	#	Prejuízo	Prejuízo	#	#
Adolescênc ia D	#	Menor peso comparado ao ID	#	Maior freq. De GI comparado a ID	#	#	Prejuízo	Prejuízo	#

Tabela 3.5: Síntese dos resultados comportamentais para os três grupos Controle, Infância D e Adolescência D, foram considerados apenas os resultados $p < 0,05$ # representa que o animal não apresentou déficits para o desempenho da tarefa.

O perfil da ritmicidade circadiana da atividade locomotora foi a variável rítmica utilizada tanto para extrair informações acerca do funcionamento do sistema de temporização circadiana, quanto para aferir se os animais submetidos ao protocolo de dessincronização forçada apresentaram o padrão de dissociação encontrado em estudos anteriores (de la Iglesia et al., 2008). Para isso, foi feita a inspeção visual dos actogramas e avaliados os parâmetros: período (T) e percentual de variância explicada pelo ritmo (% V). Como o trabalho compreende duas etapas, executadas nos anos de 2018 e 2019, as análises de ritmicidade levaram em consideração a série temporal completa e o recorte temporal dos dados padronizados entre os animais. Devido ao foco na ontogênese, as análises foram divididas em três fases: Infância (vida intrauterina ao desmame), Adolescência (desmame ao dia 63 pós nascimento, aproximadamente) e Vida Adulta. Na fase adulta, na qual todos os ratos já estavam em T24, só foi utilizada a série temporal padronizada para as análises dos parâmetros rítmicos, sendo acrescentados os parâmetros mesor, acrofase e amplitude do ritmo.

A fase da infância foi subdividida em pareamento e lactação, sendo analisados os dados da ritmicidade circadiana da atividade locomotora do grupo (pareamento: progenitores (casal) e lactação: progenitora e ninhada) e não dos animais individualmente, visto que possuímos um sensor por gaiola. Os animais pertencentes ao Grupo Controle e Grupo Adolescência D foram provenientes dos casais mantidos em T24, para estes casais o ritmo circadiano da atividade locomotora permaneceu sincronizado ao ciclo CE 24 horas durante o pareamento e a lactação. Porém, na fase da lactação houve uma diminuição da média do % V para a fêmea e sua ninhada, quando comparado com a % V do pareamento. No pareamento, os três casais submetidos ao protocolo T22 apresentaram dissociação da ritmicidade circadiana da atividade locomotora, no qual o componente sincronizado exibiu uma maior média de % V em relação ao componente em livre-curso, tanto na análise completa quanto na análise com os dias padronizados. No entanto, este padrão dissociativo não persistiu durante a fase da lactação, momento no qual o conjunto da atividade das fêmeas e seus filhotes apresentou um componente sincronizado ao 1440, além do componente sincronizado ao 1320 e o componente em livre-curso, enquanto as outras duas gaiolas apresentaram padrão de atividade locomotora sem ritmo definido.

A diferença entre os dados de robustez do ritmo, representado pela variável % V, entre o pareamento e a lactação para o grupo exposto ao ciclo CE T24, bem como a perda do padrão clássico de dissociação para o grupo sob o protocolo T22, pode ser explicado pela presença dos filhotes na gaiola. Nesse sentido, quando alocadas em ciclo CE 24 horas em biotérios, as ratas progenitoras amamentam os filhotes por cerca de 18 horas por dia nos primeiros dias pós-nascimento e os animais precisam permanecer juntos para a regulação térmica, visto que a pelagem só começa a aparecer após a primeira semana de vida do filhote. Além disso, ainda na

segunda semana pós nascimento, entre os dias 12 e 14, ocorre a abertura dos olhos e os filhotes começam a consumir alimentos sólidos, apesar do leite ser a principal fonte de alimentação (Neves et al., 2013). É provável que estes eventos ocasionem uma movimentação dos filhotes que é captada pelos sensores de atividade, trazendo ruídos ao registro desta fase. No que se refere aos humanos, a ritmicidade das mães também sofre alterações nas primeiras semanas de nascimentos dos bebês, conforme demonstra o estudo longitudinal que realizou a análise de dados de actigrafia em 43 mães e bebês com idades pós-natal de 4, 8 e 12 semanas. Foi demonstrado que, após o nascimento do bebê, a média e o momento do pico de atividade da mãe permanecem consistentes, no entanto o sono da mãe torna-se fragmentado e a robustez do ritmo reduzida. Ao longo do tempo, o bebê começa a apresentar avanço de fase em relação à mãe até ocorrer um aumento na correlação entre a acrofase materna e infantil, culminando em ritmos mais robustos e sincronizados apartir da 12^a semana (Thomas, et.al., 2015).

No caso de ratas alocadas em ambientes de luminosidade atípico, experimento realizado com fêmeas progenitoras da linhagem *Wistar* demonstrou que a quantidade de cuidado materno não varia entre este grupo e o grupo de ratas alocadas em ciclo CE 24, a diferença encontrada foi a de alocação temporal dos comportamentos. Neste experimento a luminosidade atípica era conferida por ciclos de luz 12:12 revertidos em 180 graus a cada três dias (oposição de fase), e os comportamentos registrados foram de duas naturezas: orientados para o filhote (cuidado com o filhote, lamber e farejar o filhote, construir o ninho) e comportamento auto-orientado ou orientado para o ambiente (escavar, fazer *grooming*, caminhar, comer e beber, ficar deitada longe da prole e farejar), a única diferença de quantidade foi encontrada no comportamento de lamber o filhote, realizado em maior proporção pelo grupo experimental (Schelstraete et al., 1992). Sendo assim, sugerimos que as alterações provocadas pelas demandas dos filhotes recém-nascidos podem alterar a movimentação captada pelos sensores na gaiola, justificando assim as diferenças na ritmicidade circadiana da atividade locomotora encontradas durante o pareamento e a lactação para os grupos estudados.

Como os registros foram feitos para o grupo e pela falta de análise de outras variáveis rítmicas, como por exemplo temperatura corporal central ou ritmicidade circadiana da expressão de melatonina, não temos como afirmar que os animais alocados em T22 estavam dissociados individualmente durante o pareamento e a lactação. Apesar de não haver uma definição conclusiva sobre a dissociação, os dados coletados para o grupo Infância D serão interpretados a respeito dos efeitos da ruptura circadiana ocasionada nesses filhotes. Experimento realizado por Canal-Corretger e colaboradores (2000) demonstrou que a quantidade de dias durante a lactação em que ratos *Wistar* foram submetidos ao protocolo de claro constante afetou de maneira diferencial a ritmicidade circadiana da atividade locomotora

desses animais durante a vida adulta. Foi encontrado que ratos submetidos a menos de 12 dias de claro constante tinham maior probabilidade de se tornarem arrítmicos, sugerindo que existe uma fase crítica durante a lactação em que a luz afeta o sistema circadiano (Canal-Corretger et al., 2000).

Estudos sugerem que o ritmo da mãe é o principal arrastador do ritmo dos filhotes na fase pós-natal, até que a luz exerce esse papel ao longo do desenvolvimento do sistema de temporização circadiano (Schelstraete et al., 1992; Brooks & Canal, 2013). Como os animais do presente estudo estiveram sob influência do protocolo durante toda a vida intrauterina e lactação, podemos concluir que estes filhotes foram expostos aos efeitos não fóticos e fóticos do protocolo. Esta é uma característica de novidade em nosso trabalho, visto que até o momento o efeito do protocolo T22 sobre a ritmicidade circadiana da atividade locomotora só havia sido testado durante a fase de lactação (Anglès-Pujolràs et al., 2007). Considerando que o desenvolvimento de componentes do sistema de temporização circadiano tem início ainda na gestação, nosso protocolo tem como vantagem avaliar o impacto- à longo prazo- da dessincronização forçada pelo modelo T22 promovida durante toda a fase inicial da maturação morfológica e funcional deste sistema (Brooks & Canal, 2013).

A fase da lactação durou entre 22 e 23 dias, momento este em que foi realizado o desmame dos animais, a seleção dos filhotes machos e a alocação individual destes animais em seus respectivos grupos experimentais. No desmame, conduzido por volta do 22º dia pós nascimento, os animais do grupo controle permaneceram no protocolo T24, os do grupo Infância D migraram de T22 para o T24 e o grupo Adolescência D iniciou o processo de dessincronização forçada (T24 para T22, retornando para T24 por volta do 63º dia de vida). Conforme observado nos actogramas (disponibilizados nos anexos), logo no início da fase da adolescência os animais do grupo Infância D apresentaram a ritmicidade circadiana da atividade locomotora sincronizada ao ciclo T24. Segundo Canal-Corretger et al. (2000), a rapidez dessa sincronização pode ocorrer devido à flexibilidade do sistema circadiano durante a fase da lactação, tornando o organismo mais adaptável, ou seja, que pode se adequar às pistas oferecidas pelo ambiente externo com maior facilidade. Entretanto, quando comparado ao grupo Controle, o grupo Infância D possui tendência de menor %V tanto para a análise completa, quanto para os dias padronizados (13 dias), indicando a influência dessa condição luminosa prévia sobre os mecanismos envolvidos no arrastamento do sistema de temporização circadiana às pistas fóticas.

Os animais do grupo Adolescência D demonstraram o mesmo resultado apresentado na literatura quando submetidos ao ciclo T22 (Anglès-Pujolràs et al., 2007; Araújo, 2017; Pereira, 2017), possuindo um ritmo de atividade locomotora com dois picos bem definidos: um

sincronizado à pista luminosa externa (T22) e outro que reflete a ritmicidade endógena (aproximadamente 24 horas). Para a análise realizada com a série temporal completa, o ritmo sincronizado possuiu diferença em comparação com o ritmo em livre-curso no parâmetro %V. Essa diferença não foi significativa para a avaliação de 14 dias (série temporal padronizada), tal resultado corroborou o achado de Campuzano e colaboradores (1997), que demonstrou não haver diferenças estatisticamente significativas entre o percentual de variância arrastado pelo ciclo CE e em livre-curso. Em relação à análise do componente endógeno do grupo Adolescência D a média do período encontrado em nosso estudo foi de 24,77 para o resultado com os dias padronizados e 24,74 para a análise da série temporal completa., enquanto no trabalho de Campuzano e colaboradores (1997) essa média foi acima de 25 horas No que se refere à comparação com os dados encontrados no nosso trabalho, o estudo de Campuzano e colaboradores (1997) conta com a análise da ritmicidade circadiana da atividade locomotora de animais jovens e adultos, fêmeas e machos, visto que não foram encontradas diferenças no período em livre-curso dependentes da idade e sexo. Ou seja, os dados de todos os animais foram agrupados para formar a média do período, o que nos impossibilita de realizar uma comparação direta com os animais do grupo Adolescência D do presente estudo. Outro ponto a ser acrescentado é que os ratos do estudo de Campuzano (1997) foram submetidos ao protocolo por mais tempo (60 dias) em comparação com os que fizeram parte do nosso estudo (42 dias), sob uma luminosidade mais forte (300 lux), o que pode ter colaborado para uma discrepância entre os resultados encontrados para o período endógeno.

Na fase adulta, todos os ratos (Controle, ID e AD) estavam ressincronizados ao T24, sendo selecionada para análise a série temporal entre os dias 82 e 104 pós natal, de maneira a excluir todas as falhas de registro ocorridas entre as etapas e o pós efeito proveniente da realocação luminosa do grupo Adolescência D. Foram comparados os parâmetros rítmicos: período, amplitude, mesor e acrofase, que não diferiram entre os ratos. Contudo, o %V foi menor no grupo Infância D em comparação com os grupos Controle e Adolescência D. Estudo realizado por Anglès-Pujolràs e colaboradores (2007), transferiu animais nascidos em T24 para T22 após o desmame (T24-T22L) e comparou com animais nascidos em T22 e que permaneceram no protocolo (T22L-T22). De acordo com os autores, os animais T22L-T22 apresentaram valores mais curtos de período do componente endógeno com menor %V e tiveram a ritmicidade circadiana da atividade locomotora sincronizada à temperatura. Estes dados reforçaram a hipótese dos autores de que nesta fase a plasticidade do sistema de temporização poderia atuar de maneira a evitar (proteger o indivíduo) os prejuízos da dessincronização, fortalecendo o acoplamento entre as estruturas dos NSQs e promovendo a adaptação ao claro-escuro do ambiente (Anglès-Pujolràs *et. al.*, 2007). Embora não possamos

realizar comparações diretas entre os protocolos, visto que fizemos o inverso dos autores para o grupo em T22 na lactação (que foram transferidos para T24 pós-desmame) e os filhotes foram provenientes de mães expostas ao protocolo desde o pareamento, podemos levantar algumas hipóteses de explicação para os nossos resultados e mapear algumas lacunas que podem ser exploradas.

Em nossos resultados, os animais Infância D demonstraram tanto prejuízos em relação aos parâmetros comportamentais associados à memória e metabolismo, além de terem apresentado menor robustez do ritmo de atividade locomotora ao longo do experimento, o que pode nos remeter à hipótese de que a dissociação ainda na fase intrauterina e reforçada na lactação pode ocasionar prejuízos persistentes no sistema de temporização circadiana, em especial por serem fases em que o circuito está amadurecendo, incluindo os mecanismos de acoplamento entre as duas porções dos NSQs. O sistema de temporização circadiano começa a se formar na fase embrionária, no dia P10 pós-natal as conexões entre o RHT e os NSQs amadurecem, culminando em um sistema circadiano capaz de atuar de maneira independente da mãe a partir de P20-28, o que torna as três primeiras semanas críticas para o desenvolvimento do sistema circadiano e sua sincronização ao ciclo claro/escuro ambiental (Porcu et.al., 2018). Dessa forma, hipotetizamos que esse acoplamento pode ser mais fraco nestes animais (Infância D) em comparação com os animais da Adolescência D, que apesar de terem demorado mais dias para ressincronizar ao T24 (pós-efeito) do que o grupo Infância D nos pós-desmame, apresentaram uma ressincronização na vida adulta com %V do componente sincronizado que não diferiu dos animais do grupo Controle. O grupo Adolescência D foi dessincronizado quando componentes importantes do sistema de temporização já estavam amadurecidos, como é o caso dos NSQs, e é provável que esta maturação confira certo nível de estabilidade que pode ser averiguado nos actogramas por meio da quantidade de dias que o animal leva para sincronizar ao T22 e o tempo de pós efeito na ressincronização ao T24. Os mecanismos envolvidos podem resultar em medidas protetivas para evitar que as estruturas sejam permanentemente prejudicadas ao atuarem em ciclos fóticos que não estejam dentro dos limites de arrastamento.

Com relação aos dados metabólicos, foi feita a aferição dos parâmetros: peso e consumo de água e ração. A primeira pesagem foi realizada após o desmame, entre o 30º e 33º dia de vida dos animais, para os dados do peso e da água, enquanto para os dados da ração a primeira pesagem ocorreu entre os dias 37 e 40 pós nascimento. Não foi observada diferença ponderal no peso entre os grupos ao longo das seis primeiras semanas de acompanhamento do peso. A partir da sétima semana (por volta do 73º dia de vida pós-natal), período relativo à fase adulta do animal, sendo também o momento em que todos os grupos se encontravam no

protocolo T24, diferenças foram detectadas entre o grupo Infância D e Adolescência D. Para o grupo Infância D a média de peso (308,4g) foi maior em relação ao grupo Adolescência D (275,9g) tendo esta condição persistido até o final do experimento (semana 14, por volta do 122º dia pós nascimento).

A manutenção do peso corporal depende do equilíbrio homeostático entre a ingestão de nutrientes, processamento e gasto de energia. A coerência de fase entre os osciladores que participam da homeostase energética é obtida através do arrastamento dos NSQs, resultando no tempo adequado para a assimilação, mobilização e distribuição de nutrientes e remoção de resíduos metabólicos. A ruptura circadiana em algum dos níveis desse complexo sistema pode levar a alterações metabólicas e da homeostase do peso. A regulação do peso corporal envolve a interação entre áreas como NSQs, núcleo arqueado (AN), o núcleo hipotalâmico ventromedial (VMH) e o PVN que regulam fatores que fundamentam o balanço energético como: apetite e ingestão de alimentos, deposição de gordura e gasto de energia (Plano et al., 2017). Sendo assim, temos o arrastamento fótico como um fator de influência para o metabolismo energético.

Experimento realizado com ratos *Wistar* jovens, alocados em diferentes ciclos T após o desmame, demonstrou que os animais com menor peso foram aqueles mantidos em ciclos com duração de período semelhante ao período endógeno desses animais (T25 e T26), enquanto as maiores médias de peso foram encontradas em animais mantidos em ciclos curtos (grupos: T22, T23 e T24), no entanto os valores de peso e ingestão alimentar dos animais sob T24 ainda foram maiores do que os dos grupos extremos (T22 e T28). Essas diferenças foram apresentadas de forma progressiva ao longo do tempo, a partir do dia 20 depois do desmame (dia 45 pós natal), neste estudo o aumento do peso foi acompanhado por uma diminuição da eficiência alimentar (relação entre aumento de peso e ingestão de alimento) (Vilaplana et al., 1995). Assim sendo, os autores trouxeram a hipótese de que o aumento do peso corporal depende da correspondência entre o período endógeno do rato e o ciclo externo que pode promover uma ressonância metabólica circadiana, que associa o acoplamento do sistema de temporização circadiano à eficiência na ingestão / distribuição de nutrientes e produção de energia (Vilaplana et al., 1995). Experimentos realizados em ratos *Wistar* adultos demonstraram que o protocolo T22 não promoveu alteração do peso dos animais dessincronizados quando comparados ao grupo controle (Ben-Hamo et al., 2016; de Oliveira et al., 2019). O fato de os grupos experimentais terem diferido entre si em nosso estudo parece reforçar o achado de que a influência da dessincronização forçada promovida pelo protocolo T22 na variável peso depende da janela ontogenética de exposição do sujeito ao protocolo.

Os períodos críticos do desenvolvimento são demarcados pela plasticidade ontogenética, na qual as alterações no padrão nutricional, hormonal e ambiental podem resultar

em alterações estruturais e funcionais que tendem a persistir a longo prazo, ainda que as condições do meio sejam restauradas aos padrões normais (Moura & Oliveira, 2018). Como os animais no grupo Infância D foram expostos a fotoperíodos mais curtos, esta condição pode ter influenciado diretamente no tempo de disposição dos alimentos para o rato na fase fetal e posteriormente na fase pós-natal, visto que os ritmos metabólicos são sincronizados com o ciclo atividade/reposo, o que torna a aquisição de energia por meio da alimentação restrita à fase de atividade, enquanto a queima de energia armazenada está associada ao repouso (Amaral et al., 2014). Neste contexto, para garantir as condições necessárias para o desenvolvimento, os ratos em T22 na vida intra-uterina e lactação podem ter desenvolvido uma maior eficiência de alimentação, ou seja: um maior aumento da massa corporal por grama de ingestão de alimentos.

Outra hipótese está relacionada à exposição do grupo Adolescência D ao fotoperíodo mais curto. A fase de Adolescência ocasiona um aumento da demanda energética oriundo dos processos envolvidos com a maturação do organismo e a duração do dia influencia a taxa de crescimento de ratos jovens (Vilaplana et. al., 1995). Ratos submetidos a uma fotofase longa (ciclo CE: 18:6) após o desmame, durante 190 dias, tiveram uma maior eficiência de crescimento e taxa de ganho de peso em relação aos ratos submetidos a uma fotofase curta (ciclo CE: 6:18), ainda que na ausência de diferenças na ingestão alimentar (Boon, Visser, & Daan, 1997). Portanto, quando a fase de atividade foi reajustada para o ciclo CE 24 horas em nosso experimento, a mudança no metabolismo energético pode ter persistido, ocasionando diferenças na média de peso entre os ratos Infância D e Adolescência D na fase adulta.

Os testes comportamentais foram realizados na fase adulta dos animais, quando todos os grupos já tinham ressincronizado ao ciclo CE simétrico de 24 horas. Foram utilizadas três tarefas de memória para avaliar: memória de reconhecimento de objetos (itens) (RON), memória espacial associativa (REA) e memória aversiva (EP), além de dois testes de avaliação do humor: um para comportamento do tipo ansioso (CA) e outro para avaliar anhedonia (PS), sendo este último pertencente à sintomatologia do comportamento tipo depressivo.

Para a tarefa de campo aberto, os animais avaliados neste estudo não apresentaram diferenças significativas para os parâmetros: atividade locomotora (velocidade média e distância total percorrida), tempo de permanência dos animais no centro e na periferia do campo e quantidade de fezes. No entanto, foram encontradas diferenças nos parâmetros comportamentais rearing e grooming, que são comportamentos utilizados com o objetivo de avaliar estereotipias comumente relacionadas à ansiedade. O comportamento de rearing sem apoio obteve tendência de diferença entre grupos, com o grupo Infância D apresentando a menor média, enquanto o grupo Adolescência D apresentou uma maior frequência de grooming incompleto em relação ao Infância D, com diferenças estatisticamente significativas.

A atividade do rearing é relacionada à exploração vertical, visto que, ao elevar-se sob os membros posteriores, o animal aumenta a área de visualização do ambiente (Lever, Burton & O’Keeffe, 2006). Este comportamento também está relacionado ao funcionamento do hipocampo, proporcionando o aumento na potência do teta de alta frequência em várias sub-regiões dessa estrutura, além de aumentar o acoplamento da amplitude de teta e gama na camada molecular média do giro denteadoo, estrutura importante na separação de padrões e é consistente com um fluxo aumentado de informações do córtex entorrinal (Barth et al., 2018). Sub dividimos o rearing em apoiado (patas dianteiras nas paredes), e sem apoio, que implicaria na condição em que o animal estaria mais exposto. A frequência e duração do rearing sem apoio apresentou tendência para diferenças entre grupos, tendo o grupo controle maior média para as duas variáveis, seguido do grupo Adolescência D e por último o Infância D. Este resultado apresenta-se em consonância com os demais achados do nosso trabalho, visto que o grupo Infância D apresentou o pior desempenho na realização das tarefas de memória. Apesar de não ter havido diferenças entre as médias totais na frequência de rearing e rearing apoiado, o fato de animal ter se afastado menos das paredes pode ter proporcionado prejuízos à exploração do ambiente e formação do mapa cognitivo. Esta hipótese pode ser confirmada com a análise desses comportamentos nas tarefas de memória, proposta que pretendemos atender em estudos futuros.

O grooming, por sua vez, é comumente utilizado em pesquisas para avaliar o comportamento tipo ansioso, sendo este eliciado em condições estressoras ou de novidade. O grooming segue uma organização padronizada de sentido céfalo-caudal e um indicativo adicional de estresse é a desordem nessa organização, caracterizada por transições incompletas ou interrompidas da microestrutura do padrão (Kalueff et al., 2007). Em nosso estudo, apesar de não ter havido diferenças entre o grooming total e a subdivisão grooming completo (padrão céfalo-caudal seguido sem interrupções), foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre o grupo Infância D e Adolescência D, tendo o grupo dessincronizado na adolescência apresentando uma maior média de grooming incompleto, o que pode ser um indicativo de ansiedade para estes animais. Por não ter havido diferenças em outros parâmetros da tarefa de campo aberto, uma sugestão é incluir mais tarefas que avaliam o comportamento tipo ansioso, como por exemplo, o labirinto em cruz elevado.

Ao compararmos os nossos resultados com estudos anteriores, no trabalho de Pereira (2017), realizado em nosso laboratório, ratos adolescentes dessincronizados e testados nas fases de noite de coincidência (T22C) e não coincidência (T22NC), não apresentaram diferenças para as medidas de atividade locomotora e tempo de permanência entre a periferia e o centro do campo, resultado semelhante aos animais do presente trabalho. Os dados obtidos no trabalho

de Ben-Hamo e colaboradores (2016) com ratos adultos dessincronizados por T22 e testados na fase de claro e escuro de coincidência e não coincidência, também não apresentaram diferenças para os parâmetros de atividade locomotora e preferência entre centro e periferia. O experimento realizado por Koike (2013), que também testou os animais submetidos ao protocolo T22 na fase adulta, apresentou resultados divergentes dos encontrados na presente pesquisa. Os animais da condição de coincidência e não coincidência quando comparados ao grupo controle apresentaram: menor deslocamento total dentro do campo, menor tempo passado no centro do campo, menor frequência de rearing e maior frequência de grooming, medidas estas características do comportamento tipo ansioso. O grupo de não coincidência também apresentou menor tempo nos braços abertos no teste de labirinto em cruz elevado e tanto os animais coincidência quanto não coincidência apresentaram menor média no comportamento de avaliação de risco (head down) (Koike, 2013). Tais achados nos atentam para a importância de realizar a análise de parâmetros comportamentais no teste de campo aberto, além daqueles relacionados à atividade locomotora, e da necessidade de se realizar tarefas adicionais que avaliem o mesmo construto, a fim de confirmar os resultados encontrados.

Em relação às tarefas de reconhecimento de objetos, em nosso experimento os ratos do grupo Controle, Infância D e Adolescência D não apresentaram diferenças entre grupos para as variáveis: frequência de exploração dos objetos, latência para a exploração do primeiro objeto e total de exploração dos dois objetos nas sessões de amostra e teste para as tarefas RON e REA. Também foi investigada a possibilidade de ter ocorrido preferência de local na sessão de amostra em relação à alocação dos objetos novos (RON) e deslocados (REA) na sessão teste, no entanto nenhum dos grupos apresentou diferenças na exploração entre os objetos durante a amostra. Tais resultados indicam que as diferenças encontradas na exploração dos objetos na sessão de teste não foram provenientes de fatores como falta de motivação para explorar, diferenças na quantidade de exploração, prejuízos sensório-motores ou preferência de local. Neste sentido, na sessão de teste da tarefa RON apenas o grupo Infância D não conseguiu discriminar entre objeto novo e antigo; enquanto na tarefa REA os grupos dessincronizados na fase da infância (Infância D) e adolescência (Adolescência D) não conseguiram discriminar entre objeto deslocado e não deslocado.

Quando comparamos os achados nas tarefas RON e REA deste estudo, com os encontrados em trabalhos anteriores, podemos observar divergências entre os dados dos ratos ressincronizados em relação aos resultados no desempenho de tarefas de memória em ratos testados durante a fase de dessincronização. No estudo de Neto e colaboradores (2008), que dessincronizou e testou ratos *Wistar* na fase adulta, não houve diferenças entre grupos na

discriminação entre objeto antigo e novo (RON) na tarefa realizada em curto (90 min) e longo prazo (24/22 horas). Enquanto no estudo de Araújo (2017) realizado em nosso laboratório, ratos *Wistar* dessincronizados e testados na fase da adolescência apresentaram déficits de desempenho nas tarefas de RON e REA, tanto no teste conduzido na noite de coincidência, quanto de não coincidência. Para os animais do grupo experimental Infância D, não encontramos na literatura, até o momento, estudos que tenham realizado a dessincronização através do protocolo T22 e avaliado os domínios propostos neste trabalho durante esta janela ontogenética.

As tarefas de reconhecimento de objetos utilizadas neste estudo analisam tipos de memórias que recrutam diferentes áreas cerebrais com momentos distintos de maturação (Tan, Wills, & Cacucci, 2017). No que se refere ao RON, que avalia memória para item, estudos envolvendo lesões indicam que partes seletivas da região para-hipocampal, especialmente o córtex perirrinal, assim como suas entradas sensoriais e sua conexão com a área Te estão envolvidas com a realização desta tarefa (Aggleton et al., 2012; Aggleton & Nelson, 2020). Em contrapartida, a tarefa de reconhecimento espacial associativo recruta áreas como córtex perirrinal, córtex entorrinal, hipocampo, córtex retrosplenial, córtex cingulado anterior, núcleo talâmico anterior, corpos mamilares, córtex pré-frontal medial, núcleo talâmico medial dorsal e núcleo reuniens (Aggleton & Nelson, 2020). Neste sentido, apesar de a circuitaria envolvida nos processos de memória e aprendizagem apresentarem seu desenvolvimento em fases iniciais da ontogênese, quanto mais complexo o sistema envolvido, maior será o tempo necessário para que seus componentes estejam plenamente funcionais.

Outro ponto a ser considerado é a fase do desenvolvimento da circuitaria envolvida em atividades importantes para os processos de aquisição, consolidação e evocação da memória, como é o caso do comportamento exploratório. Este comportamento é essencial para a sobrevivência dos filhotes, em especial após o desmame, momento em que os animais se tornam independentes e necessitam explorar o ambiente a fim de buscar recursos que antes eram providos por suas mães, como por exemplo, alimento. Filhotes começam a sair da gaiola para explorar o ambiente a partir do dia 15 pós-natal, aumentando o tempo fora do ninho e iniciando uma exploração significativa no P18. O início da exploração ativa do campo aberto ocorre entre P20 e P21, momento este em que os animais também têm o início da aprendizagem espacial na tarefa do labirinto aquático de Morris, no entanto a maturação do comportamento espacial continua até o segundo mês de vida (Tan et al., 2017).

Experimento que realizou as tarefas de reconhecimento de objetos novos e reconhecimento espacial com ratos *Long Evans* de 17, 21 ou 26 dias pós natal, demonstrou que os animais de todas as idades conseguiam distinguir entre o objeto novo e antigo, no entanto apenas os ratos de 21 e 26 dias mostraram recordar a localização dos objetos, sugerindo que

antes do dia 17 pós natal a memória para item se desenvolve, enquanto a memória associada à localização emerge mais tarde (entre os dias 17 e 21) (Westbrook, Brennan, & Stanton, 2014). Em nosso estudo os animais dessincronizados na infância apresentaram prejuízos na memória para itens (RON) e memória espacial associativa (REA), enquanto o grupo Adolescência D apresentou prejuízos apenas para a tarefa REA. Os processos de aprendizagem e memória que envolvem maior demanda associativa ou maior tempo de retenção possuem maturação tardia da circuitaria envolvida (Dumas, 2005) o que poderia explicar o fato de termos encontrado uma memória para item intacta no grupo Adolescência D e em déficit no grupo Infância D, enquanto a memória espacial associativa fora prejudicada em ambos os grupos.

O sistema de temporização circadiano possui ampla influência na modulação da cognição, incluindo os diferentes tipos de memória. Tais influências podem ser ocasionadas, entre outras vias, por fatores hormonais e na modulação de processos rítmicos como mudanças nas conexões sinápticas, números de sinapses ou mudanças nas estruturas (Krishnan & Lyons, 2015). Os NSQs possuem comunicações multineuronais de maneira direta e indireta com diversas áreas, incluindo as relacionadas à memória e regulação do humor como: núcleos amigdaloides basolateral e basomedial, hipocampo ventral, área amigdalopiriforme, bem como córtice entorrinal lateral, perirrinal e ectorrinal, conforme experimento que utilizou vírus de rastreamento transneuronal (Kealy & Commins, 2011; Krout, Kawano, Mettenleiter, & Loewy, 2002). Apesar das múltiplas vias envolvidas na memória de reconhecimento, uma parte do circuito que é bastante estudada trata-se da conexão anatômica e funcional entre os córtices perirrinal, pré-frontal e hipocampo (Barker & Warburton, 2011; Barbosa et al., 2013; Reincke & Hanganu-Opatz, 2017; Chao, Souza-Silva, Yang, & Huston, 2020). Ratos com lesões citotóxicas bilaterais no hipocampo ou córtex perirrinal ou pré-frontal testados em tarefas de reconhecimento de objetos envolvendo a memória para item, a memória de associação entre item e local e a memória de ordem espacial demonstrou que o hipocampo tem papel crucial nas tarefas de memória espacial e temporal, enquanto o córtex perirrinal apresenta envolvimento na memória de reconhecimento (Barker & Warburton, 2011).

O papel do hipocampo como oscilador periférico tem início na vida fetal, aonde os genes *Bmal* e *Per* já possuem ritmicidade aos 18 dias de gestação (Vilches et. al, 2014). Ratos adultos gestados sob luz constante apresentaram déficit na memória espacial avaliada através do labirinto aquático de Morris, baixos níveis de corticosterona plasmática noturna, ausência de diferenças dia / noite na melatonina plasmática e expressão gênica controlada pelos osciladores e acompanhada por uma diminuição geral na expressão das subunidades do receptor NMDA no hipocampo. Porém, filhotes gerados por ratas grávidas que estavam submetidas ao cloro constante e que fizeram o tratamento com melatonina, demonstraram melhoria de desempenho

na tarefa de memória espacial e diferenças dia / noite no mecanismo de expressão gênica de subunidades do receptor NMDA do hipocampo, embora apresentassem um padrão quase oposto do encontrado no grupo controle. Tal estudo ressalta a importância do papel da melatonina materna na geração dos ritmos no feto em crescimento (Vilches et. al, 2014). Em relação à fase da adolescência, uma possibilidade a ser explorada é a influência da interrupção do sono e ritmos circadianos para a poda sináptica, processos de refinamento e maturação de circuitos neurais em desenvolvimento, incluindo a memória (Logan & McClung, 2019). Além disso, ratos *Wistar* machos adolescentes (28 dias) expostos ao protocolo de avanço de fase semanal (6 horas/semana) durante 4 ou 8 semanas apresentaram diminuição de neurogênese hipocampal no giro denteado, o mesmo não ocorreu com o grupo que foi submetido ao atraso de fase (Kott et al., 2012).

Estudos indicam que a condição luminosa pode afetar o desenvolvimento neuronal (Porcu et al., 2018) e o trabalho realizado em nosso laboratório fornece indicações de que o protocolo T22 de dessincronização forçada promove alteração nas médias das marcações da proteína NeuN (neuronal nuclei), específica para neurônios maduros, para áreas como córtex pré-frontal, hipocampo e núcleos supraquiasmáticos (Parente, 2021). A etapa da imuno-histoquímica foi realizada com os ratos utilizados na etapa 2 do experimento do presente trabalho, contando com 4 animais do grupo controle, 4 animais do grupo Infância D e 3 animais do grupo Adolescência D. Os resultados não apresentaram diferenças significativas devido ao tamanho da amostra, contudo nos fornece indicações que podem ser relacionadas com os achados da etapa comportamental que está sendo apresentado nesta sessão. No trabalho de Parente (2021), para as análises realizadas em regiões do hipocampo, nas áreas CA1, CA2 e CA3, o grupo Infância D apresentou a menor média de marcação para NeuN, indicando maior prejuízo, seguido pelas médias do grupo Adolescência D, tendo o grupo controle apresentado as maiores médias de marcação: CA1 (controle $805,40 \pm 241,90$; AD: $558,60 \pm 269,20$; ID: $340,10 \pm 108,50$) CA2 (Controle: $787,40 \pm 304,10$, AD: $730,00 \pm 221,50$, ID: $259,40 \pm 128,00$) e CA3 (controle: $643,60 \pm 188,30$, AD: $459,90 \pm 220,70$ e ID: $199,30 \pm 69,73$). Enquanto para a área do giro denteado, envolvida na separação de padrões, o grupo controle apresentou maior média de marcação de NeuN ($899,40 \pm 269,10$), enquanto AD ($588,70 \pm 243,40$) e ID ($585,10 \pm 154,10$) tiveram valores semelhantes. Enquanto para os núcleos supraquiasmáticos, os valores das médias para a expressão de NeuN foram maiores para o grupo Adolescência D ($404,60 \pm 91,25$), seguido do grupo controle ($321,00 \pm 27,51$), com a menor contagem apresentada no Grupo Infância D ($179,60 \pm 1,15$) (Parente, 2021). Estes resultados corroboram os achados do presente estudo, visto que os ratos Infância D apresentaram os maiores déficits cognitivos, incluindo

uma menor robustez do ritmo na ressincronização, em comparação com os grupos Adolescência D e Controle.

No que se refere à tarefa de preferência à sacarose, cujo objetivo era avaliar um dos parâmetros do comportamento tipo depressivo: a anedonia, apenas os animais do grupo Adolescência D não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre o consumo de água e sacarose. O grupo Controle e Infância D apresentaram um maior consumo de sacarose em relação à água, resultado esperado para animais que não apresentam anedonia. Quando este mesmo teste foi realizado em ratos *Wistar* adultos dessincronizados e testados sob protocolo T22, na análise intragrupo apenas os animais em não coincidência tiveram tendência para maior consumo de glicose, em contrapartida ao ser realizado o teste de nado forçado nestes animais, outro teste clássico para a avaliação do comportamento tipo depressivo, os ratos dessincronizados em noite de coincidência apresentaram maior latência para o comportamento de imobilidade, oposto ao encontrado em indivíduos depressivos (Koike, 2013). A autora também relatou a presença de um maior número de células marcadas para o receptor serotoninérgico 5HT1A (mediador da neurotransmissão inibitória) na região da amigdala dos ratos dissociados, trazendo a hipótese de que nesses animais houve uma maior ativação dos núcleos dorsais da rafe que se projetam para a amigdala, causando um aumento da liberação de serotonina que o sistema tenta amenizar restaurando a inibição nessa estrutura. Dessa forma, o papel desses receptores seria o de diminuir um potencial efeito ansiogênico promovido pelo rompimento da ritmicidade circadiana devido à exposição ao ciclo CE 11:11. (Koike 2013).

No trabalho de Ben-Hamo et. al. (2016), também realizado com ratos *Wistar* dessincronizados e testados na fase adulta sob o protocolo T22, ratos controle consumiram uma maior quantidade de água com sacarose em relação aos ratos dessincronizados em coincidência, mas não houve diferenças entre estes grupos e o grupo de animais em não coincidência. As divergências encontradas entre os estudos realizados na mesma fase ontogenética podem se dever às mudanças metodológicas no protocolo da tarefa. O protocolo de Ben-Hamo e colaboradores (2016) consistiu em uma menor quantidade de sacarose (0,1%) e uma maior quantidade de dias (8 dias) de teste em relação ao protocolo da Koike (2013), que utilizou a concentração de 0,5% de glicose e um período de teste de 24 horas. Além disso, os animais dessincronizados em coincidência e não coincidência do estudo de Ben-Hamo e colaboradores (2016) apresentaram maior tempo de imobilidade na tarefa de nado forçado na fase de escuro e menor tempo de imobilidade na fase de claro, quando comparados ao grupo controle, sugerindo uma diminuição na amplitude da oscilação diária nesta manifestação comportamental. Os grupos em T22 também demonstraram prejuízos no comportamento sexual em relação ao grupo controle. Neste estudo, os ratos dessincronizados em coincidência apresentaram níveis mais

elevados de Norepinefrina e Dopamina e maior taxa de renovação (*turnover*) de 5-HT (serotonina) no córtex pré-frontal, em comparação ao grupo controle, indicando um desequilíbrio na regulação dos níveis de monoaminas. Em conjunto, estes dados evidenciam a capacidade do protocolo T22 de dessincronização forçada em induzir o fenótipo tipo depressivo em ratos *Wistar* machos adultos (Ben-Hamo et al., 2016).

A influência do sistema de temporização circadiana nos transtornos de humor não está relacionada apenas à fase adulta, estudos indicam que a duração do fotoperíodo em estágios iniciais da vida pode induzir a mudanças duradouras, sendo as primeiras 3 semanas após o nascimento críticas para o desenvolvimento do sistema circadiano e sua sincronização com o fotoperíodo ambiental (Porcu et al., 2018). Distúrbios na ritmicidade ao longo do desenvolvimento podem ocasionar distúrbios monoaminérgicos, amplamente relacionado à etiologia da depressão (Siemann et al., 2020), como também contribuir para a desregulação neuroendócrina dos glicocorticoides, relacionado à depressão e suscetibilidade ao estresse. Condições de fotofáse curta e escotofáse longa (CE 8:16) podem diminuir os níveis de expressão de dopamina e serotonina ao longo do desenvolvimento de camundongos, além de reduzir a utilização de monoamina, conforme observado por meio de concentrações elevadas de metabólitos (5-HIAA e DOPAC). Estas diferenças começaram a se manifestar em P18 e/ou P35, representando a fase da infância e a adolescência em camundongos. Para os animais em fotofáse curta, os níveis de expressão de TH, sendo esta uma enzima fundamental para a síntese de dopamina, foram elevados mais cedo no desenvolvimento (P8), normalizando por volta do P35, fase da adolescência. Tais resultados indicam que a expressão de gene é modulada de maneira diferencial a depender da fase do desenvolvimento e que a investigação do papel do fotoperíodo nos sistemas de dopamina e serotonina durante o curso do desenvolvimento, pode ser importantes para esclarecer os mecanismos subjacentes e os potenciais alvos terapêuticos para transtornos de humor (Siemann et al., 2020).

Em relação à fase da adolescência, ratos machos *Sprague-Dawley* adolescentes mostraram-se mais susceptíveis ao estresse quando mantidos sob fotofáse curta e escotofase longa (ciclo CE 8:16) e submetidos a um protocolo de estresse imprevisível subcrônico. Estes ratos apresentaram diminuição significativa da preferência à sacarose, número de cruzamentos no campo aberto diminuídos e maior tempo de imobilidade no nado forçado. Também foi constatado menor ganho de peso, aumento dos níveis de melatonina e Neuropeptídeo Y (NPY) e corticosterona no plasma, assim como causou uma inversão de fase da melatonina, um atraso de fase de Neuropeptídeo Y e interrompção da ritmicidade diurna de corticosterona (Xu et al., 2016) como estes animais apresentavam-se agrupados nas gaiolas, o isolamento social não foi o responsável pelas alterações encontradas no estudo. Essas anormalidades no plasma CORT,

NPY e melatonina podem fazer com que os adolescentes apresentem maior reatividade e vulnerabilidade ao estresse de forma persistente (Xu et al., 2016).

A respeito dos resultados encontrados na tarefa PS para os ratos do grupo Infância D em nossos estudo=, além de terem apresentado um maior consumo de sacarose em relação à água no teste de PS, o grupo ID também apresentou uma menor quantidade de grooming incompleto em relação ao grupo AD, parâmetros associados ao comportamento tipo depressivo e tipo ansioso respectivamente, que compuseram nossa investigação sobre os trantornos de humor. Entretanto, a falta de diferenças significativas nos demais parâmetros do campo aberto proporcionam ressalvas quanto à afirmação de que os animais dessincronizados na infância apresentam déficits cognitivos, porém com ausência de comportamentos relacionados aos transtorno de humor. Para podermos atestar essa hipótese, outros testes relacionados ao comportamento ansioso e depressivo devem ser realizados para estes animais, a fim de serem obtidos resultados mais conclusivos.

No que se refere ao desempenho na tarefa PS do grupo Adolescência D nosso trabalho corrobora o escopo dos estudos que trazem a adolescência como uma fase de alta susceptibilidade aos transtornos de humor, causando alterações que podem persistir a longo prazo (Porcu et al., 2018). A adolescência é um período de maturação cerebral contínua, particularmente das regiões límbica e cortical, como o hipocampo, córtex pré-frontal e amigdala, que desempenham importante papel na cognição e regulação emocional. Estudos indicam que essa trajetória de maturação pode ser afetada por fatores estressores, contribuindo para a incidência de ansiedade e depressão (Eiland & Romeo, 2013). Além disso, durante essa fase, ocorrem processos como poda sináptica e mielinização no circuito de recompensa frontostriatal (incluindo o estriado ventral e córtex pré-frontal medial), desse modo condições adversas podem afetar o circuito límbico, em especial a disponibilidade de dopamina (Logan, 2019). Dessa forma, de acordo com os nossos dados, os animais do grupo Adolescência D apresentaram comportamento característico da anedonia e também ansiedade, conforme demonstrado pelo menor consumo de sacarose e a maior quantidade de grooming incompleto, o que indica que alteração ocorridas nesta janela ontogenética podem contribuir para o surgimento de transtornos de humor.

Para a tarefa de esquiva passiva, última tarefa em nossa bateria de testes, os ratos não apresentaram diferenças entre grupos na variável latência para descer no teste de esquiva passiva de curto e longo prazo, demonstrando não haver prejuízos na memória aversiva. Este mesmo resultado foi encontrado no estudo de Pereira (2017), realizado com ratos *Wistar* adolescentes machos dessincronizados pelo protocolo T22, com a tarefa realizada em noite de coincidência e não coincidência. Em contrapartida, ratos adultos submetidos ao protocolo T22

tiveram pior desempenho em relação aos controles e ao grupo escuro constante, com diminuição da latência para descer tanto no teste de curto, quanto de longo prazo (Neto, 2008). Apesar de estudos anteriores terem evidenciado que o desempenho no teste de esquiva passiva depende da janela ontogenética na qual o teste é realizado, acreditamos que nossos resultados podem ter sido influenciados por falha metodológica, visto que os animais aparentavam ser muito grandes para o tamanho da plataforma.

Hipotetizamos que o espaço disponível no aparato de EP tornou possível para estes ratos explorarem o ambiente sem a necessidade de descer com as quatro patas na superfície metálica, o que pode ter ocasionado um efeito teto em nossos achados. Sendo essa uma tarefa amigdala-dependente, outra evidência que temos para nossa hipótese é oriunda dos resultados indicados pela análise imuno-histoquímica, realizada com os animais da etapa 2 do presente estudo, que demonstrou que a média de expressão de parvalbumina na região basolateral da amigdala foi menor para o grupo Infância D ($m:39,75\pm9,38$) e Adolescência D ($m:42,17\pm6,01$), em relação aos ratos do Grupo Controle ($m:53,75\pm5,90$), apesar de não terem sido apresentadas diferenças significativas devido ao n amostral (Parente, 2021). Neste caso, serão necessários testes comportamentais adicionais e algo importante que podemos sugerir é aumentar o tamanho da área de exploração do animal, visto que os animais possuem diferenças no peso, o que pode influenciar no tamanho dos indivíduos. O tamanho dos ratos não foi uma característica mensurada em nosso estudo, mas pode ser um parâmetro interessante para avaliações futuras.

Experimentos realizados em ratos *Wistar* adultos submetidos ao protocolo de dessincronização forçada modelo T22 têm atestado a possibilidade da utilização desse protocolo em patologias relacionadas aos transtornos de humor (Neto et al., 2008). A influência do protocolo T22 em componentes emocionais foi reafirmada no trabalho de Koike (2013) que trouxe a proposta de que o modelo de dessincronização forçada pelo protocolo T22 pode ser utilizado para o estudo do transtorno bipolar de ciclagem rápida, sendo a fase de coincidência relacionada à fase de mania deste transtorno e a fase de não coincidência trazendo aspectos do comportamento tipo depressivo. O artigo de Bem-Hamo traz o modelo T22 como uma opção não-farmacológica para o estudo da depressão. Os achados de Araújo (2017) e Pereira (2017) trouxeram o protocolo T22 aplicado sob ratos *Wistar* adolescentes como efetivo para a avaliação de déficits cognitivos relacionados à memória, no entanto sem estarem vinculados aos transtornos de humor, seguindo uma direção diferente do que estava sendo proposto em estudos anteriores. Nossos dados confirmaram que o protocolo T22 pode acarretar prejuízos diferenciais na ritmicidade circadiana, metabolismo, memória e transtornos de humor, que se manifestam com particularidades dependentes da fase ontogenética na qual o protocolo é aplicado.

CONCLUSÃO

Concluímos que a aplicação do protocolo de dessincronização forçada, ciclo claro-escuro simétrico de 22h (T22), em estágios iniciais da ontogênese pode promover prejuízos diferenciais e persistentes em relação aos parâmetros comportamentais relacionados: à ritmicidade, ao metabolismo, à memória e aos transtornos de humor. Sendo assim, Ratos *Wistar* machos dessincronizados na fase intrauterina e lactação (Infância D) apresentaram menor robustez do ritmo quando sincronizados ao T24 na fase adulta, maior média de peso na fase adulta e déficits nas tarefas de memória de reconhecimento de itens e reconhecimento espacial associativo, indicando propensão para prejuízos metabólicos (tendência para ganho de peso), rítmicos e cognitivos. Enquanto os animais dessincronizados na fase da adolescência (pós-desmame) apresentaram menor média de peso na fase adulta, anedonia, maior frequência de episódios de grooming incompleto e déficit na tarefa de reconhecimento espacial associativo, evidenciando vulnerabilidade para prejuízos metabólicos (tendência para perda de peso) transtornos de humor e prejuízos na memória espacial.

Os achados do nosso trabalho reafirmam o potencial do protocolo T22 para a avaliação das consequências da dessincronização circadiana ao longo da ontogênese nos parâmetros relacionados à ritmicidade, metabolismo, memória, cognição e humor. Este protocolo fornece a oportunidade de se investigar a influência de fotoperíodos curtos na maturação das estruturas envolvidas no sistema de temporização circadiana. Além disso, torna possível elucidar o desenvolvimento e o papel diferencial das porções ventrolateral e dorsomedial dos núcleos supraquiasmáticos, visto que este modelo é capaz de induzir o desacoplamento funcional e não farmacológico entre estas duas regiões. O que foi encontrado até agora nos impulsiona a ressaltar a importância de estudos que investiguem o amadurecimento do sistema circadiano e os impactos proporcionados pela dessincronização ao longo da ontogênese.

REFERÊNCIAS

- Aggleton, J. P., Brown, M. W., & Albasser, M. M. (2012). Contrasting brain activity patterns for item recognition memory and associative recognition memory: insights from immediate-early gene functional imaging. *Neuropsychologia*, 50(13), 3141-3155. doi:10.1016/j.neuropsychologia.2012.05.018
- Aggleton, J. P., & Nelson, A. J. (2020). Distributed interactive brain circuits for object-in-place memory: A place for time?. *Brain and Neuroscience Advances*, 4, 2398212820933471. doi:10.1177/2398212820933471
- Albers, H. E., Walton, J. C., Gamble, K. L., McNeill IV, J. K., & Hummer, D. L. (2017). The dynamics of GABA signaling: revelations from the circadian pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 44, 35–82. doi:10.1016/j.yfrne.2016.11.003
- Albert, N., da Silva, C., Díez-Noguera, A., & Cambras, T. (2013). Different adaptation of the motor activity rhythm to chronic phase shifts between adolescent and adult rats. *Behavioural Brain Research*, 252, 347–355. doi:10.1016/j.bbr.2013.06.025
- Amaral, F. G. D., Castrucci, A. M., Cipolla-Neto, J., Poletini, M. O., Mendez, N., Richter, H. G., & Sellix, M. T. (2014). Environmental control of biological rhythms: effects on development, fertility and metabolism. *Journal of Neuroendocrinology*, 26(9), 603–612. doi:10.1111/jne.12144
- Anglès-Pujolràs, M., Díez-Noguera, A., & Cambras, T. (2007). 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(6), 1049–1064. doi:10.1080/07420520701800645
- Araújo, K. K. B. C. (2017). *Memória e ritmicidade circadiana em ratos adolescentes submetidos a um protocolo de dessincronização forçada - modelo T22* (Dissertação de Mestrado, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil). Acessado em: <https://repositorio.ufpb.br/jspui/handle/123456789/12007>
- Arellanes-Licea, E., Caldelas, I., De Ita-Pérez, D., & Díaz-Muñoz, M. (2014). The circadian timing system: a recent addition in the physiological mechanisms underlying pathological and aging processes. *Aging and Disease*, 5(6), 406–418. doi:10.14336/ad.2014.0500406
- Aschoff, J. (1960). Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. In *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* (Vol. 25, pp. 11–28). Cold Spring Harbor Laboratory Press. doi:10.1101/sqb.1960.025.01.004

- Aschoff, J. (1965). Circadian rhythms in man. *Science*, 148(3676), 1427–1432. doi:10.1126/science.148.3676.1427
- Aschoff, J. (1981). Freerunning and entrained circadian rhythms. In J. Aschoff (Ed.), *Biological Rhythms* (pp. 81–93). Springer, Boston, MA. doi:10.1007/978-1-4615-6552-9_6
- Baño-Otalora, B., & Piggins, H. D. (2017). Contributions of the lateral habenula to circadian timekeeping. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 162, 46–54. doi:10.1016/j.pbb.2017.06.007
- Baquedano, E., Garcia-Caceres, C., Diz-Chaves, Y., Lagunas, N., Calmarza-Font, I., Azcoitia, I., ... & Frago, L. M. (2011). Prenatal stress induces long-term effects in cell turnover in the hippocampus-hypothalamus-pituitary axis in adult male rats. *PloS One*, 6(11), e27549. doi:10.1371/journal.pone.0027549
- Barbosa, F. F., Santos, J. R., Meurer, Y. S. R., Macêdo, P. T., Ferreira, L. M. S., Pontes, I. M. O., ... & Silva, R. H. (2013). Differential cortical c-Fos and Zif-268 expression after object and spatial memory processing in a standard or episodic-like object recognition task. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 7, 112. doi:10.3389/fnbeh.2013.00112
- Barker, G. R., Bird, F., Alexander, V., & Warburton, E. C. (2007). Recognition memory for objects, place, and temporal order: a disconnection analysis of the role of the medial prefrontal cortex and perirhinal cortex. *Journal of Neuroscience*, 27(11), 2948–2957. doi:10.1523/jneurosci.5289-06.2007
- Barker, G. R., & Warburton, E. C. (2011). When is the hippocampus involved in recognition memory?. *Journal of Neuroscience*, 31(29), 10721–10731. doi:10.1523/jneurosci.6413-10.2011
- Barth, A. M., Domonkos, A., Fernandez-Ruiz, A., Freund, T. F., & Varga, V. (2018). Hippocampal network dynamics during rearing episodes. *Cell Reports*, 23(6), 1706-1715. doi:10.1016/j.celrep.2018.04.021
- Ben-Hamo, M., Larson, T. A., Duge, L. S., Sikkema, C., Wilkinson, C. W., de la Iglesia, H. O., & González, M. M. (2016). Circadian forced desynchrony of the master clock leads to phenotypic manifestation of depression in rats. *eNeuro*, 3(6), ENEURO.0237-16.2016. doi:10.1523/ENEURO.0237-16.2016
- Boon, P., Visser, H., & Daan, S. (1997). Effect of photoperiod on body mass, and daily energy intake and energy expenditure in young rats. *Physiology & Behavior*, 62(4), 913-919. doi:10.1016/S0031-9384(97)00271-0
- Brooks, E., & Canal, M. M. (2013). Development of circadian rhythms: Role of postnatal light environment. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 37(4), 551–560. doi:10.1016/j.neubiorev.2013.02.012

- Broussard, J. L., Reynolds, A. C., Depner, C. M., Ferguson, S. A., Dawson, D., & Wright, K. P. (2017). Circadian rhythms versus daily patterns in human physiology and behavior. In V. Kumar (Ed.), *Biological Timekeeping: Clocks, Rhythms and Behaviour* (pp. 279–295). Springer, New Delhi. doi:10.1007/978-81-322-3688-7_13
- Buijs, R. M., Tinoco, E. C. S., Alvarado, G. H., & Escobar, C. (2021). The circadian system: From clocks to physiology. In D. F. Swaab, F. Kreier, P. J. Lucassen, A. Salehi, R. M. Buijs (Eds.), *Handbook of Clinical Neurology* (Vol. 179, pp. 233–247). Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-819975-6.00013-3
- Cambras, T., Weller, J. R., Anglès-Pujoràs, M., Lee, M. L., Christopher, A., Díez-Noguera, A., ... & Horacio, O. (2007). Circadian desynchronization of core body temperature and sleep stages in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(18), 7634–7639. doi:10.1073/pnas.0702424104
- Campuzano, A., Vilaplana, J., Cambras, T., & Díez-Noguera, A. (1998). Dissociation of the rat motor activity rhythm under T cycles shorter than 24 hours. *Physiology & Behavior*, 63(2), 171–176. doi:10.1016/S0031-9384(97)00416-2
- Canal-Corretger, M. M., Cambras, T., Vilaplana, J., & Diez-Noguera, A. (2000). Bright light during lactation alters the functioning of the circadian system of adult rats. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 278(1), R201–R208. doi:10.1152/ajpregu.2000.278.1.R201
- Carmona-Alcocer, V., Rohr, K. E., Joye, D. A., & Evans, J. A. (2020). Circuit development in the master clock network of mammals. *European Journal of Neuroscience*, 51(1), 82–108. doi:10.1111/ejn.14259
- Chao, O. Y., de Souza Silva, M. A., Yang, Y. M., & Huston, J. P. (2020). The medial prefrontal cortex-hippocampus circuit that integrates information of object, place and time to construct episodic memory in rodents: behavioral, anatomical and neurochemical properties. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 113, 373-407. doi:10.1016/j.neubiorev.2020.04.007
- Chen, S. K., Badea, T. C., & Hattar, S. (2011). Photoentrainment and pupillary light reflex are mediated by distinct populations of ipRGCs. *Nature*, 476(7358), 92–95. doi:10.1038/nature10206
- Christ, E., Korf, H. W., & von Gall, C. (2012). When does it start ticking? Ontogenetic development of the mammalian circadian system. *Progress in Brain Research*, 199, 105–118. doi:10.1016/B978-0-444-59427-3.00006-X
- Chun, L. E., Woodruff, E. R., Morton, S., Hinds, L. R., & Spencer, R. L. (2015). Variations in phase and amplitude of rhythmic clock gene expression across prefrontal cortex,

- hippocampus, amygdala, and hypothalamic paraventricular and suprachiasmatic nuclei of male and female rats. *Journal of Biological Rhythms*, 30(5), 417–436. doi:10.1177/0748730415598608
- Craig, L. A., & McDonald, R. J. (2008). Chronic disruption of circadian rhythms impairs hippocampal memory in the rat. *Brain Research Bulletin*, 76(1-2), 141–151. doi:10.1016/j.brainresbull.2008.02.013
- Crowley, S. J., Cain, S. W., Burns, A. C., Acebo, C., & Carskadon, M. A. (2015). Increased sensitivity of the circadian system to light in early/mid-puberty. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 100(11), 4067–4073. doi:10.1210/jc.2015-2775
- Cruz, A. D. M., Frei, F., & Graeff, F. G. (1994). Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 49(1), 171–176. doi:10.1016/0091-3057(94)90472-3
- de la Iglesia, H. O., Cambras, T., & Díez-Noguera, A. (2008). Circadian internal desynchronization: Lessons from a rat. *Sleep and Biological Rhythms*, 6(2), 76–83. doi:10.1111/j.1479-8425.2008.00346.x
- de la Iglesia, H. O., Cambras, T., Schwartz, W. J., & Díez-Noguera, A. (2004). Forced desynchronization of dual circadian oscillators within the rat suprachiasmatic nucleus. *Current Biology*, 14(9), 796–800. doi:10.1016/j.cub.2004.04.034
- de Oliveira, I. G. B., Junior, M. D. F., Lopes, P. R., Campos, D. B. T., Ferreira-Neto, M. L., Santos, E. H. R., ... & Rosa, D. A. (2019). Forced internal desynchrony induces cardiometabolic alterations in adult rats. *Journal of Endocrinology*, 242(2), 25-36. doi:10.1530/JOE-19-0026
- Duffield, G. E. (2003). DNA microarray analyses of circadian timing: the genomic basis of biological time. *Journal of Neuroendocrinology*, 15(10), 991–1002. doi:10.1046/j.1365-2826.2003.01082.x
- Dumas, T. C. (2005). Late postnatal maturation of excitatory synaptic transmission permits adult-like expression of hippocampal-dependent behaviors. *Hippocampus*, 15(5), 562-578. doi: 10.1002/hipo.20077
- Ebling, F. J. P., & Foster, D. L. (1989). Pineal melatonin rhythms and the timing of puberty in mammals. *Experientia*, 45(10), 946–954. doi:10.1007/BF01953052
- Eiland, L., & Romeo, R. D. (2013). Stress and the developing adolescent brain. *Neuroscience*, 249, 162-171. doi:10.1016/j.neuroscience.2012.10.048
- Evans, J. A., & Gorman, M. R. (2016). In synch but not in step: circadian clock circuits regulating plasticity in daily rhythms. *Neuroscience*, 320, 259–280. doi:10.1016/j.neuroscience.2016.01.072

- Foster, R. G. (2021). Fundamentals of circadian entrainment by light. *Lighting Research & Technology*, 53(5), 377–393. doi:10.1177/14771535211014792
- Gibson, E. M., Wang, C., Tjho, S., Khattar, N., & Kriegsfeld, L. J. (2010). Experimental ‘jet lag’ inhibits adult neurogenesis and produces long-term cognitive deficits in female hamsters. *PloS One*, 5(12), e15267. doi:10.1371/journal.pone.0015267
- Golombek, D. A., Casiraghi, L. P., Agostino, P. V., Paladino, N., Duhart, J. M., Plano, S. A., & Chiesa, J. J. (2013). The times they’re a-changing: effects of circadian desynchronization on physiology and disease. *Journal of Physiology-Paris*, 107(4), 310–322. doi:10.1016/j.jphysparis.2013.03.007
- Golombek, D. A., & Rosenstein, R. E. (2010). Physiology of circadian entrainment. *Physiological Reviews*, 90(3), 1063–1102. doi:10.1152/physrev.00009.2009
- Hagenauer, M. H., & Lee, T. M. (2013). Adolescent sleep patterns in humans and laboratory animals. *Hormones and Behavior*, 64(2), 270–279. doi:10.1016/j.yhbeh.2013.01.013
- Horsey, E. A., Maletta, T., Turner, H., Cole, C., Lehmann, H., & Fournier, N. M. (2020). Chronic jet lag simulation decreases hippocampal neurogenesis and enhances depressive behaviors and cognitive deficits in adult male rats. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 13, 272. doi: 10.3389/fnbeh.2019.00272
- Hughes, S., Jagannath, A., Hankins, M. W., Foster, R. G., & Peirson, S. N. (2015). Photic regulation of clock systems. *Methods in Enzymology*, 552, 125–143. doi:10.1016/bs.mie.2014.10.018
- Hut, R. A., & Beersma, D. G. (2011). Evolution of time-keeping mechanisms: early emergence and adaptation to photoperiod. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 366(1574), 2141–2154. doi:10.1098/rstb.2010.0409
- Kalueff, A. V., Aldridge, J. W., LaPorte, J. L., Murphy, D. L., & Tuohimaa, P. (2007). Analyzing grooming microstructure in neurobehavioral experiments. *Nature Protocols*, 2(10), 2538–2544. doi: 10.1038/nprot.2007.367
- Kealy, J., & Commins, S. (2011). The rat perirhinal cortex: a review of anatomy, physiology, plasticity, and function. *Progress in Neurobiology*, 93(4), 522-548. doi:10.1016/j.pneurobio.2011.03.002
- Koike, B. D. V. (2013). *Avaliação comportamental e neuroquímica de ratos em dessincronização forçada: possíveis implicações para um modelo animal de oscilações no humor* (Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Brasil). Recuperado em: <https://repositorio.ufrn.br/handle/123456789/17234>

- Kott, J., Leach, G., & Yan, L. (2012). Direction-dependent effects of chronic “jet-lag” on hippocampal neurogenesis. *Neuroscience Letters*, 515(2), 177–180. doi:10.1016/j.neulet.2012.03.048
- Krishnan, H. C., & Lyons, L. C. (2015). Synchrony and desynchrony in circadian clocks: impacts on learning and memory. *Learning & Memory*, 22(9), 426–437. doi:10.1101/lm.038877.115
- Krout, K. E., Kawano, J., Mettenleiter, T. C., & Loewy, A. D. (2002). CNS inputs to the suprachiasmatic nucleus of the rat. *Neuroscience*, 110(1), 73–92. doi:10.1016/S0306-4522(01)00551-6
- Lamprea, M. R., Cardenas, F. P., Setem, J., & Morato, S. (2008). Thigmotactic responses in an open-field. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 41(2), 135–140. doi:10.1590/s0100-879x2008000200010
- Lazzerini Ospri, L., Prusky, G., & Hattar, S. (2017). Mood, the circadian system, and melanopsin retinal ganglion cells. *Annual Review of Neuroscience*, 40, 539–556. doi:10.1146/annurev-neuro-072116-031324
- Leng, Y., Musiek, E. S., Hu, K., Cappuccio, F. P., & Yaffe, K. (2019). Association between circadian rhythms and neurodegenerative diseases. *The Lancet Neurology*, 18(3), 307–318. doi:10.1016/S1474-4422(18)30461-7
- Lever, C., Burton, S., & O'Keefe, J. (2006). Rearing on hind legs, environmental novelty, and the hippocampal formation. *Reviews in the Neurosciences*, 17(1-2), 111–134. doi:10.1515/REVNEURO.2006.17.1-2.111
- Lima, L. E. B., & Vargas, N. N. G. (2018). O Relógio Biológico e os ritmos circadianos de mamíferos: uma contextualização histórica. *Revista Da Biologia*, 12(2), 1–7. <https://doi.org/10.7594/revbio.12.02.01>
- Liu Y. H., Panda S. (2017). Circadian Photoentrainment Mechanism in Mammals. In V. Kumar (Ed.), *Biological Timekeeping: Clocks, Rhythms and Behaviour* (pp. 365–393). Springer, New Delhi. doi:10.1007/978-81-322-3688-7_17
- Logan, R. W., & McClung, C. A. (2019). Rhythms of life: circadian disruption and brain disorders across the lifespan. *Nature Reviews Neuroscience*, 20(1), 49–65. doi:10.1038/s41583-018-0088-y
- Loss, C. M., Cordova, S. D., Callegari-Jacques, S. M., & de Oliveira, D. L. (2014). Time-of-day influence on exploratory behaviour of rats exposed to an unfamiliar environment. *Behaviour*, 151(14), 1943–1966. doi:10.1163/1568539X-00003224
- Marques, M. D., Marques, N., Menna-Barreto, L., Silva, A. A. B., & Cipolla-Neto, J. (1989). Ritmos da vida. *Ciência Hoje*, 10(58), 43–49.

- Marques N., & Menna-Barreto L. (2003). *Cronobiologia: Princípios e Aplicações*. Edusp, São Paulo.
- Martynhak, B. J., Correia, D., Morais, L. H., Araujo, P., Andersen, M. L., Lima, M. M., ... & Andreatini, R. (2011). Neonatal exposure to constant light prevents anhedonia-like behavior induced by constant light exposure in adulthood. *Behavioural Brain Research*, 222(1), 10–14. doi:10.1016/j.bbr.2011.03.022
- Meijer, J. H., Schaap, J., Watanabe, K., & Albus, H. (1997). Multiunit activity recordings in the suprachiasmatic nuclei: in vivo versus in vitro models. *Brain Research*, 753(2), 322–327. doi:10.1016/S0006-8993(97)00150-9
- Meijer, J. H., & Schwartz, W. J. (2003). In search of the pathways for light-induced pacemaker resetting in the suprachiasmatic nucleus. *Journal of Biological Rhythms*, 18(3), 235–249. doi:10.1177/0748730403018003006
- Menna-Barreto, L. S. (2005). Relógio biológico - prazo de validade esgotado? *Neurociências*, 2(4), 190–193.
- Mendez, N., Abarzua-Catalan, L., Vilches, N., Galdames, H. A., Spichiger, C., Richter, H. G., ... & Torres-Farfán, C. (2012). Timed maternal melatonin treatment reverses circadian disruption of the fetal adrenal clock imposed by exposure to constant light. *PloS One*, 7(8), e42713. doi:10.1371/journal.pone.0042713
- Moore, R. Y. (2013). The suprachiasmatic nucleus and the circadian timing system. *Progress in molecular biology and translational science*, 119, 1–28. Doi: 10.1016/B978-0-12-396971-2.00001-4
- Moore, R. Y., & Eichler, V. B. (1972). Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Research*, 42(1), 201–206. doi:10.1016/0006-8993(72)90054-6
- Moura, E. G.; & Oliveira, E. (2018). Regulação do Comportamento Alimentar. In: A. L. Sawaya; C. G. Leandro; D. Waitzberg. (Eds). *Fisiologia da Nutrição: na Saúde e na Doença: Da Biologia Molecular Ao Tratamento*, (2ed) (p.95-102). São Paulo: Atheneu, 2018.
- Neto, S. P. D., Carneiro, B. T. S., Valentimuzzi, V. S., & Araújo, J. F. (2008). Dissociation of the circadian rhythm of locomotor activity in a 22 h light–dark cycle impairs passive avoidance but not object recognition memory in rats. *Physiology & Behavior*, 94(3), 523–527. doi:10.1016/j.physbeh.2008.03.013
- Neves, S. M., Mancini Filho, J., & Menezes, E. W. (2013). *Manual de cuidados e procedimentos com animais de laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da*

- Parente, J. S. (2021). *Efeito da dissociação circadiana pelo protocolo T22 nas fases pós-natal da infância e adolescência sobre a expressão neuroquímica de NeuN e PV no hipocampo, córtex pré frontal, amígdala e núcleo supraquiasmático de ratos Wistar adultos* (Dissertação de Mestrado., Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil).
- Patel, T. P., Gullotti, D. M., Hernandez, P., O'Brien, W. T., Capehart, B. P., Morrison III, B., ... & Meaney, D. F. (2014). An open-source toolbox for automated phenotyping of mice in behavioral tasks. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 8, 349. doi:10.3389/fnbeh.2014.00349
- Pereira, J. C. (2017). *A dissociação do ritmo circadiano da atividade locomotora em um ciclo claro-escuro de 22 horas, não induz o comportamento do tipo ansioso, nem prejudica a memória aversiva de ratos Wistar adolescentes* (Dissertação de Mestrado., Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil). Acessado em: <https://repositorio.ufpb.br/jspui/handle/tede/9679>
- Plano, S. A., Casiraghi, L. P., García Moro, P., Paladino, N., Golombek, D. A., & Chiesa, J. J. (2017). Circadian and metabolic effects of light: implications in weight homeostasis and health. *Frontiers in Neurology*, 8, 558. doi:10.3389/fneur.2017.00558
- Pittendrigh, C. S. (1960). Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. In *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* (Vol. 25, pp. 159–184). Cold Spring Harbor Laboratory Press. doi:10.1101/sqb.1960.025.01.015.
- Porcu, A., Riddle, M., Dulcis, D., & Welsh, D. K. (2018). Photoperiod-induced neuroplasticity in the circadian system. *Neural Plasticity*, 5147585. doi:10.1155/2018/5147585
- Prut, L., & Belzung, C. (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European Journal of Pharmacology*, 463(1-3), 3–33. doi:10.1016/S0014-2999(03)01272-X
- Refinetti, R. (2006). Variability of diurnality in laboratory rodents. *Journal of Comparative Physiology A*, 192(7), 701–714. doi:10.1007/s00359-006-0093-x
- Refinetti, R. (2020). Circadian rhythmicity of body temperature and metabolism. *Temperature*, 7(4), 321–362. doi:10.1080/23328940.2020.1743605
- Reincke, S. A., & Hanganu-Opatz, I. L. (2017). Early-life stress impairs recognition memory and perturbs the functional maturation of prefrontal-hippocampal-perirhinal networks. *Scientific Reports*, 7(1), 1-16. doi:10.1038/srep42042
- Reppert, S. M., & Weaver, D. R. (2001). Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annual Review of Physiology*, 63(1), 647–676. doi:10.1146/annurev.physiol.63.1.647

- Reppert, S. M., & Weaver, D. R. (2002). Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*, 418(6901), 935–941. doi:10.1038/nature00965
- Ruby, N. F., Fernandez, F., Garrett, A., Klima, J., Zhang, P., Sapolsky, R., & Heller, H. C. (2013). Spatial memory and long-term object recognition are impaired by circadian arrhythmia and restored by the GABA_AAntagonist pentylenetetrazole. *PloS One*, 8(8), e72433. doi:10.1371/journal.pone.0072433
- Schelstraete, I., Knaepen, E., Dutilleul, P., & Weyers, M. H. (1992). Maternal behaviour in the *Wistar* rat under atypical Zeitgeber. *Physiology & Behavior*, 52(1), 189–193. doi:10.1016/0031-9384(92)90452-8
- Schwartz, W. J. (2009). Circadian rhythms: a tale of two nuclei. *Current Biology*, 19(11), R460–R462. doi:10.1016/j.cub.2009.04.044
- Sellix, M. T., Evans, J. A., Leise, T. L., Castanon-Cervantes, O., Hill, D. D., DeLisser, P., ... & Davidson, A. J. (2012). Aging differentially affects the re-entrainment response of central and peripheral circadian oscillators. *Journal of Neuroscience*, 32(46), 16193–16202. doi:10.1523/jneurosci.3559-12.2012
- Siemann, J. K., Williams, P., Malik, T. N., Jackson, C. R., Green, N. H., Emeson, R. B., ... & McMahon, D. G. (2020). Photoperiodic effects on monoamine signaling and gene expression throughout development in the serotonin and dopamine systems. *Scientific Reports*, 10(1), 1-14. doi:10.1038/s41598-020-72263-5
- Silver, R., & Schwartz, W. J. (2005). The suprachiasmatic nucleus is a functionally heterogeneous timekeeping organ. *Methods in Enzymology*, 393, 451–465. doi:10.1016/S0076-6879(05)93022-X
- Sisk, C. L., & Foster, D. L. (2004). The neural basis of puberty and adolescence. *Nature Neuroscience*, 7(10), 1040–1047. doi:10.1038/nn1326
- Smarr, B. L., Jennings, K. J., Driscoll, J. R., & Kriegsfeld, L. J. (2014). A time to remember: the role of circadian clocks in learning and memory. *Behavioral Neuroscience*, 128(3), 283–303. doi:10.1037/a0035963
- Stephan, F. K., & Zucker, I. (1972). Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 69(6), 1583–1586. doi:10.1073/pnas.69.6.1583
- Strohmaier, S., Devore, E. E., Vetter, C., Eliassen, A. H., Rosner, B., Okereke, O. I., & Schernhammer, E. S. (2019). Night shift work before and during pregnancy in relation to depression and anxiety in adolescent and young adult offspring. *European Journal of Epidemiology*, 34(7), 625–635. doi:10.1007/s10654-019-00525-2

- Tahara, Y., & Shibata, S. (2018). Entrainment of the mouse circadian clock: effects of stress, exercise, and nutrition. *Free Radical Biology and Medicine*, 119, 129–138. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2017.12.026
- Tan, H. M., Wills, T. J., & Cacucci, F. (2017). The development of spatial and memory circuits in the rat. *WIREs: Cognitive Science*, 8(3), e1424. doi:10.1002/wcs.1424
- Thomas, K. A., Burr, R. L., Spieker, S., Lee, J., & Chen, J. (2014). Mother–infant circadian rhythm: Development of individual patterns and dyadic synchrony. *Early human development*, 90(12), 885-890. doi:10.1016/j.earlhumdev.2014.09.005
- Tomotani, B. M., & Oda, G. A. (2012). Diurnos ou Noturnos? Discutindo padrões temporais de atividade. *Revista da Biologia*, 9(3), 1–6. doi:10.7594/revbio.09.03.01
- Touitou, Y., Coste, O., Dispersyn, G., & Pain, L. (2010). Disruption of the circadian system by environmental factors: effects of hypoxia, magnetic fields and general anesthetics agents. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(9-10), 928–945. doi:10.1016/j.addr.2010.06.005
- Touitou, Y., Touitou, D., & Reinberg, A. (2016). Disruption of adolescents' circadian clock: the vicious circle of media use, exposure to light at night, sleep loss and risk behaviors. *Journal of Physiology-Paris*, 110(4), 467–479. doi:10.1016/j.jphysparis.2017.05.001
- Vadnie, C. A., & McClung, C. A. (2017). Circadian rhythm disturbances in mood disorders: insights into the role of the suprachiasmatic nucleus. *Neural Plasticity*, 2017, 1504507. doi:10.1155/2017/1504507
- Vilaplana, J., Madrid, J. A., Sanchez-Vazquez, J., Campuzano, A., Cambras, T., & Diez-Noguera, A. (1995). Influence of period length of light/dark cycles on the body weight and food intake of young rats. *Physiology & Behavior*, 58(1), 9-13. doi:10.1016/0031-9384(95)00021-A
- Vilches, N., Spichiger, C., Mendez, N., Abarzua-Catalan, L., Galdames, H. A., Hazlerigg, D. G., ... & Torres-Farfán, C. (2014). Gestational chronodisruption impairs hippocampal expression of NMDA receptor subunits Grin1b/Grin3a and spatial memory in the adult offspring. *PLoS One*, 9(3), e91313. doi:10.1371/journal.pone.0091313
- Vosko, A. M., Colwell, C. S., & Avidan, A. Y. (2010). Jet lag syndrome: circadian organization, pathophysiology, and management strategies. *Nature and Science of Sleep*, 2, 187–198. doi:10.2147/nss.s6683
- Westbrook, S. R., Brennan, L. E., & Stanton, M. E. (2014). Ontogeny of object versus location recognition in the rat: acquisition and retention effects. *Developmental Psychobiology*, 56(7), 1492-1506. doi:10.1002/dev.21232

- Wotus, C., Lilley, T. R., Neal, A. S., Suleiman, N. L., Schmuck, S. C., & Smarr, B. L., et al. (2013) Forced Desynchrony Reveals Independent Contributions of Suprachiasmatic Oscillators to the Daily Plasma Corticosterone Rhythm in Male Rats. *PLoS ONE* 8(7): e68793. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068793>
- Xie, Y., Tang, Q., Chen, G., Xie, M., Yu, S., Zhao, J., & Chen, L. (2019). New insights into the circadian rhythm and its related diseases. *Frontiers in Physiology*, 10, 682. doi:10.3389/fphys.2019.00682
- Yellon, S. M., & Goldman, B. D. (1987). Influence of short days on diurnal patterns of serum gonadotrophins and prolactin concentrations in the male Djungarian hamster, Phodopus sungorus. *Reproduction*, 80(1), 167-174. doi:10.1530/jrf.0.0800167
- Zimcikova, E., Simko, J., Karesova, I., Kremlacek, J., & Malakova, J. (2017). Behavioral effects of antiepileptic drugs in rats: Are the effects on mood and behavior detectable in open-field test?. *Seizure*, 52, 35-40. doi:10.1016/j.seizure.2017.09.015

ANEXO A: ETAPAS DA FASE ADOLESCÊNCIA

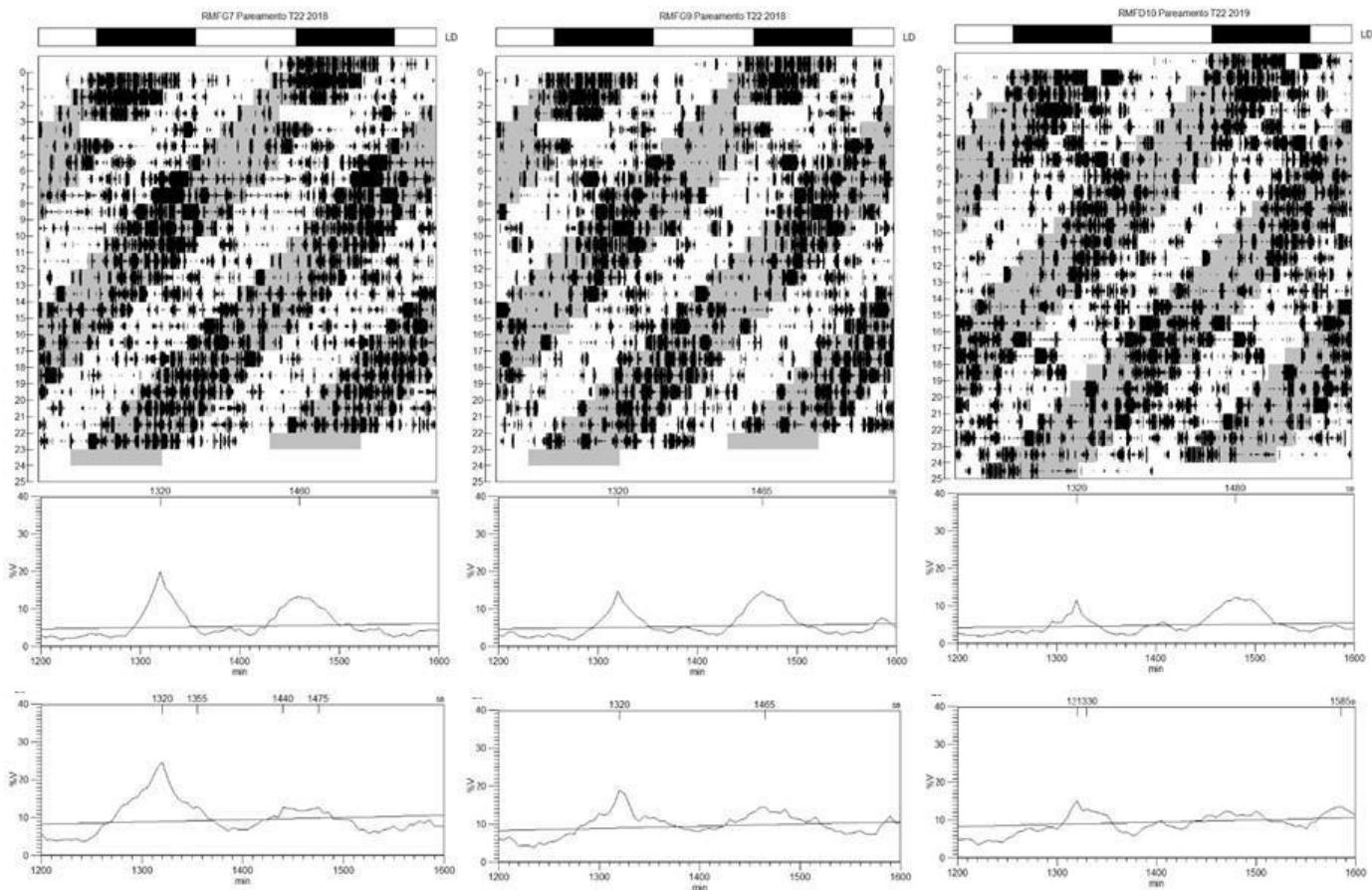
Etapa 1					Etapa 2				
Rato	Grupo	Protocolo Luminoso	Dias no Protocolo	Dias Pós-Nascimento (final T22)	Rato	Grupo	Protocolo Luminoso	Dias no protocolo	Dias pós nascimento (final T22)
G12	CT	24	42	64	D38	AD	22	42	64
G13	CT	24	42	64	D09	AD	22	42	64
G14	CT	24	42	64	D10	AD	22	42	64
G16	AD	22	44	66	D11	AD	22	42	64
G17	AD	22	44	67	D12	ID	24	42	64
G18	AD	22	44	66	D13	ID	24	42	64
G19	AD	22	44	66	D14	ID	24	42	64
G20	AD	22	44	66	D15	ID	24	42	64
G22	AD	22	44	66	D24	CT	24	42	64
G23	CT	24	42	65	D25	CT	24	42	64
G24	CT	24	42	64	D26	CT	24	42	64
G25	CT	24	42	65	D28	CT	24	42	64
G26	CT	24	42	64	D29	CT	24	42	64
G27	ID	24	42	65	D30	CT	24	42	64
G28	ID	24	42	65	D31	CT	24	42	64
G29	ID	24	42	65					
G30	ID	24	42	65					
G31	ID	24	42	65					
G32	ID	24	42	65					
G33	ID	24	42	65					
G34	ID	24	42	65					

ANEXO B: ETAPAS DA FASE ADULTA

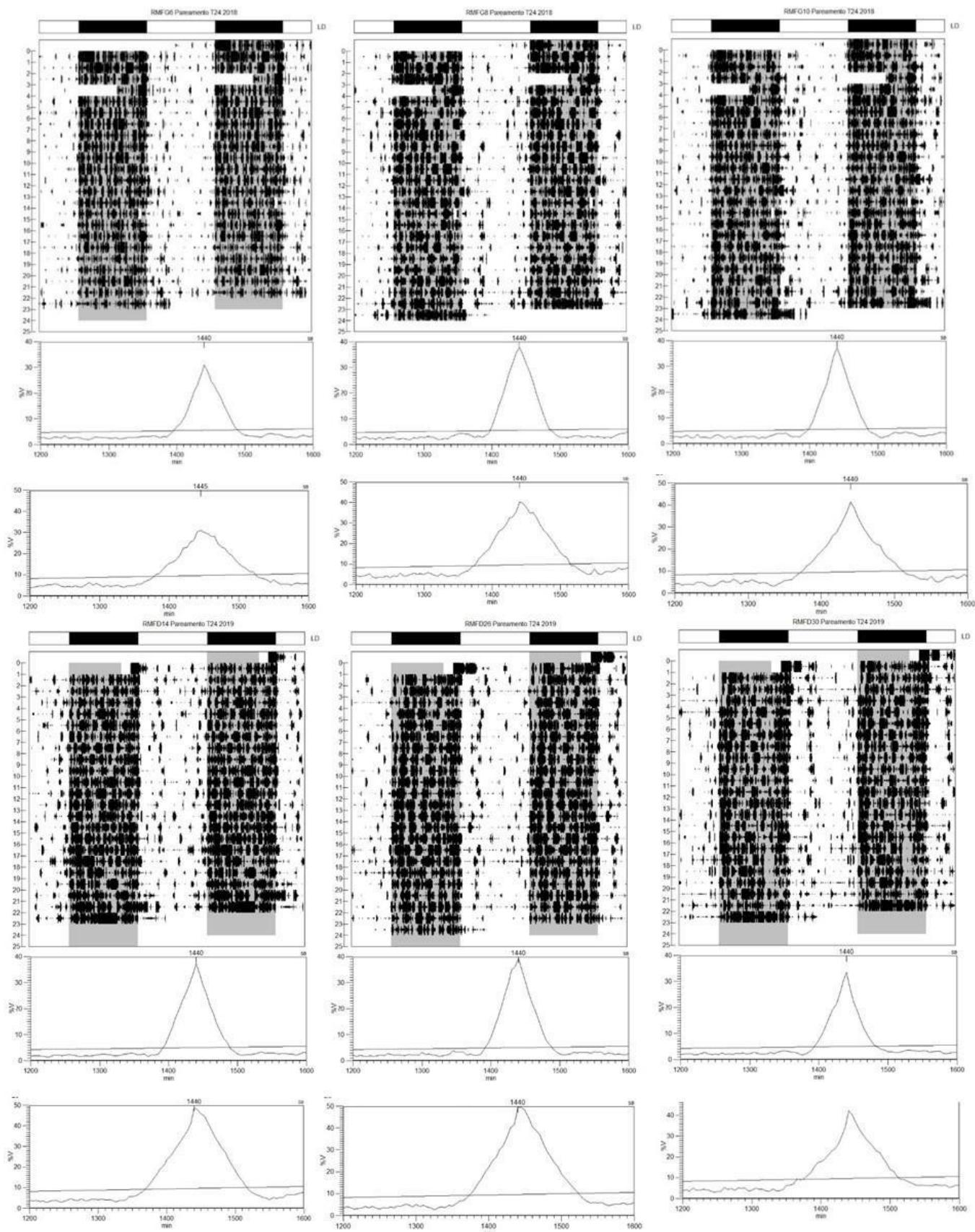
Fase Adulta

Etapa 1				Etapa 2			
Rato	Grupo	Dias no protocolo	Dias Pós-Nascimento (final do experimento)	Rato	Grupo	Dias no protocolo	Dias pós-nascimento (final do experimento)
G12	CT	59	125	D38	AD	73	137
G13	CT	62	128	D09	AD	72	136
G14	CT	61	127	D10	AD	72	136
G16	AD	62	130	D11	AD	71	135
G17	AD	61	128	D12	ID	72	136
G18	AD	63	131	D13	ID	71	135
G19	AD	61	129	D14	ID	72	136
G20	AD	62	130	D15	ID	76	140
G22	AD	63	131	D24	CT	71	135
G23	CT	63	128	D25	CT	78	142
G24	CT	61	127	D26	CT	78	142
G25	CT	63	128	D28	CT	73	137
G26	CT	59	125	D29	CT	77	141
G27	ID	59	124	D30	CT	72	136
G28	ID	63	128	D31	CT	73	137
G29	ID	61	126				
G30	ID	62	127				
G31	ID	63	128				
G32	ID	59	124				
G33	ID	62	127				
G34	ID	61	126				

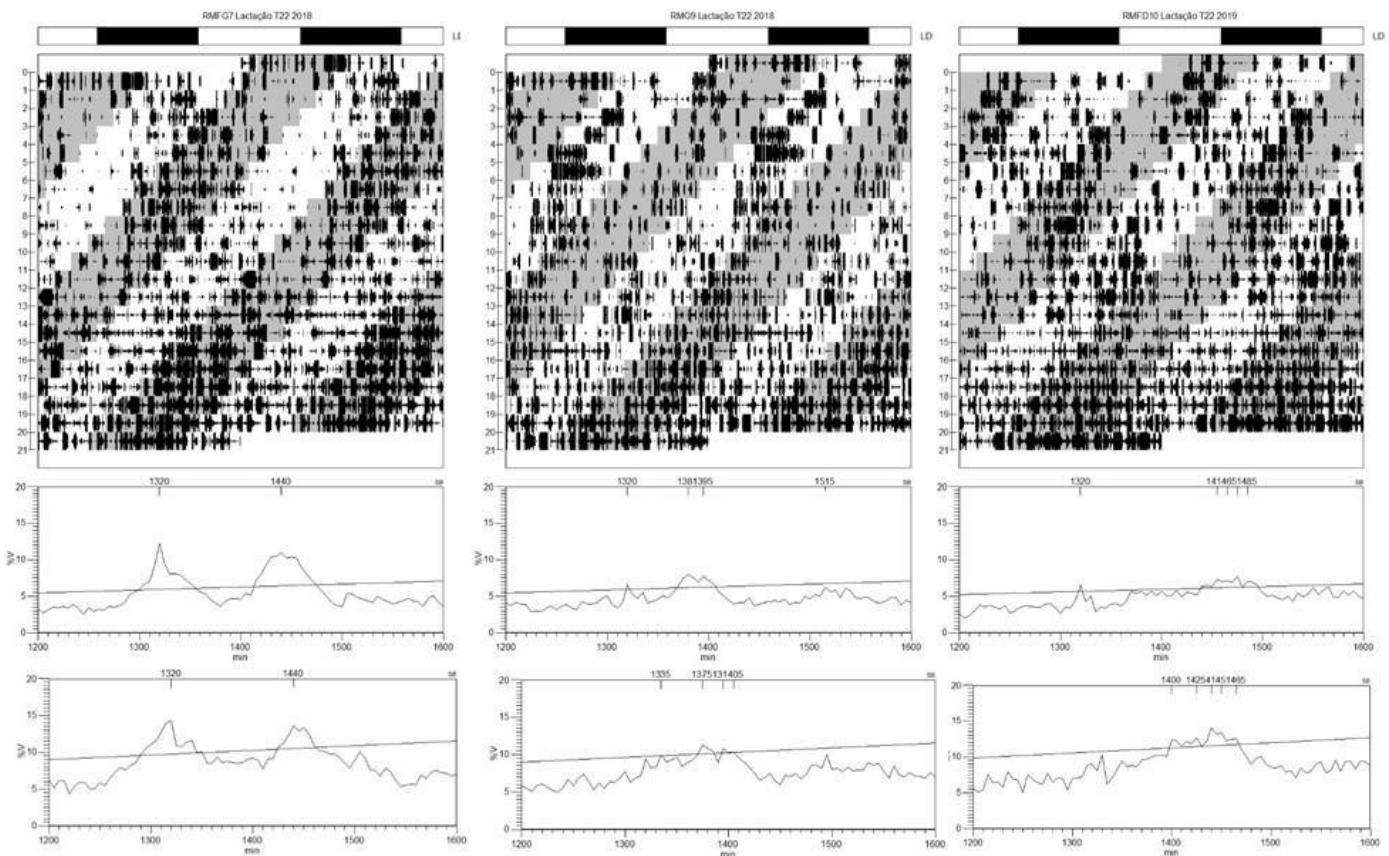
ANEXO C: PAREAMENTO T22



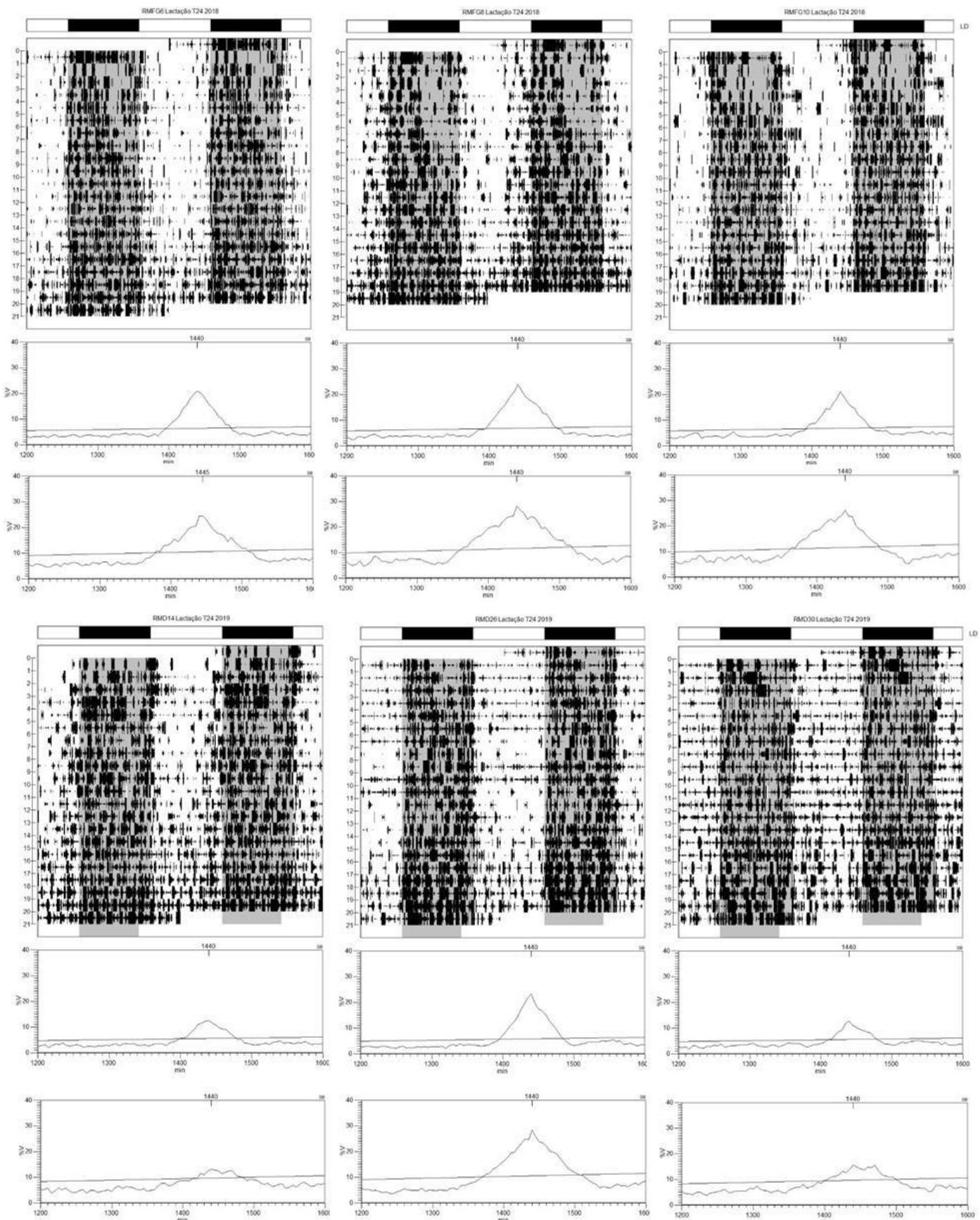
ANEXO D: PAREAMENTO T24



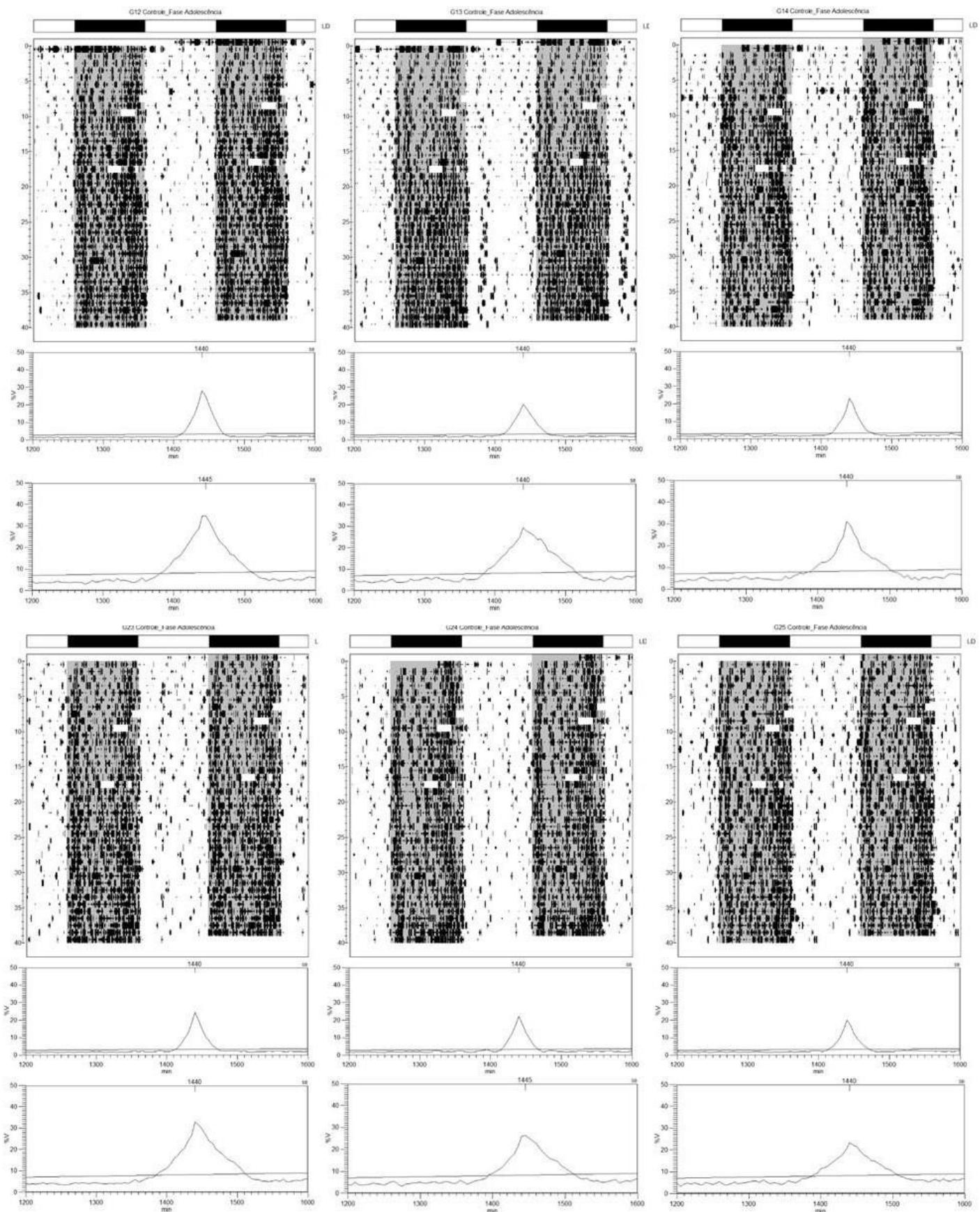
ANEXO E: LACTAÇÃO T22

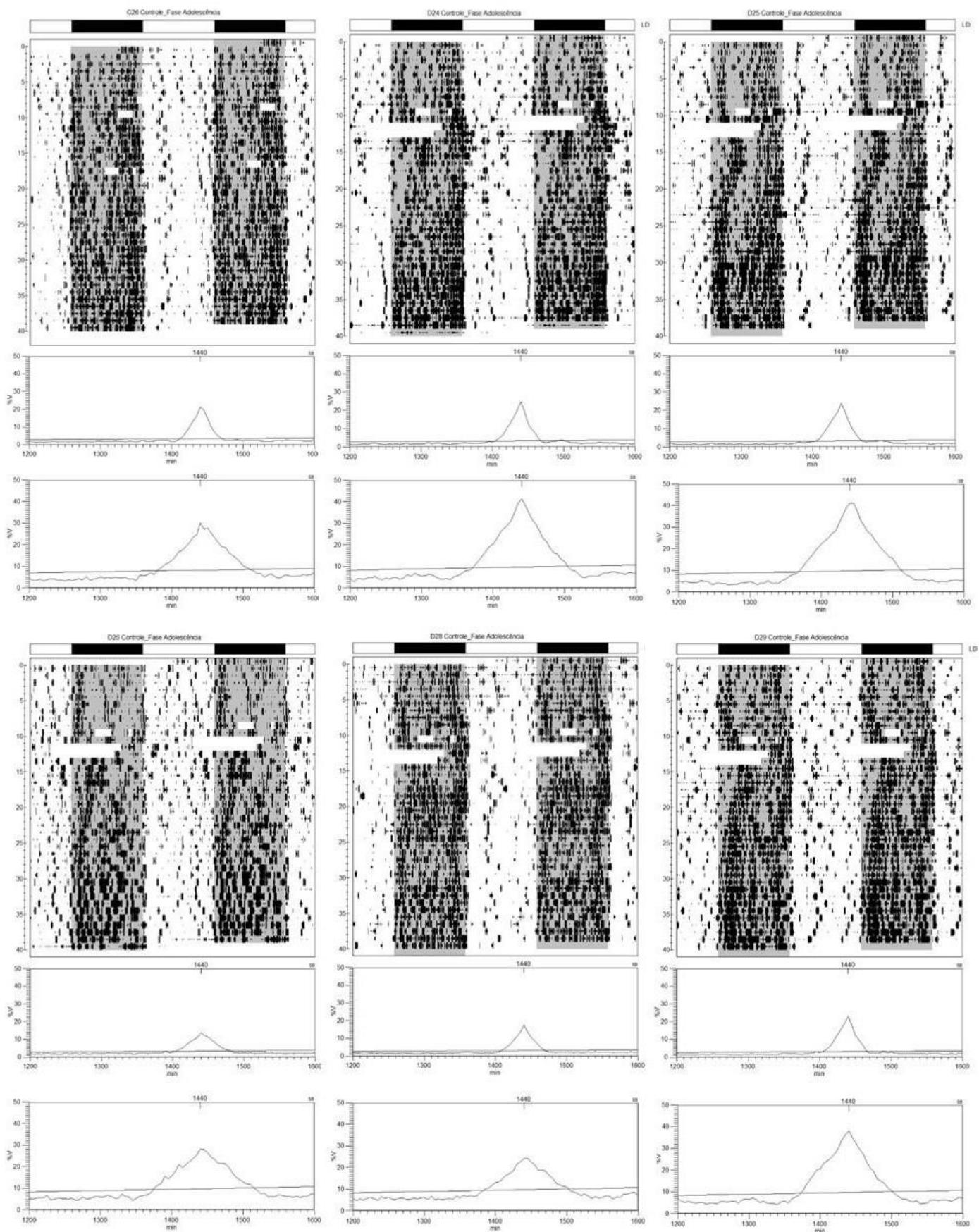


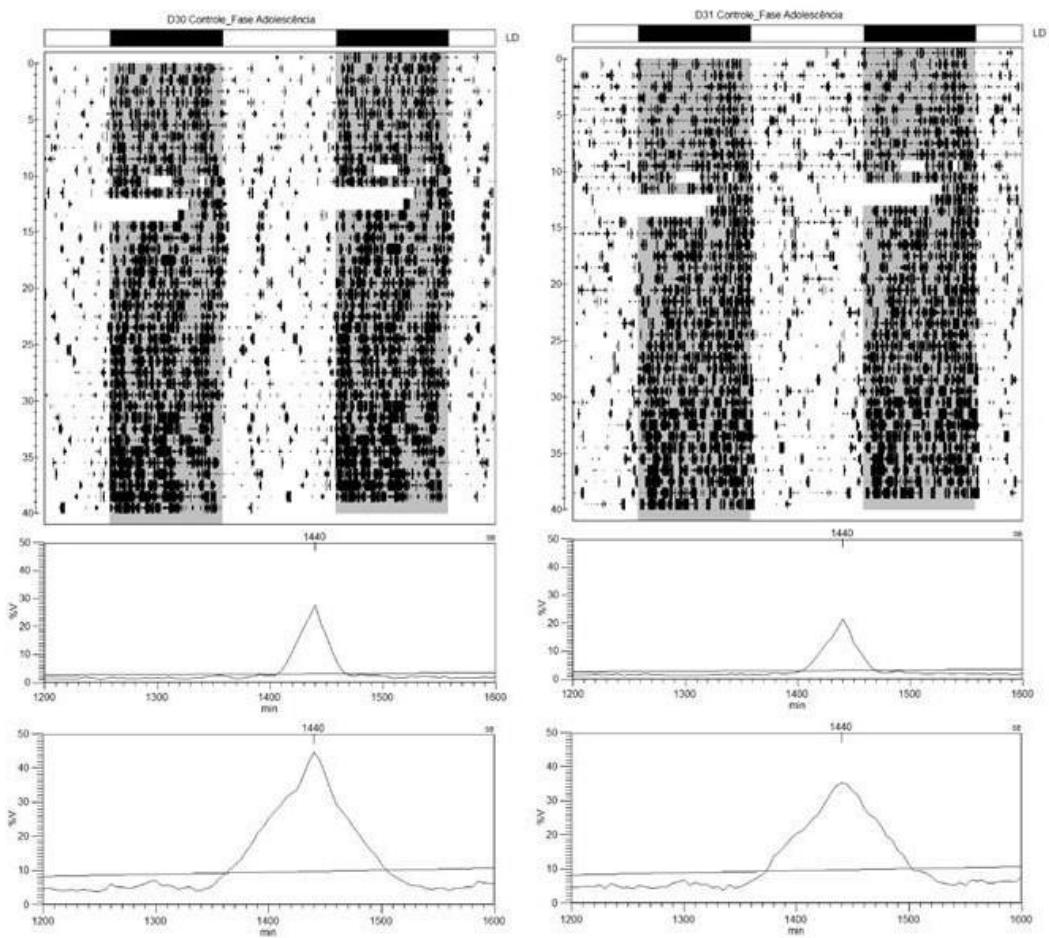
ANEXO F: LACTAÇÃO T24



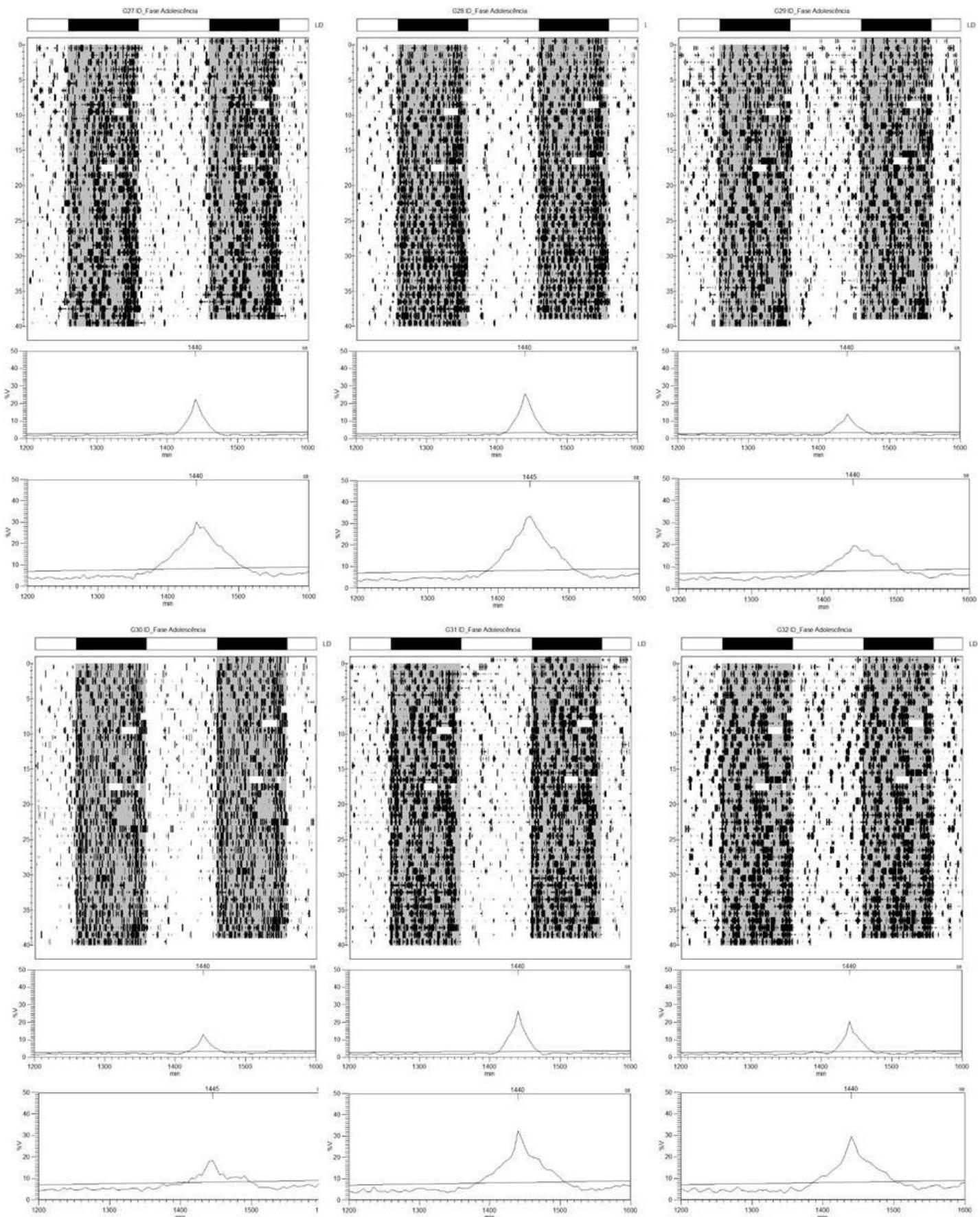
ANEXO G: GRUPO CONTROLE (FASE ADOLESCÊNCIA)

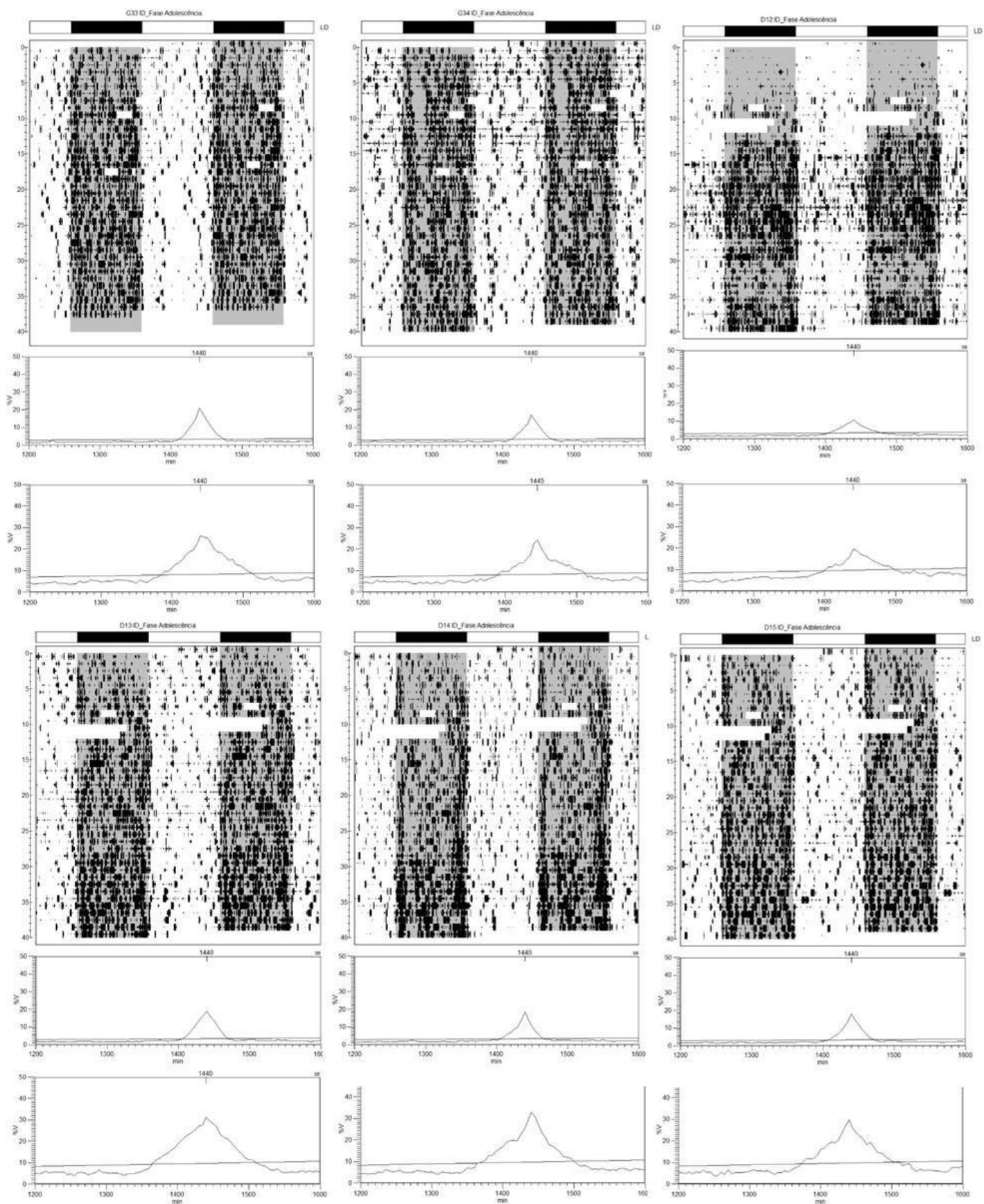




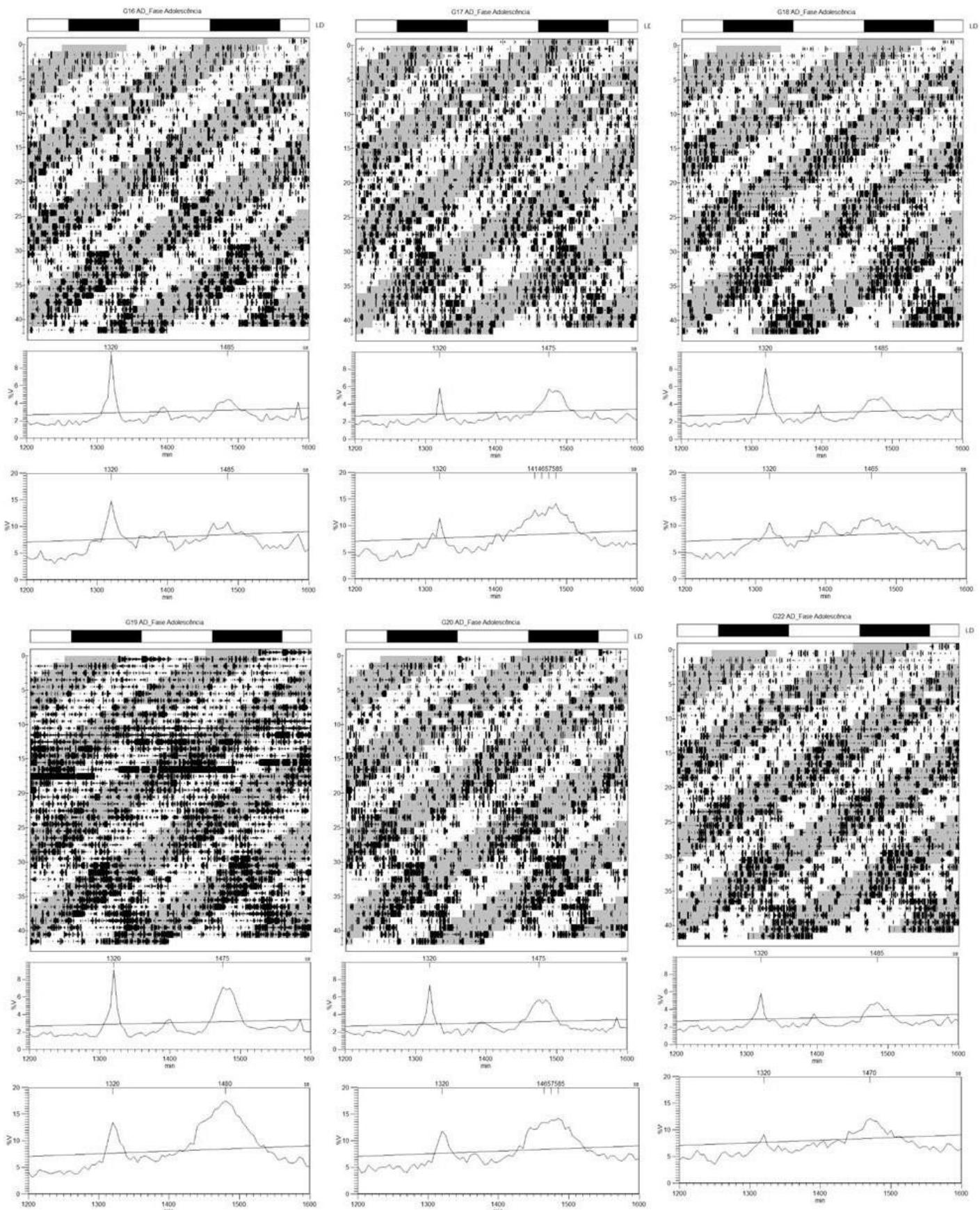


ANEXO H: GRUPO INFÂNCIA D (FASE ADOLESCÊNCIA)

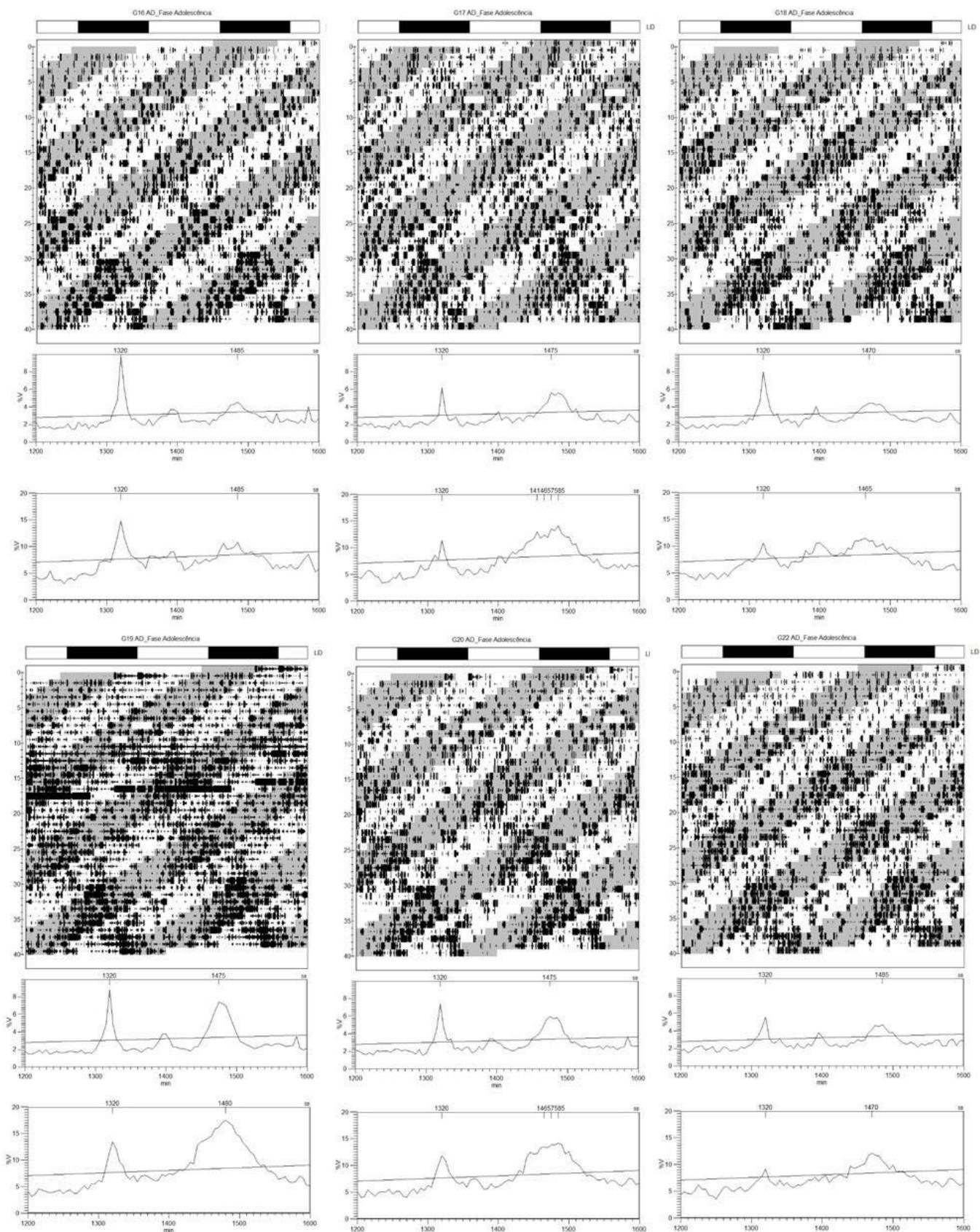




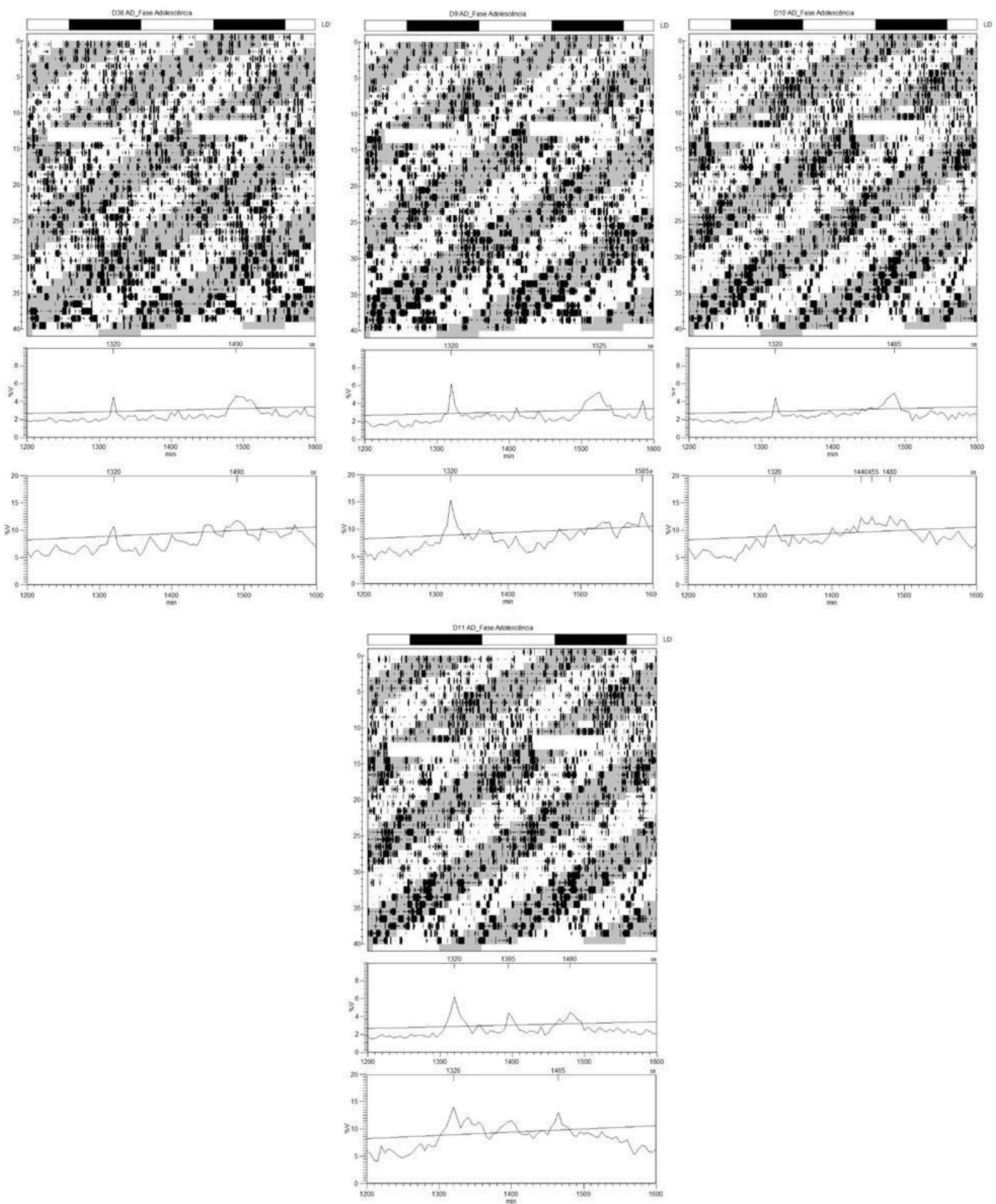
ANEXO I: GRUPO ADOLESCÊNCIA D (FASE ADOLESCÊNCIA 2018 42DIAS)



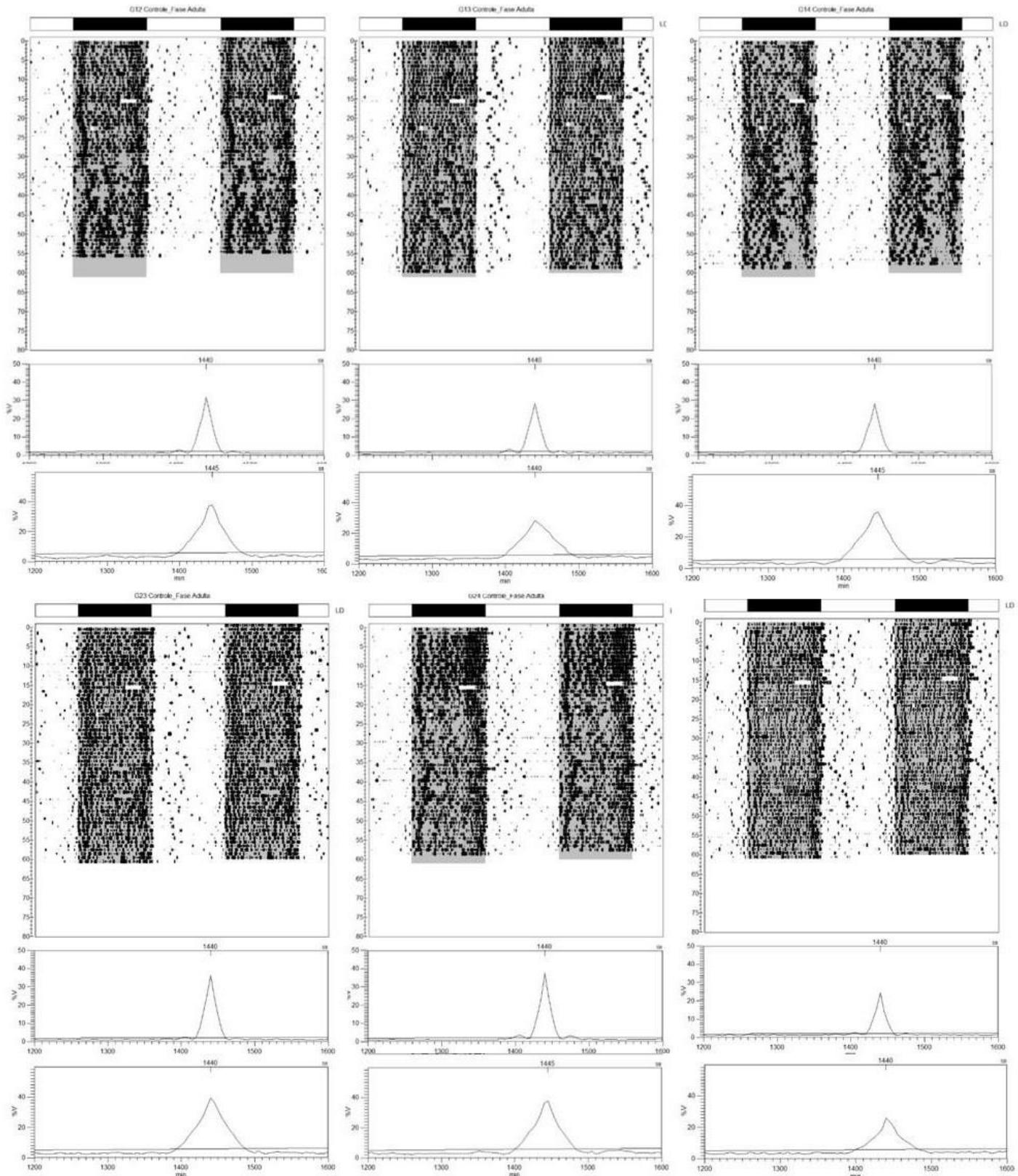
ANEXO J: GRUPO ADOLESCÊNCIA D (FASE ADOLESCÊNCIA 2018 40DIAS)

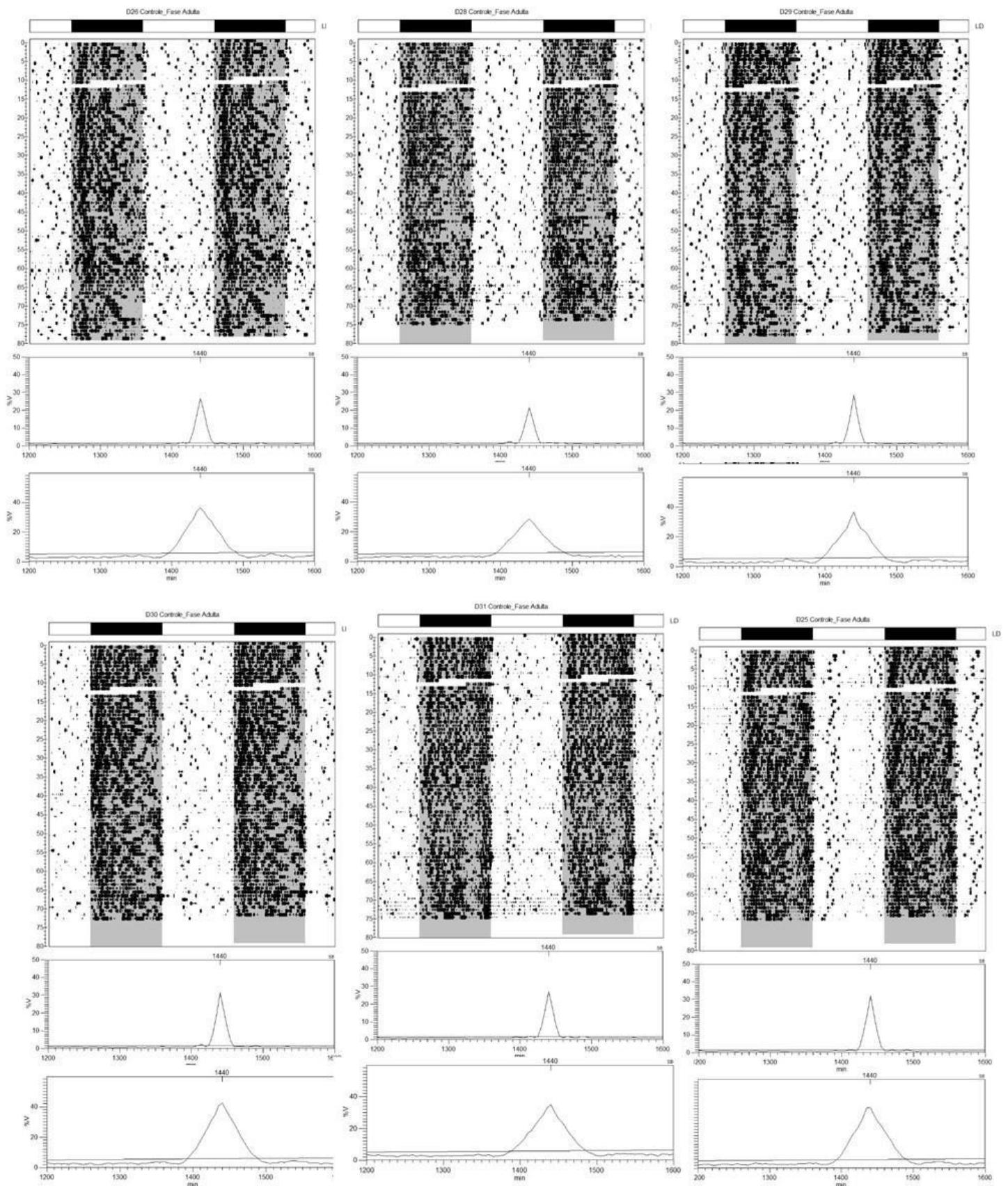


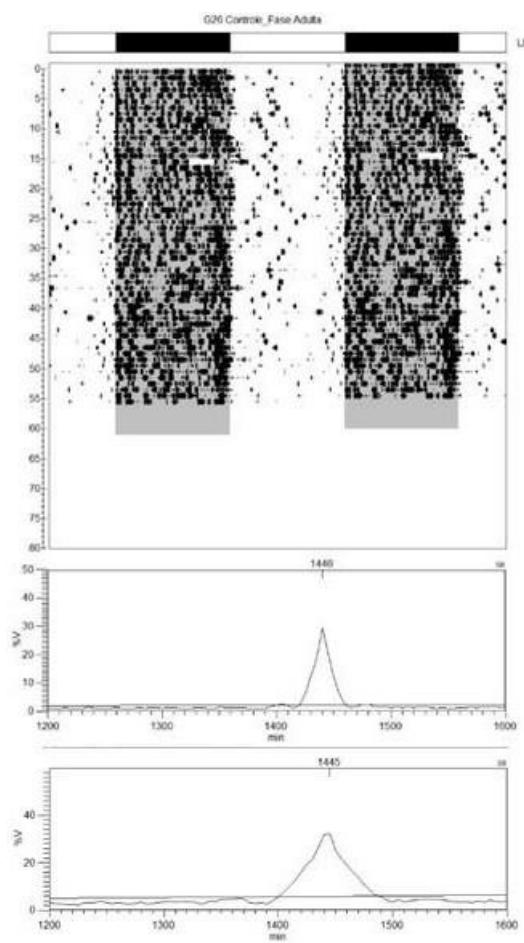
ANEXO K: GRUPO ADOLESCÊNCIA D (FASE ADOLESCÊNCIA 2019)



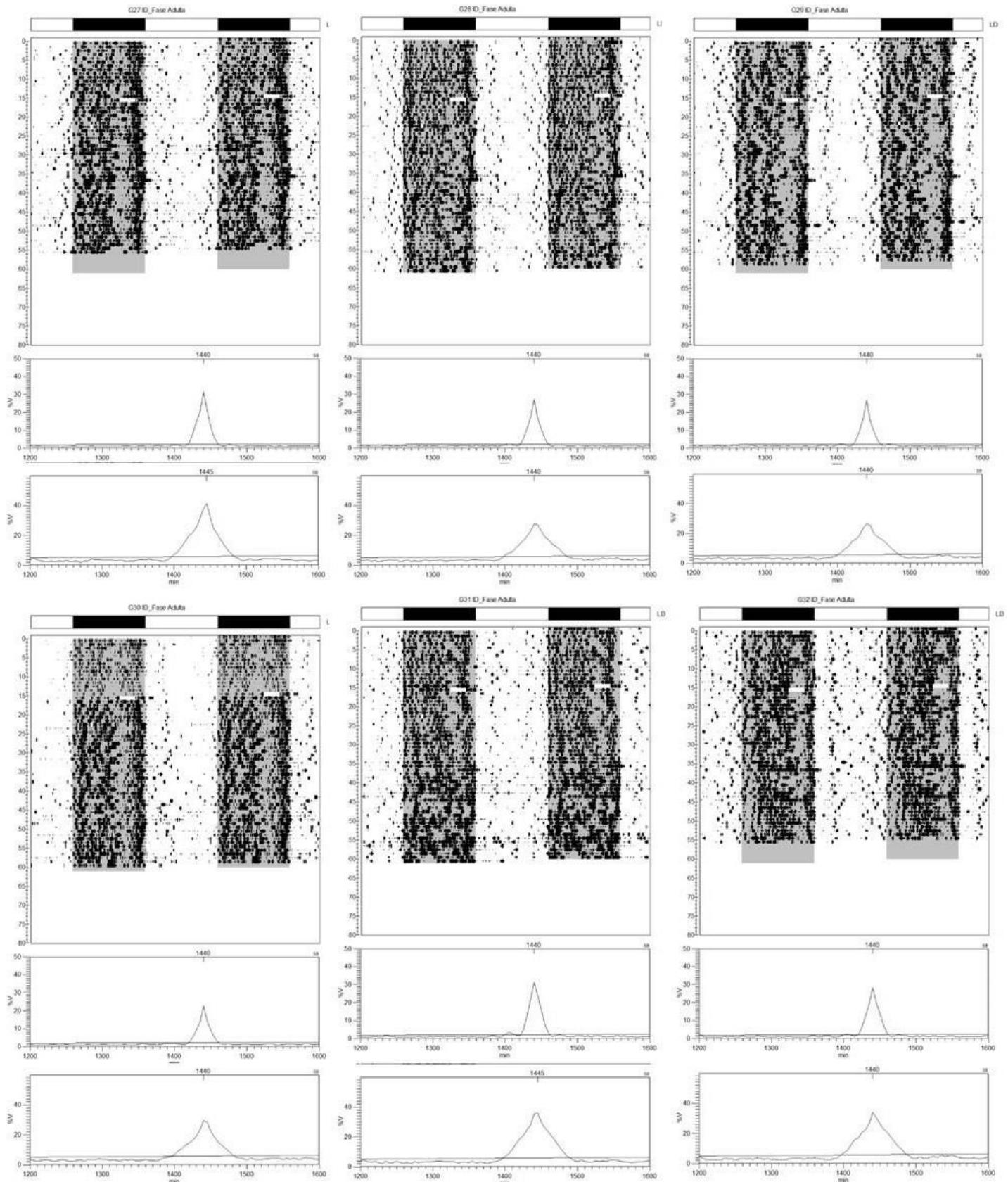
ANEXO L: GRUPO CONTROLE (FASE ADULTA)

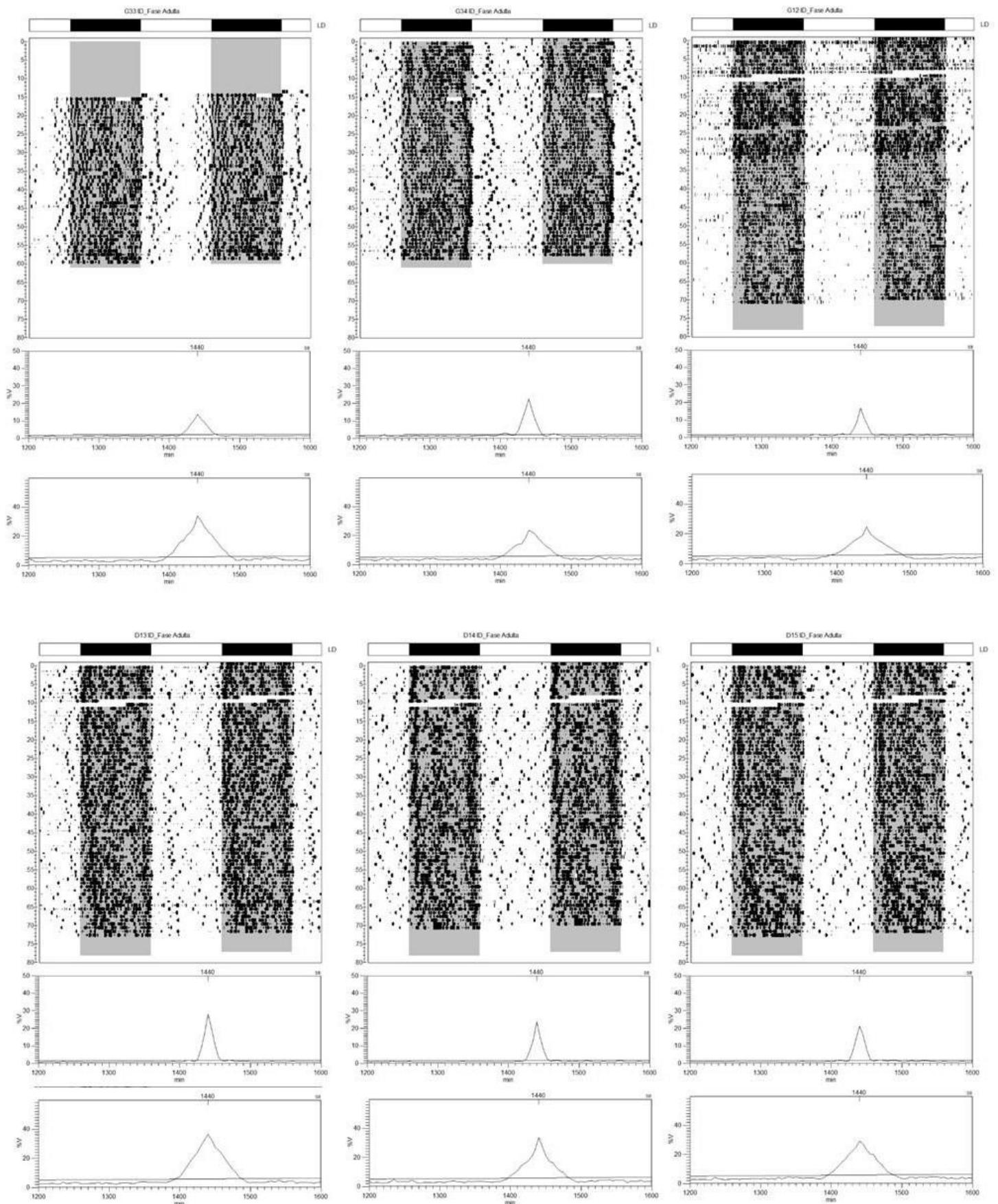




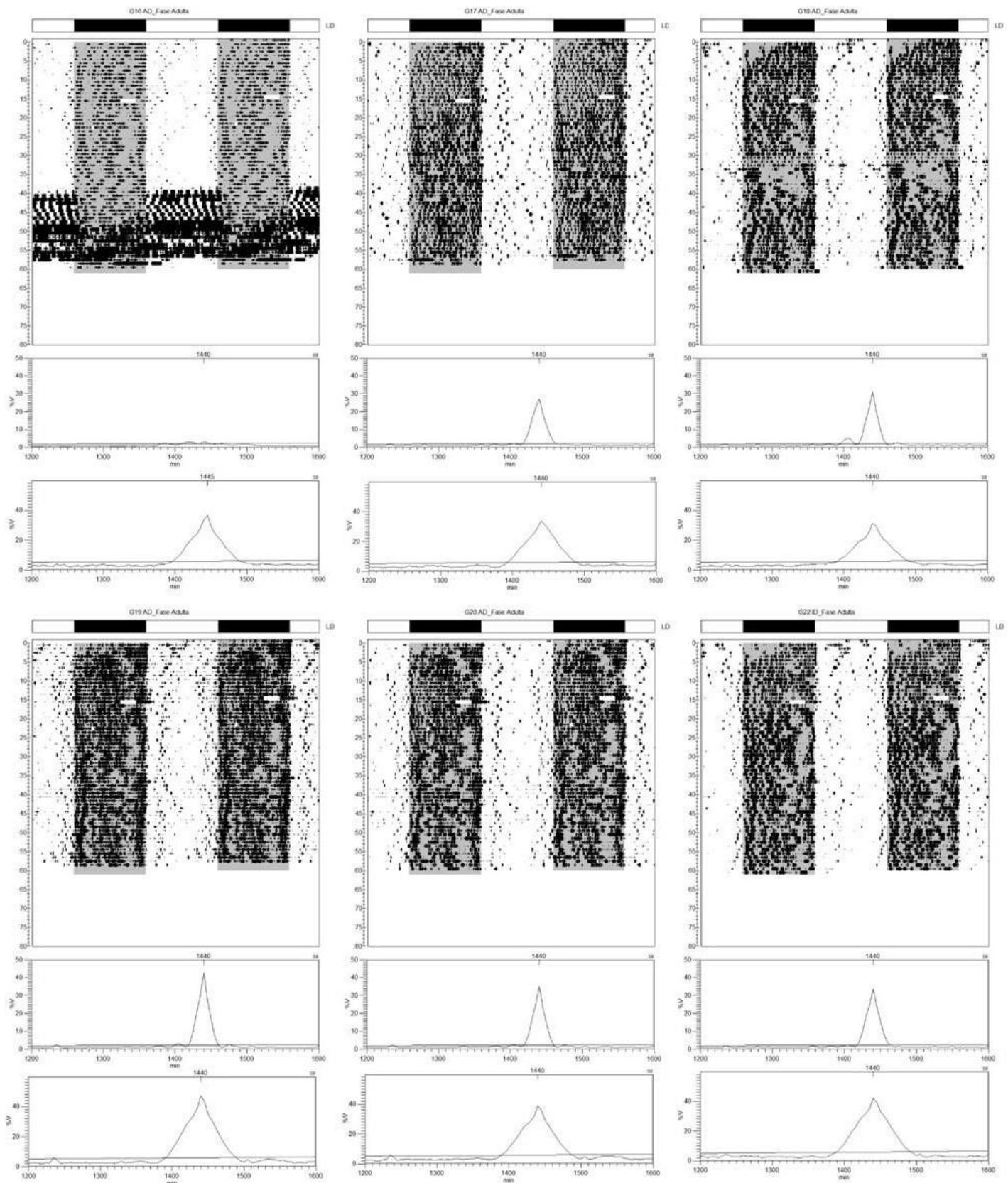


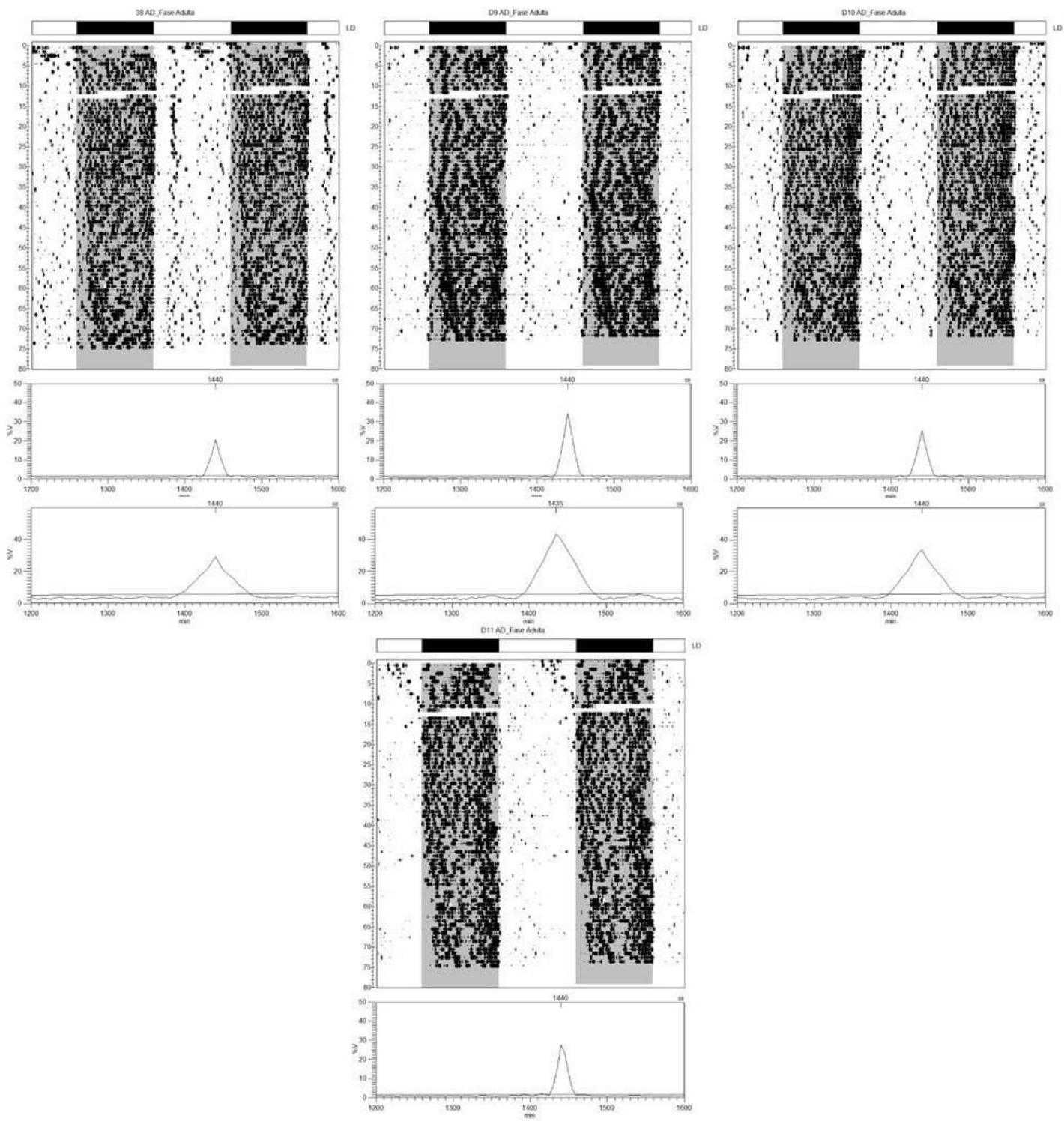
ANEXO M: GRUPO INFÂNCIA D (FASE ADULTA)





ANEXO N: GRUPO ADOLESCÊNCIA D (FASE ADULTA)





ANEXO O: CEUA



Universidade
Federal da
Paraíba

Comissão de Ética no
Uso de Animais

Rectoria



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

Islania Gisela A. Gonçalves

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