



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



**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**

Jeane Constantino Pereira

João Pessoa, PB

Março de 2017

Jeane Constantino Pereira

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 apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociência Cognitiva e Comportamento na Universidade Federal da Paraíba, em defesa do grau de mestre em Neurociência Cognitiva e Comportamento, na linha de pesquisa: psicobiologia: Processos Psicológicos Básicos e Neuropsicologia, sob orientação do Prof. Dr. Flávio Freitas Barbosa e co-orientação da Prof. Dr^a. Crhistiane Andressa da Silva.

João Pessoa, PB

Março de 2017

P436d Pereira, Jeane Constantino.

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 / Jeane Constantino Pereira. - João Pessoa, 2017.

62 f.: il. -

Orientador: Flávio Freitas Barbosa.

Coorientadora: Crhistiane Andressa da Silva.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/ CCHLA

1. Neurociência cognitiva. 2. Ansiedade. 3. Ritmo circadiano. 4. Memória aversiva. I. Título.

UFPB/BC

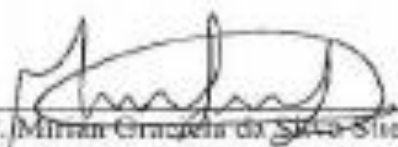
CDU:159.9:612.8 (043)

Título: 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

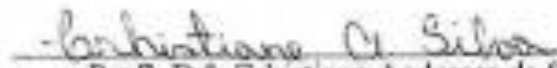
Autor: Jeane Constantino Pereira

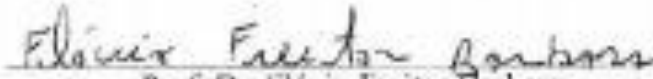
Data da defesa: 31 de Março de 2017.

Banca Examinadora:


Prof. Dr. Milton Graciele da Silva-Siebbe Salvadori
Universidade Federal da Paraíba (Membro Interno)


Prof. Dr. Marie André Leonadio Miguel
Universidade Federal do Rio Grande do Norte (Membro Externo)


Prof. Dr. Christiane Andressa da Silva
Universidade Federal de Pernambuco (Co-orientadora)


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

**João Pessoa, PB
Março de 2017**

Se o cérebro humano fosse tão simples que pudéssemos entendê-lo, seríamos tão simples que não o entenderíamos.

Lyall Watson

Dedico este trabalho aos meus queridos orientadores, Flávio e Crhistiane, por me inspirarem e ajudarem em todos os momentos. Sem vocês, nada disto seria possível. Dedico, em especial, à memória da minha avó Maria Margarida, que partiu antes que eu pudesse concluir este trabalho, mas que com toda certeza, onde quer que esteja, está muito feliz em ver a primeira mestra da família.

AGRADECIMENTOS

E após 2 anos de muito sonho, luta e conquistas finalmente chegou o dia tão esperado, aquele em que irei me tornar mestra em Neurociência Cognitiva e Comportamento. Agradeço primeiramente a Deus, por ter me sustentado nos momentos difíceis e também me proporcionado inúmeras alegrias ao longo desse percurso.

Agradeço de forma especial aos meus pais que tanto amo, Josinaldo e Luzia, pessoas simples e batalhadoras, que não tiveram as mesmas oportunidades que eu tive, porém nunca mediram esforços para que eu pudesse estudar e ir em busca dos meus sonhos. O amor que lhes tenho é eterno e a minha maior realização é vê-los felizes.

O mesmo carinho vai para o meu irmão Matheus, que sempre me incentivou e me apoiou em todos os momentos. Te amo, irmão. Obrigada à todos da família Constantino e Pereira. Tenho muito orgulho de fazer parte dessas duas famílias.

Muito obrigada, Prof. Flávio e Crhis, por terem me acolhido no Laboratório de Estudos de Memória e Cognição - LEMCOG e compartilhado comigo todos os ensinamentos que hoje fazem parte deste trabalho. Vocês são referenciais para mim. Agradeço de forma especial à Crhis e sua família, por terem me recebido tão bem em sua casa quando precisei ir à UFRN. Dona Margarete e Adelvina, meu muito obrigada!

Não poderia deixar de agradecer a todos que fazem parte do LEMCOG, principalmente à “turma da Crono”: Paulo, Karen, Kathlyn e Laís; este trabalho não teria sido possível sem a ajuda de cada um de vocês.

Aos colegas da turma do mestrado, Ingrid e Michele, por terem sido pessoas fundamentais nesta conquista. Em especial, Kathlyn por toda parceria e Augustta por ter sido um dos melhores presentes que o mestrado poderia me proporcionar. Espero que a nossa amizade seja eterna.

À Prof^a. Dr^a. Rhowena Matos, da Universidade Federal de Pernambuco e à Universidade Federal do Rio Grande do Norte, nas pessoas do Prof^o. Dr. John Fontenele e do Prof^o. Dr. Marconi Rodrigues, grata pelas colaborações neste estudo.

À Dona Solange, por toda ajuda com os cuidados e manutenção do biotério, além dos inúmeros ensinamentos e conversas. Aos animais utilizados neste estudo também gostaria de deixar o meu respeito e gratidão.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPQ, Fundação de Amparo à Pesquisa da Paraíba – FAPESP/PB, pelo apoio financeiro.

Gostaria de agradecer também a todos os amigos que sempre estiveram disponíveis para me ouvir e incentivar durante os momentos mais difíceis: Yokiny (sua amizade é muito importante para mim), Ericka, Ingrid, Afonso, Darlene, Daviana, Girlan, Manassés, Tarcísio e família, Thaisinha e, na etapa final, Rubens. À vocês, meu muito obrigada.

De forma especial, toda minha gratidão à Roberta e Ed´Cleber, meus colegas de apartamento e irmãos de alma. Obrigada por todos os momentos vividos e por toda a paciência. Amo vocês.

Gratidão aos professores pelas lições e aprendizado construído. Em especial, ao meu querido mestre Prof.Dailton Alencar, que me orientou durante a graduação e continuou me incentivando ao longo do mestrado. Gratidão, mestre Dailton!

À todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste estudo, meu muito obrigada!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Ritmicidade Biológica.....	1
1.2 Sistema de Temporização Circadiano (STC)	3
1.3 Ontogênese da Ritmicidade Circadiana	5
1.4 Dessincronização Forçada.....	8
1.5 Ansiedade e Memória Aversiva em Modelos Animais	10
2. JUSTIFICATIVA.....	13
3. OBJETIVOS	14
3.1 Objetivo Geral.....	14
3.2 Objetivos Específicos	14
4. HIPÓTESES E PREDIÇÕES	15
5. MATERIAIS E MÉTODO	16
5.1 Animais	16
5.2 Delineamento Experimental.....	17
5.3 Procedimentos Experimentais	18
5.3.1 Teste de Campo Aberto (CA).....	18
5.3.2 Teste de Esquiva Passiva (EP).....	19
5.4 Coleta e Análise dos Dados de Atividade Locomotora	20
5.5 Procedimentos Estatísticos	21
6. RESULTADOS.....	22
6.1 Parâmetros Comportamentais.....	22
6.1.1 Campo Aberto (CA).....	22
6.1.2 Esquiva Passiva (EP)	24
6.1.3 Dados de Atividade Locomotora	25
7. DISCUSSÃO	36
8. CONCLUSÃO	39
9. REFERÊNCIAS	40
10. ANEXOS	48
10.1 Artigo para submissão	48
10.2 Certidão do CEUA.....	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema do Sistema de Temporização Circadiano	2
Figura 2. Representação simplificada da organização estrutural dos Núcleos Supraquiasmáticos (NSQs) em mamíferos.....	3
Figura 3. Organização esquemática das vias aferentes do Sistema de Temporização circadiano.	5
Figura 4. Actograma de um rato submetido a um ciclo claro-escuro de 22h (11:11) duplamente plotado, no qual cada linha representa dois dias.....	10
Figura 5. Caixa de madeira para controle do ciclo claro-escuro.	16
Figura 6. Descrição do Delineamento Experimental.....	17
Figura 7. Arena circular durante a realização do teste de campo aberto.....	18
Figura 8. Rato durante o teste de Esquiva Passiva em cima da plataforma de madeira.....	20
Figura 9. Distância total percorrida no Teste de Campo Aberto	22
Figura 10. Velocidade média percorrida entre os grupos na tarefa de Campo Aberto...	22
Figura 11. Medida comportamental de ansiedade thigmotaxis máximo (A) e mínimo (B) entre os grupos na tarefa de Campo Aberto	23
Figura 12. Exemplos das representações gráficas das áreas de maior permanência do animal durante o teste de CA:	23
Figura 13. Latência de descida da plataforma durante o teste de Esquiva Passiva para memória de curto prazo	24
Figura 14. Latência de descida da plataforma durante o teste de Esquiva Passiva para memória de longo prazo	25
Figura 15. Actogramas plotados duplamente e periodogramas (Sokolove-Bushell) dos animais em T22 que realizaram a tarefa na noite de não-coincidência.....	26
Figura 16. Actogramas plotados duplamente e periodogramas (Sokolove-Bushell) dos animais em T22 que realizaram a tarefa na noite de coincidência.....	29
Figura 17. Actogramas plotados duplamente e periodogramas (Sokolove-Bushell) dos animais em T24.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

NSQs – NÚCLEOS SUPRAQUIASMÁTICOS

STC – SISTEMA DE TEMPORIZAÇÃO CIRCADIANO

TRH – TRACTO RETINOHIPOTALÂMICO

GABA–GAMMA-AMINO BUTYRIC ACID

VIP – PEPTÍDEO INTESTINAL VASOATIVO

TGH – TRACTO GENICULOHIPOTALÂMICO

SCD - SISTEMA CEREBRAL DE DEFESA

SIC - SISTEMA DE INIBIÇÃO COMPORTAMENTAL

CA – CAMPO ABERTO

EP – ESQUIVA PASSIVA

CE – CLARO-ESCURO

T– PERÍODO

UFRN – UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE

ANOVA – ANÁLISE DE VARIÂNCIA , DO INGLÊS “ANALYSIS OF VARIANCE”

UFPB – UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

RESUMO

Introdução: A adolescência é um período crucial do desenvolvimento, no qual o organismo apresenta um alto nível de plasticidade. Na atualidade, adolescentes passam mais tempo ativos e expostos à luz durante a noite reduzindo a quantidade diária de sono. Para investigar os possíveis efeitos dessa condição na ansiedade e memória aversiva, ratos adolescentes passaram pelas tarefas de Campo Aberto (CA) e Esquiva Passiva (EP) estando sob um ciclo claro-escuro (CE) de 22h. **Objetivo:** Avaliar os efeitos de um ciclo CE de 22 h sobre a atividade locomotora de ratos adolescentes e ansiedade e memória aversiva. **Metodologia:** Foram utilizados 44 ratos Wistar machos, divididos em 2 grupos: T24, n=13 (CE 12:12 h) e T22, n=31(CE 11:11 h), que ficaram sob condições controladas de temperatura e umidade, com água e ração à vontade. Os testes aconteceram no meio da fase escura para todos os grupos, porém o grupo T22 foi subdividido em dois grupos que realizaram os testes, respectivamente: no meio da noite de coincidência entre o ambiente e a noite biológica de cada rato do T22 (n=16) e no meio da noite de não-coincidência (n=15). As tarefas de CA e EP foram realizadas quando os animais tinham entre 40 e 60 dias. Todas as sessões foram filmadas para contabilização da distância total percorrida, tempo total, velocidade e índices de ansiedade mínimo e máximo (thigmotaxis) no CA, e latência do tempo de descida da plataforma na EP após 30 min para ambos os grupos e após 24 h (para o grupo T24) e 22 h (para o grupo T22) para avaliação das memórias de curto e longo prazo, respectivamente. A atividade locomotora foi registrada continuamente e totalizada em intervalos de 5 min. Para comparação das médias entre os grupos no teste de CA foi aplicado o teste ANOVA de uma via para amostras independentes e o teste de Kruskal Wallis para a EP. **Resultados:** Os animais do T22 apresentaram dois ritmos circadianos simultâneos na atividade locomotora: um com o mesmo período do ciclo CE e outro que se expressou em livre-curso. Todos os animais do grupo controle sincronizaram ao CE 24h, demonstrando um ritmo estável sincronizado ao CE. Não foram encontradas diferenças no desempenho dos grupos no CA e na EP. **Conclusões:** O ciclo CE de 22 h promove dissociação no ritmo circadiano de atividade locomotora sem alterar os níveis de ansiedade, nem prejudicar a memória aversiva de ratos adolescentes.

Palavras-chave: ritmo circadiano; dessincronização; ansiedade; memória aversiva

ABSTRACT

Introduction: Adolescence is a crucial period of development, in which the body presents a high level of plasticity. At the present time, adolescents spend more time active and exposed to light at night reducing the amount of daily sleep. To investigate the possible effects of this condition on anxiety and aversive memory, adolescent rats underwent the Open Field (OF) and Passive Avoidance (PA) tasks under a 22h EC cycle. **Objective:** To evaluate the effects of a 22h light dark (LD) cycle on the locomotor activity of adolescent rats anxiety and aversive memory. **Methods:** 44 male Wistar rats were divided into two groups: T24, n = 13 (EC 12:12 h) and T22, n = 31 (EC 11:11 h), which were kept under controlled conditions of temperature and humidity, with water and food at will. The tests were performed in the middle of the dark phase for all groups, but the T22 group was subdivided into two groups that performed the tests, respectively: in the middle of the night coincidence between the environment and the biological night of each T22 mouse (n = 16) and in the middle of the night of non-coincidence (n= 15). The OF and PA tasks were performed when the animals had between 40 and 60 days. All sessions were recorded for total distance travelled, total time, velocity and minimum and maximum anxiety indexes (OP), and latency to step down from a platform in PA after 30 min for both groups and after 24 h (For the T24 group) and 22 h (for the T22 group) for evaluation of the short and long term memories, respectively. The locomotor activity was recorded continuously and totalized at 5 min intervals. To compare the means between the groups in the OF test, a 1-way ANOVA was performed for independent samples and the Kruskal Wallis test for PA. **Results:** T22 animals presented two simultaneous circadian rhythms in locomotor activity: one with the same period of the LD cycle and another that was expressed in free-stroke. All animals in the control group synchronized to LD 24h, showing a stable rhythm synchronized to LD. No differences were found in the performance of the groups in the OF and PA. **Conclusions:** The T22h promotes dissociation in the circadian rhythm of locomotor activity without altering the levels of anxiety or impairing the aversive memory of adolescent rats.

Keywords: Circadian rhythm; Desynchronization; Anxiety; Aversive memory

1.INTRODUÇÃO

1.1 Ritmicidade Biológica

Pensar na existência de um tempo “biológico” é compreender que o fluxo temporal é irreversível para a matéria viva (Lestienne, 1988), pois os seres vivos são organismos dinâmicos que sofrem transformações ao longo da vida, seja em escalas de tempo mais longas, como no processo do envelhecimento, ou em escalas periódicas de tempo mais curtas que podem durar meses, dias e horas. Este dinamismo é essencial para a organização temporal das espécies (Bueno & Wey, 2012).

Dentro desse contexto, os processos que ocorrem de maneira cíclica nos seres vivos são denominados ritmos biológicos. Eles têm como propriedades clássicas: origem endógena; podem ser sincronizados por um ciclo ambiental; e apresentam compensação às variações de temperatura (Araújo & Marques, 2002).

A expressão endógena da ritmicidade biológica permite que o organismo se antecipe diante de mudanças do meio interno e/ou externo procedendo a transições de forma gradual (Pittendrigh, 1960). A integração entre esses ritmos, que são gerados endogenamente, é sugerida como uma provável característica adaptativa que permite ao organismo a possibilidade de se ajustar aos ciclos ambientais (Marques & Menna-Barreto, 1997).

Devido aos diferentes períodos dos ritmos biológicos, Halberg (1959) propôs um sistema de classificação de acordo com a frequência dos mesmos. Assim, os ritmos que apresentam um ciclo recorrendo com período superior a 28 horas, como, por exemplo, o ciclo menstrual da mulher, foram chamados infradianos; os que apresentam 1 ciclo recorrendo com período inferior a 20 horas, como a frequência cardíaca, foram denominados ultradianos; e finalmente, foram denominados circadianos os ritmos com períodos aproximados a 24 horas, tal como a concentração de cortisol sérico, que apresenta seu pico nas primeiras horas da manhã e cai ao longo do dia.

De acordo com Pittendrigh (1965), a periodicidade diária do ciclo claro/escuro teria sido o principal fator para o surgimento de oscilações circadianas. Com isso, a variação da luminosidade ao longo das 24 horas é considerada o principal agente arrastador, isto é, capaz de sincronizar os ritmos circadianos ao ambiente externo.

Contudo, a ritmicidade circadiana também pode ser sincronizada por outros estímulos ambientais, tais como: ciclos geofísicos, disponibilidade de alimentos, ou

mesmo os determinados por organizações sociais. A esses fatores capazes de provocar alterações na ordem temporal interna dos organismos denomina-se *zeitgeber*, neologismo alemão que significa doador de tempo (Aschoff, 1951). Outros pesquisadores também deixaram suas contribuições para estes termos sendo que Pittendrigh (1960) os intitulou “agentes arrastadores” e Halberg (1960), “sincronizadores”.

A sincronização ao ambiente externo pode ocorrer por dois mecanismos: arrastamento e mascaramento. O mecanismo do arrastamento acontece quando o ritmo é sincronizado por um ciclo ambiental capaz de deslocar periodicamente a fase do oscilador, ajustando-o e impondo sobre ele seu período e fase. Porém, só irá ocorrer se o período do *zeitgeber* for próximo ao do ritmo endógeno (Pittendrigh & Daan, 1976; Moore-Ede, Sulzman, & Fuller, 1982; Marques & Menna-Barreto, 1997).

O mascaramento, por sua vez, ocorre quando pistas ambientais conseguem sincronizar e/ou alterar diretamente a expressão do ritmo, sem provocar alterações no oscilador. Como não há uma atuação direta sobre o oscilador, quando o estímulo é retirado, o ritmo continua a ser expresso em uma fase determinada pelo oscilador endógeno (Moore-Ede *et al.*, 1982; Aschoff, 1988; Mrosovsky, 1999). A figura 1 é uma representação genérica desses dois eventos.

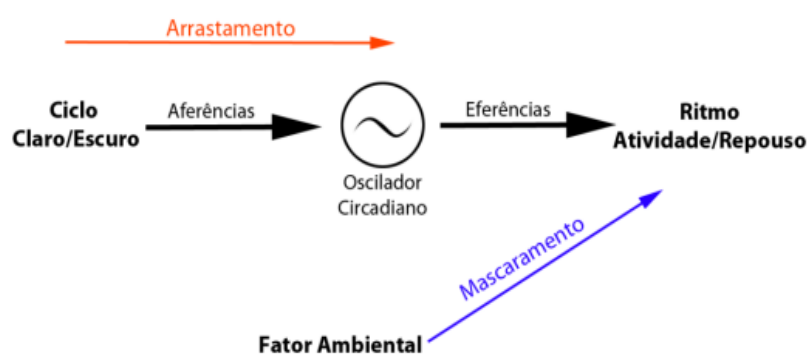


Figura 1. Esquema do Sistema de Temporização Circadiano. Quando o ritmo está sincronizado, este irá expressar o mesmo período do *zeitgeber*. Desta forma, a sincronização pode ocorrer por arrastamento (com atuação direta do *zeitgeber* sobre o oscilador circadiano) ou por mascaramento (atuação direta do *zeitgeber* sobre o ritmo)(Retirado de Tomotani & Oda, 2012).

Na ausência de estímulos que possam marcar a contagem do tempo, como no caso de animais que vivem em cavernas ou condições controladas em laboratório, os

ritmos circadianos permanecem e tendem a exibir períodos diferentes de 24 horas, sendo chamados de “ritmos em livre-curso” (Moore & Lenn, 1972).

A ritmicidade circadiana ocorre devido ao trabalho sincronizado de uma série de estruturas, dentre elas os “osciladores”. Essa capacidade oscilatória circadiana é oriunda da expressão rítmica diária de proteínas codificadas pelos chamados “genes do relógio” (Lima & Vargas, 2014), que integram o Sistema de Temporização Circadiano (STC).

1.2 Sistema de Temporização Circadiano (STC)

Como foi visto, os ritmos circadianos são gerados e sincronizados pelo sistema de temporização circadiano (STC). Em mamíferos, este sistema é formado por uma rede de osciladores centrais que atuam integrados ou acoplados e que são formados pelos Núcleos Supraquiasmáticos (NSQs) (Moore e Lenn, 1972) e por osciladores periféricos formado pelos órgãos como coração, rins, fígado, entre outros. (Dunlap, Loros & Decoursey, 2004).

Em diversas espécies de mamíferos estudados, os NSQs correspondem a uma estrutura bilateral, localizada na porção ventral do hipotálamo anterior (Van Gelder, 2004). Os NSQs expressam vários peptídeos neuroativos, de tal forma que na região ventrolateral, também chamada de “cerne” ou “*core*” (Figura 2) foi identificada a presença de vasopressina, arginina e calretinina, enquanto a região dorsomedial, também conhecida por “casca” ou “*shell*”, foi caracterizada pela presença do peptídeo intestinal vasoativo (VIP). O neurotransmissor GABA está presente na maioria dos neurônios do NSQ (Moore, 1983; Van Gelder, 2004).

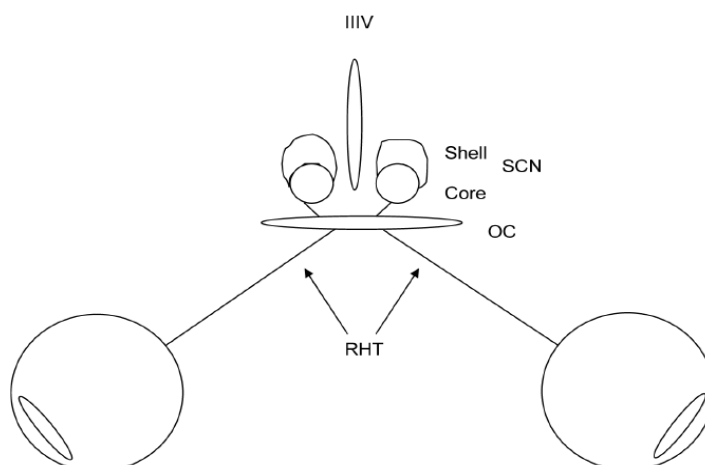


Figura 2. Representação simplificada da organização estrutural dos Núcleos Supraquiasmáticos (NSQs) em mamíferos. Os mesmos estão localizados acima do quiasma óptico na região anterior do hipotálamo, sendo formados por duas regiões: a ventrolateral, também chamada de “cerne” ou “core” e a região dorsomedial, também conhecida por “casca” ou “shell”. O trato retino-hipotalâmico (TRH) conecta um subconjunto de células do gânglio retinal para os NSQs. IIIV refere-se ao terceiro ventrículo (Retirado de Van Gelder, 2004).

Em roedores, os NSQs são compostos por cerca de 20.000 neurônios. Estes neurônios atuam como seus próprios osciladores circadianos e são mutuamente sincronizados (Welsh, 1995). Entretanto, para que ocorra a sincronização do STC é preciso que tanto as informações fóticas quanto não-fóticas cheguem até os neurônios do NSQs, podendo ocorrer através de 3 vias principais: Tracto Retinohipotalâmico (TRH), Tracto Geniculohipotalâmico (TGH) ou pelas projeções serotoninérgicas das células da rafe (Figura 3).

O TRH é a principal via de sincronização fótica dos ritmos circadianos (Moore & Lenn, 1972), enviando informações oriundas da camada de células ganglionares da retina até os NSQs, sendo o glutamato seu principal neurotransmissor juntamente com o GABA (Ralph & Menaker, 1989). A segunda via é o TGH, que é formado pelas projeções retinianas dos neurônios do folheto intergeniculado (FIG) (Hickey & Spear, 1976) e está relacionado com a modulação dos estímulos fóticos e não fóticos. O neurotransmissor mais importante envolvido é o NPY. Assim, os neurônios do NSQ recebem informações a respeito da luminosidade ambiental diretamente da retina e de forma indireta através do TGH. A existência dessa via foi confirmada anatomicamente em ratos (Moore & Card, 1994).

A terceira via que envia aferências para os NSQs é composta por projeções serotoninérgicas das células da rafe, contudo seu papel não está totalmente evidenciado. Acredita-se que esteja relacionada com a modulação dos efeitos da luz, além da participação na modulação de estímulos não fóticos (Moore *et al.*, 1978; Smale *et al.*, 1990).

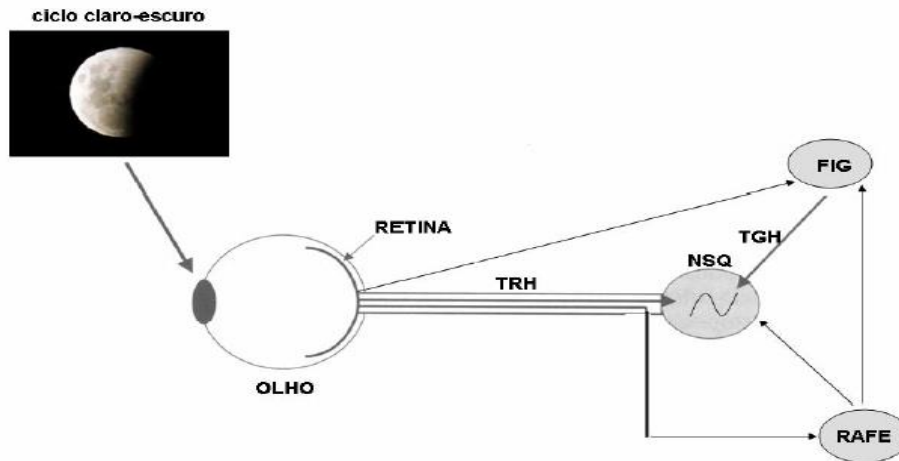


Figura 3. Organização esquemática das vias aferentes do Sistema de Temporização circadiano. O ciclo claro-escuro é detectado pelas células ganglionares da retina, onde o estímulo luminoso é enviado para o NSQ por duas vias principais: o tracto retinohipotalâmico (TRH) que conecta de forma direta a retina ao NSQ e pelo tracto geniculohipotalâmico (TGH) que de forma indireta conecta a retina ao folheto intergeniculado (FIG) e em seguida ao NSQ. A terceira via une a retina com a rafe (demonstrada em algumas espécies), que conecta-se ao FIG e ao NSQ. Adaptado por Pinato (2007) de Sehgal (2004).

Além dos NSQs, outras regiões também estão envolvidas na expressão da ritmicidade endógena, são os chamados osciladores periféricos (Lima & Vargas, 2014). A alimentação, por exemplo, é um dos principais sincronizadores periféricos, sem, contudo, provocar alterações no oscilador central (Stokkanet *al.*, 2001). O Tracto Retinohipotalâmico possui vias eferentes que são capazes de sincronizar os relógios periféricos, o que permite controlar as diversas funções fisiológicas ao longo do dia. (Buijs & Kalsbeek, 2001).

Por fim, esse sistema sofre mudanças ao longo do desenvolvimento do organismo, portanto, se faz necessário, conhecer um pouco da ontogênese da ritmicidade circadiana.

1.3 Ontogênese da ritmicidade circadiana

O ser humano não nasce com todos os ritmos circadianos marcados. O sistema de temporização circadiano passa por mudanças que vão desde a vida intra-uterina até o envelhecimento. Da mesma forma, os ciclos geofísicos sincronizadores destes ritmos são dinâmicos, fazendo com que o conhecimento da ontogênese da ritmicidade

possibilite uma melhor compreensão da contagem do tempo biológico por esse sistema (Menna-Barreto & Wey, 2007).

Rivkees (2004) identificou que a neurogênese dos NSQs de primatas inicia entre 27 e 48 dias do feto, sendo as oscilações rítmicas da atividade metabólica visíveis no final da gestação e a capacidade de ajuste ao ciclo claro-escuro já está presente logo após o nascimento (Rivkees & Hao, 2000). Em ratos, ao nível celular, o primeiro aparecimento da ritmicidade circadiana foi detectado em células diferenciadas, multipotentes derivadas de células-tronco embrionárias (Kowalska *et al.*, 2010; Yagita *et al.*, 2010).

A ontogênese do sistema de temporização circadiano de ratos é alvo de muitos pesquisadores, sendo o melhor STC caracterizado atualmente. Os principais achados revelaram que os estímulos ambientais podem influenciar a organização estrutural do STC ao longo do desenvolvimento, podendo repercutir na ritmicidade circadiana do animal adulto (Bueno & Wey, 2012).

Partindo do período pré-natal, foi visto que os neurônios dos NSQs são formados por algumassinapses. A sinaptogênese progride lentamente em torno do nascimento aumentando significativamente a partir de 4 a 10 dias pós-parto (Moore, 1991).

O surgimento dos primeiros ritmos significativos na expressão dos genes do relógio dentro de uma população de neurônios do NSQ de ratos prossegue em paralelo com o desenvolvimento dessa estrutura (Kováčiková *et al.*, 2006).

A utilização do método de captação de C – desoxiglicose demonstrou que na fase intrauterina os NSQs já apresentam oscilação, sendo o padrão rítmico controlado pelo sistema de temporização materno (El-Henmany *et al.*, 2008).

Já os osciladores periféricos precisam da maturação dos órgãos-alvo para se desenvolverem, bem como da organização molecular dos osciladores. A primeira aparição destes pode ser, portanto, altamente órgão-específica da espécie. Dentro do fígado de rato, ritmos na expressão dos genes do relógio podem começar a partir do 2º dia de nascimento e se desenvolve ainda mais do 10º até o 20º dia (Sládek *et al.*, 2004).

Nos roedores, durante a fase de lactação a mãe deixa o ninho durante a maior parte da noite para forragear (Viswanathan, 1999) permanecendo no ninho durante o dia para fazer contato com os filhotes, aquece-los e alimentá-los. Com isso, contato social, temperatura e alimentação são apresentados aos filhotes ritmicamente podendo arrastar seu sistema de temporização circadiano. Dessa forma, estudos sugerem que a principal

função do arrastamento materno durante a fase pós-natal precoce seria a manutenção da ritmicidade estabelecida durante a fase intrauterina (Sumova *et al.*, 2012).

Em linhas gerais, após o nascimento o organismo dos mamíferos precisa se adaptar às mudanças, sobretudo dos sinais temporais. Com o passar dos dias, a mãe já não irá atuar como principal sincronizador dos ritmos circadianos e o sistema de temporização ainda imaturo precisa se ajustar às novas condições (Menna-Barreto & Wey, 2007).

Desta forma, do 16º ao 20º dia pós-natal, os filhotes de rato já abrem os olhos e começam a ser parcialmente independentes de suas mães. Logo, o oscilador central do filhote começa a ser arrastado por estímulos fóticos ao mesmo tempo em que começa a controlar relógios periféricos. Além disso, os filhotes começam gradualmente a forragear durante a noite e as oscilações moleculares dos relógios periféricos mudam em conformidade (Sumova *et al.*, 2006).

Entre o 20º e o 28º dia pós-natal, os filhotes de rato se tornam completamente independentes de suas mães e o arrastamento materno acaba. Da mesma forma que em ratos adultos, o NSQ é arrastado predominantemente por pistas fóticas e os relógios periféricos pela alimentação noturna (Sumova *et al.*, 2006).

Com o envelhecimento é notável uma diminuição da funcionalidade do sistema circadiano. Em ratos idosos foi observada uma diminuição da resposta a estímulos não-fóticos, sendo este resultado explicado por um provável acoplamento fraco entre o ciclo de atividade/repouso e o sistema circadiano devido a um déficit funcional nas vias serotoninérgicas, que medeiam os estímulos fóticos e não-fóticos sobre o sistema (Van Reeth *et al.*, 1992).

A realização de um transplante do NSQ fetal para ratos idosos mostrou que estes animais conseguiram restaurar os seus ritmos circadianos de temperatura central, atividade locomotora, ingestão de líquidos (Li & Satinoff, 1998) e de RNAm em células hipotalâmicas (Cai *et al.*, 1997).

Em camundongos de meia idade, foi identificada uma diminuição na amplitude e aumento na variação da taxa de disparos de neurônios isolados dos NSQs, o que sugere que as mudanças ao longo da ontogênese podem acontecer em células individuais e comprometer o acoplamento entre os osciladores (Aujard, Herzog & Block, 2001).

Em humanos, o envelhecimento está associado a uma perda de densidade e arborização dendrítica das células ganglionares da retina que expressam melanopsina, o

que poderia está relacionado com a maior frequência de distúrbios do ritmo circadiano em idosos (Esquiva *et al*, 2017).

Esse déficit funcional no acoplamento dos osciladores do STC durante o envelhecimento, dentre outros problemas, interfere na qualidade do sono dos idosos evidenciando que o aumento nos despertares antecipados e a dificuldade em manter o sono podem ser decorrentes de uma incapacidade em manter o ciclo vigília-sono em uma fase específica do ritmo circadiano (Dyffy & Czeisler, 2002).

De forma geral, o processo da senescência normal causa uma perda funcional no STC que pode acarretar: um sono fragmentado com a predominância de cochilo, sonolência e fadiga diurna, mudanças na fase do sono com uma maior tendência a deitar e levantar cedo e alterações nos sincronizadores sociais, promovendo dificuldade no ajuste entre o STC e os sincronizadores sociais (Geibet *al.*, 2003).

Além das perdas funcionais decorrentes do processo de envelhecimento, o funcionamento adequado do STC pode ser prejudicado por outras condições, tais como: deslocamentos de fase (Arbleet *al.*, 2010), presença de luz à noite (Fonken& Nelson, 2011) ou mesmo a exposição de ratos, em laboratório, a ciclos com períodos menores que 24 h (Cambraset *al.*, 2007) levando o STC a um estado de dessincronização interna.

1.4 Dessincronizaçãoforçada

O ser humano, assim como o rato, possui um período circadiano (τ) com duração média um pouco maior que 24 horas (Czeisler& Wright, 1999). O mesmo é arrastado por pistas ambientais, sendo o principal *zeitgeber* o ciclo claro-escuro. Sabendo que o STC consiste em um conjunto de osciladores que deve trabalhar em harmonia para seu funcionamento ótimo, há evidências da existência de um mecanismo interno de acoplamento entre os osciladores que geram os ritmos circadianos (Marques & Menna-Barreto, 1997).

A organização temporal externa também deve ser considerada como uma fonte de estímulos que, após a interação com o organismo, completam o ambiente temporal que é necessário para o arrastamento do sistema circadiano. É assim que é finalizada a expressão de todos os ritmos que constituem a ordem temporal interna (Luiz Menna-Barreto & Antoni Díez-Noguera, 2011).

Com isso, quando o grau de acoplamento dos osciladores for alto, estes apresentarão um ângulo de fase estável gerando um único ritmo, porém se os osciladores estiverem desacoplados, conseqüentemente outros padrões podem ser gerados (Vilaplana *et al.*, 1997).

Dessa forma, vale salientar que quando existe uma relação oposta entre a fase do sincronizador e a expressão do ritmo circadiano, como, por exemplo, os trabalhadores em turnos, ocorre uma dessincronização externa que por sua vez também acarreta uma dessincronização interna dos ritmos (Marques & Menna-Barreto, 1997).

Um dos modelos mais utilizados para promover a dessincronização forçada interna em ratos é o T22. O mesmo consiste na manutenção de um ciclo claro-escuro simétrico com período de 22 h, ou seja, cada fase com duração de 11h. Ratos mantidos sob essa condição de iluminação expressam dois componentes circadianos simultâneos no ritmo da atividade locomotora, com períodos diferentes. Um componente é arrastado pelo ciclo claro-escuro externo, nomeado componente sincronizado à luz, enquanto o outro ocorre em livre-curso com um período superior a 24 h, nomeado componente não sincronizado à luz (Campuzano *et al.*, 1998).

Por possuírem períodos distintos, esses ritmos acabam tendo quatro momentos importantes (Figura 4): A - dia de coincidência, quando o dia biológico do rato coincide com o dia do ciclo CE (fase de claro); B - noite de coincidência, quando a noite biológica do rato coincide com a noite do ciclo CE (fase de escuro); C- dia de não coincidência, quando a noite biológica do rato coincide com o dia do ciclo CE (fase de claro); e D- noite de não coincidência, quando o dia biológico do rato coincide com a noite do ciclo CE (fase de escuro) (de La Iglesia *et al.*, 2004).

De La Iglesia *et al.* (2004) observaram que as regiões dorsomedial e ventrolateral do NSQ se desacoplam em dias e noites de não coincidência, identificando que a região ventrolateral sincroniza às pistas ambientais e a região dorsomedial expressa o ritmo endógeno do animal. No entanto, não se pode excluir totalmente a hipótese de que a dessincronização interna, tanto neste modelo quanto em outros modelos, pode envolver dissociação entre os NSQs e osciladores periféricos. Não se sabe ainda se a dessincronização interna espontânea e a forçada de ritmos fisiológicos e comportamentais observada em seres humanos também representa a atividade de dois osciladores independentes e, se isso acontece, se é possível identificar estas estruturas anatomicamente (Cambras *et al.*, 2007).

Contudo, o que se sabe até então é que condições capazes de alterar o funcionamento adequado do sistema circadiano como, por exemplo, o trabalho em turnos, induzem a ruptura da sincronia entre o oscilador central e os periféricos acarretando doenças como: insônia, distúrbios cardiovasculares e gastrointestinais, depressão, obesidade, estresse, ansiedade, diabetes, desregulação dos ritmos metabólicos e endócrinos, esterilidade, e até mesmo algumas formas de câncer (Stokkanet *et al.*, 2001; Haus&Smolensky, 2006; Salgado-Delgado *et al.*, 2008).

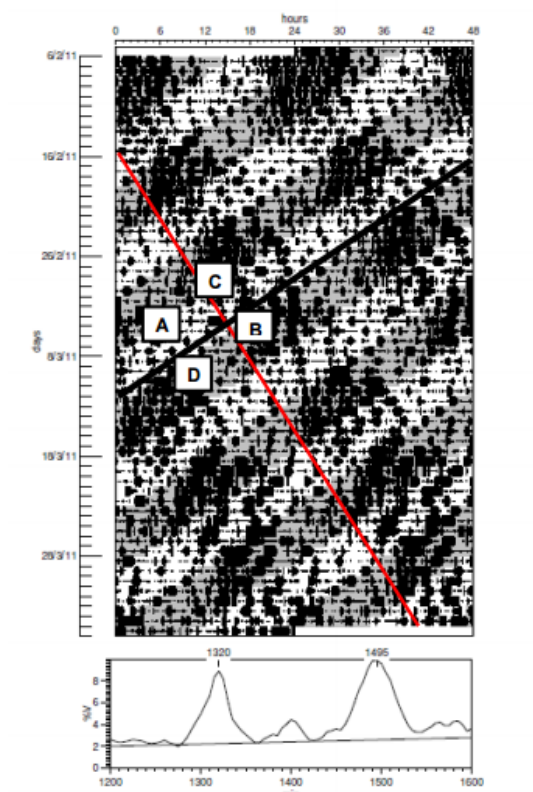


Figura 4. Actograma de um rato submetido a um ciclo claro-escuro de 22h (11:11) duplamente plotado, no qual cada linha representa dois dias. Pode-se observar a expressão de dois componentes rítmicos na atividade locomotora: um deles está sincronizado com o T22 e outro encontra-se em livre curso, manifestando um período maior que 24h ($T > 24$), apontado pela linha em vermelho. As letras A,B, C e D demonstram as 4 diferentes fases que foram descritas anteriormente no texto. Retirado de Koike (2013).00

1.5 Ansiedade e memória aversiva em modelos animais

Estudos mostram que a perturbação do ritmo circadiano pode estar relacionada com os distúrbios emocionais, pois as mudanças nos fotoperíodos alteram muitos dos

processos fisiológicos como a atividade de neurotransmissores, níveis hormonais, atividade metabólica, entre outros (Walton, Weil & Nelson, 2011).

Assim, um distúrbio emocional bastante frequente nos dias atuais é a ansiedade. A mesma é caracterizada por um sinal de alerta mediante um perigo iminente, com o intuito de capacitar o indivíduo para lidar com uma ameaça (Polanczyk & Lamberte, 2012; Sadock & Sadock, 2010). Seu processamento neurofisiológico indica uma ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), desencadeando sintomas neurovegetativos, tais como: taquicardia, palidez, insônia, tensão muscular, distúrbios intestinais, tremor, tontura, etc. (Mackenzie, 1989; Andrade & Gorenstein, 1998).

Dentro desse contexto, dois sistemas cerebrais estariam envolvidos com as manifestações de ansiedade patológica através da manifestação dos comportamentos de defesa: Sistema Cerebral de Defesa (SCD) e o Sistema de Inibição Comportamental (SIC) (Graeff & Hetem, 2004).

O primeiro compreende um grupo de estruturas nervosas formadas pela: Amígdala, Hipotálamo Medial e Matéria Cinzenta Periaquedutal. Assim, a amígdala compartilha conexões nervosas com o neocórtex e estruturas profundas do sistema límbico, além de exercer o papel de interface sensório-emocional entre elas, por meio da avaliação e classificação do tipo e grau do estímulo, sendo o *feedback* direcionado ao HM e MCP. Desta forma, a amígdala consegue selecionar e organizar as reações comportamentais e fisiológicas de defesa biologicamente ajustadas (Graeff & Hetem, 2004).

O SIC, por sua vez, apresenta como importante substrato neural o sistema septohipocampal. Quando este sistema é ativado por sinais de frustração ou punição, estímulos ameaçadores ou situações novas, provoca respostas inibitórias a qualquer movimento que o animal realize, bem como hipervigilância, hiperatenção e preparo para ação vigorosa (Graeff & Hetem, 2004).

A avaliação das respostas comportamentais e das reações fisiológicas em resposta às situações de perigo eminente são utilizadas como medidas de ansiedade e normalmente demonstram grande correspondência com as medidas ansiogênicas estudadas em humanos (Cruz & Landeira-Fernandez, 2012).

A forte conectividade entre subículo ventral do hipocampo (estrutura chave de saída de informações hipocampais), hipotálamo e amígdala suporta uma forte relação dessa estrutura com a ansiedade. Acredita-se que o papel regulador do subículo é mediado por suas influências inibitórias sobre o Eixo Hipotálamo-hipófise-adrenal

(HPA) (Herman *et al*, 1995). Lesões do subículo ventral do hipocampo provocam déficit de aquisição e processamento do condicionamento pavloviano de medo (Maren, 1999). O estudo de Subhadeep *et al*, 2016 apóia a hipótese de que o subículo ventral do hipocampo estaria envolvido na ansiedade.

Uma das tarefas mais conhecidas é o teste do campo aberto, que pode ser realizado em uma arena circular ou quadrada cercada por paredes de forma que o animal não possa fugir, tendo sido desenvolvido por Hall (1934). O aumento da quantidade de fezes e o deslocamento reduzido indicariam o comportamento do tipo ansioso do animal, bem como uma maior tendência em permanecer nas arestas do campo, tendo em vista que quanto mais ansioso torna-se o animal, menos tempo ele passará no centro do campo.

Estudos com roedores também foram primordiais para o desenvolvimento de testes que buscaram avaliar outra função fundamental para a sobrevivência das espécies: os mecanismos neurobiológicos da memória. Dentre os diferentes tipos de memória, as memórias aversivas merecem destaque por desempenharem um importante papel biológico: a antecipação do organismo ante a situações de perigo iminente; contudo, também podem provocar reações patológicas de medo (Payne *et al.*, 2006).

Tratando-se do processamento da memória aversiva, várias evidências demonstram que o complexo basolateral, formado pelos núcleos lateral, basal e basal-acessório, integrando os estímulos sensoriais e do núcleo central emitiria a resposta aversiva (Roozendaal & McGaugh, 1996; Swanson & Petrovich, 1998).

Em um estudo de revisão da literatura, Albuquerque & Silva (2009) concluíram que se fazem necessárias mais investigações que possam esclarecer se a amígdala realmente desempenha um papel modulador sobre as estruturas relacionadas com a consolidação da memória. As autoras sugerem ainda que a amígdala exerceria um papel chave no aprendizado das emoções, conferindo às espécies vantagens evolutivas.

Em modelos animais, a esquiva passiva (*step-down avoidance*) é um dos testes mais utilizados para avaliar este tipo de memória, representando o aprendizado de um comportamento que adiará um evento aversivo futuro. A tarefa envolve uma sessão de treino e outra de teste, na qual o animal passa pelo evento aversivo e, no teste, se tiver ocorrido a aprendizagem, emitirá um comportamento de evitação ao evento (*step-down avoidance*) que está programado para acontecer (Cruz & Landeira-Fernandez, 2012).

2.JUSTIFICATIVA

A plasticidade sináptica pode provocar mudanças no processamento de informações e na comunicação entre regiões corticais, regulando processos mnemônicos e estados emocionais(Ruggiero *et al.*, 2011).Durante a adolescência, a plasticidade sináptica é capaz de sofrer mudanças incríveis, pois o cérebro adolescente em desenvolvimento é um sistema altamente dinâmico (Casey, 2015).

É durante esta etapa da vida que as conexões entre os diversos circuitos neurais são formadas (Huttenlocher, 1979) para otimizar a cognição do adulto através de uma transição no potencial de aprendizagem das tarefas mais complexas envolvendo funções executivas (Best & Miller, 2010; Selemon, 2013). Essas mudanças podem afetar positivamente ou negativamente, a curto e longo prazo, a saúde psicológica e bem-estar fisiológico dos indivíduos (Aoki, Romeo & Smith, 2017).

O início da puberdade também é marcado pela interrupção transitória de tarefas dependentes do córtex pré-frontal (McGivern *et al.*, 2002), hipocampo e amígdala (Pattwell *et al.*, 2011). É também um período frequentemente associado ao aumento da vulnerabilidade aos distúrbios psicológicos, ansiedade, depressão e uso abusivo de drogas (Casey *et al.*, 2013; Davidson *et al.*, 2015).

A grande plasticidade cerebral durante esta janela do desenvolvimento pode fazer com que alterações se tornem permanentes, conforme foi sugerido no estudo de Albert *et al.*(2013). Os resultados mostraram que os ratos adolescentes apresentaram um único ritmo circadiano na atividade locomotora, cujo período é a resultante de uma integração das mudanças de luz. Como esse efeito não foi observado em ratos adultos, sugere-se uma possível adaptação do sistema circadiano durante a adolescência.

Desta forma, diante da escassez de investigações experimentais e sabendo que a adolescência é uma fase crucial para o desenvolvimento do organismo, este trabalho justifica-se pela necessidade de se compreender melhor a maturação do sistema circadiano durante a adolescência, suas relações com a ansiedade e memória aversiva, tendo em vista que o rato através do modelo de dessincronização forçada poderia representar um único modelo neurologicamente, farmacologicamente e geneticamente intacto para estudar a base neural dos distúrbios afetivos e sua relação com a evolução das desordens circadianas (Ben-Hamo *et al.*, 2016).

3.OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar os efeitos de um ciclo CE de 22 h sobre o ritmo circadiano de atividade locomotora, comportamento do tipo ansioso e memória do tipo aversiva em ratos Wistar adolescentes.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o padrão de atividade locomotora de ratos adolescentes sob ciclo CE de 22h;
- Avaliar o comportamento do tipo ansioso de ratos adolescentes expostos a um ciclo CE de 22h;
- Avaliar os efeitos do ciclo CE de 22h sobre a memória aversiva de curto e longo prazo em ratos adolescentes.

4.HIPÓTESES E PREDIÇÕES

HI - Ratos adolescentes são capazes de sincronizar a ciclos CE com períodos diferentes, mas próximos a 24 h devido a grande plasticidade característica desta fase do desenvolvimento;

PI -Ratos adolescentes conseguem se adaptar a um ciclo CE de 22h apresentando um único ritmo de atividade locomotora;

III – O protocolo de dessincronização interna forçada favorece maiores níveis de ansiedade em ratos adolescentes devido a exposição dos animais a um CE de 22h;

PII - Ratos sob CE de 22h passarão mais tempo nas zonas externas do campo aberto, caracterizando um comportamento do tipo ansioso;

IIII - A exposição dos animais a um ciclo CE de 22h provoca alterações na memória do tipo aversiva de longo e curto prazo de ratos adolescentes;

PIII: Ratos adolescentes apresentarão uma menor latência para descer da plataforma, indicando prejuízos na memória do tipo aversiva de curto e longo prazo em decorrência da exposição ao CE de 22h.

5.MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos (N=44), sendo um grupo experimental composto por 31 animais, que foram mantidos em um ciclo claro-escuro (CE) simétrico de 22h, e um grupo controle, com 13 animais sob ciclo CE simétrico de 24h. Os ratos permaneceram alocados em gaiolas de polipropileno (30 cm de comprimento x 37cm de largura x 16 cm de altura) individualmente, que eram mantidas no interior de cabines de madeira (Figura 1) com condições controladas de temperatura ($23,17 \pm 1,39$), umidade ($42,08 \pm 8,14$), luminosidade (CE de 22h para os grupos experimentais e de 24h para o grupo controle).



Figura 5. Caixa de madeira para controle do ciclo claro-escuro. Na parte superior da caixa foram fixadas fitas de *LED* e sensores de movimento. Há também um sistema de exaustão para circulação do ar no interior das cabines que comportam 4 gaiolas, cada. Fonte: Laboratório de Estudos em Memória e Cognição -LEMCOG/ UFPB (2017).

Água e comida foram fornecidas *ad libitum*. Os ratos foram fornecidos pelo Biotério Prof. Thomas George da Universidade Federal da Paraíba e tratados de acordo com as diretrizes da legislação brasileira para a utilização de animais em pesquisa (Lei Arouca, nº 11.794/08). Todos os procedimentos foram submetidos ao Comitê de Ética da Universidade Federal da Paraíba e aprovados pelo CEUA da UFPB-Nº07/07/13. Foi feito todo o esforço possível para minimizar o estresse, a dor e o desconforto dos animais.

5.2 Delineamento Experimental

Os procedimentos experimentais duraram aproximadamente 42 dias (Figura 6), estes animais já nasciam nas cabines com o CE de 24h invertido, com o intuito de preservar a segurança das pesquisadoras, reduzindo as idas à Universidade de madrugada. Quando completaram 21 dias, foi realizado o desmame (dia 1 do experimento) e em seguida, foi feita a pesagem dos animais: (peso médio inicial $41,8 \text{ g} \pm 13,14$) e no dia 42, último dia de experimento, (peso final médio $244,63 \pm 11,05$).

No dia 1 do experimento os animais foram alocados aleatoriamente em dois grupos: um grupo controle que teve o ciclo claro-escuro programado para 24h (12h claro e 12h escuro) e um grupo experimental que teve o ciclo claro-escuro programado para 22h (11h claro e 11h escuro).

Após aproximadamente 20 dias de CE 22h, os ratos foram submetidos ao Teste de Campo Aberto e Reconhecimento de Objetos (dia 21 do experimento), 7 dias depois (dia 28 – Tarefa de Reconhecimento Espacial) e após 7 dias (dia 35 – Esquiva Passiva (EP), conforme pode ser observado na Figura 6.A EP foi a última tarefa por ser mais estressante para o animal. Todos os animais realizaram os testes no meio da fase escura.

O grupo T22 foi subdividido em 2 grupos que realizaram as tarefas, respectivamente: na noite de coincidência ($n=16$) e na noite de não-coincidência ($n=15$). O intervalo entre um teste e outro foi de aproximadamente 7 dias, pois dependia do rato estar ou não, na noite de coincidência e na noite de não-coincidência. Para isto, era necessário fazer a inspeção visual diariamente dos actogramas dos animais.

No dia 42, os animais foram para eutanásia e os tecidos cerebrais da região do hipotálamo anterior, córtex pré-frontal e hipocampo foram recolhidos para análise posterior. Nesse estudo, só serão apresentados os resultados para o Teste de Campo Aberto e Esquiva Passiva, os demais resultados serão divulgados em outra dissertação do grupo de pesquisa e em artigos científicos.

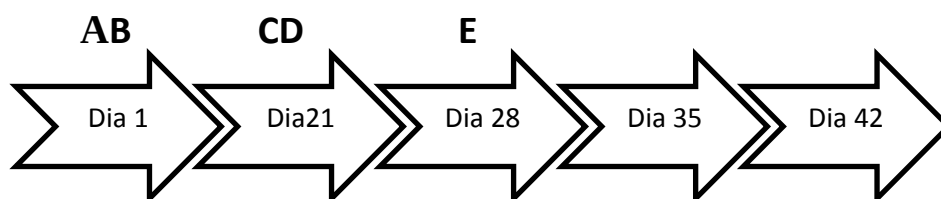


Figura 6. Descrição do Delineamento Experimental. **A** – Início do Experimento, **B** – Campo Aberto e Reconhecimento de Objetos, **C** – Reconhecimento Espacial Associativo, **D** – Esquiva Passiva, **E** – Eutanásia.

5.3 Procedimentos Experimentais

5.3.1 Teste de Campo Aberto (CA)

Após aproximadamente 20 dias de CE 22h os animais passaram pelo Teste de Campo Aberto. O aparato utilizado foi uma arena circular de material acrílico medindo 60 cm de diâmetro e 40 cm de altura, com parede transparente e piso preto, conforme pode ser visto na figura abaixo:



Figura 7. Arena circular durante a realização do teste de campo aberto.

Fonte: Laboratório de Estudos em Memória e Cognição -LEMCOG/ UFPB (2017).

No teste de CA é avaliado o comportamento do tipo ansioso e a atividade exploratória, com o intuito de analisar a influência dos ambientes não familiares sobre a emoção de ratos (Prut & Belzung, 2003).

O teste aconteceu no meio da fase escura para o grupo T24, no meio da noite de coincidência para 16 animais do T22 e no meio da noite de não-coincidência para 14 animais do T22.

No dia do teste, os animais foram trazidos para a sala de comportamento do Laboratório de Estudos em Memória e Cognição – LEMCOG, onde o ruído branco já estava ligado, permanecendo durante todo o teste. Os animais passavam 30 min de habituação na sala antes de iniciarem a tarefa. A temperatura da sala era de

aproximadamente 24°C. Cada animal foi colocado individualmente na arena e observado durante 10 min. No intervalo da troca de um animal para outro o equipamento foi limpo com solução de 5% de álcool e papel toalha, com o intuito de diminuir as pistas olfativas entre um rato e outro.

O teste de Campo Aberto correspondeu à Habituação 1 da Tarefa de Reconhecimento de Objetos. O intervalo entre uma sessão e outra era de 30 minutos. Em seguida, foi realizada a Habituação 2 (duração de 10 min), Amostra (duração de 5 min) e Teste (duração de 5 min).

Todas as sessões foram gravadas através de uma webcam (modelo FaceCam 1020, Genius[®]) pelo software Debut e os vídeos foram posteriormente analisados pelo toolbox *autotyping* (Patel *et al.*, 2014) desenvolvido em plataforma MATLAB capaz de analisar a localização precisa do animal e o tempo gasto dentro de uma região de interesse (ROI).

5.3.2 Teste de Esquiva Passiva (EP)

Para avaliação da memória aversiva foi utilizada uma caixa de esquiva passiva para ratos (Insight, Brasil) com as seguintes dimensões: (307x333x540 mm) confeccionada em acrílico cinza, com porta divisória removível, piso em barras de aço inox, sensores de infravermelho e controlada por computador via saída USB. Utilizamos apenas um lado desta caixa que media (22,5 x 22,5 cm) e adaptamos com uma plataforma de madeira de dimensões (21 x 10 cm).

O Teste de Esquiva Passiva (EP) avalia um processo de aprendizagem rápido, no qual a resposta envolve a aquisição de um comportamento que adia a ocorrência de um evento aversivo futuro. Por compreender um processo de aprendizagem em que uma resposta deve ser inibida, esse tipo de esquiva também é chamado de esquiva passiva inibitória (Cruz & Landeira-Fernandez, 2012).

O teste ocorreu em torno do dia 35 do experimento, sendo o último da bateria de testes por ser a tarefa mais estressante para o animal. A tarefa consistia em uma sessão de treino com duração de cinco minutos e duas sessões de teste de mesma duração (30 min após o treino para todos os grupos, 24h após o treino para o grupo controle e 22h após o treino para o grupo experimental) afim de que fossem avaliadas as memórias de curto e longo prazo. No intervalo da troca de um animal para outro o aparato era limpo

com solução de 10% de álcool e papel toalha, com o intuito de se minimizar as pistas olfativas entre um animal e outro.

Durante o treino, os animais eram colocados individualmente dentro da caixa da esquiwa, em cima de uma plataforma de madeira (Figura 8). Sempre que o animal descia com as 4 patas sobre o assoalho metálico, levava um choque elétrico de 0,5 μ A. Nas sessões de teste não era mais aplicado o choque. Avaliávamos o tempo que o animal levava para descer da plataforma, ou seja, a latência de descida. Todas as sessões foram gravadas através de uma webcam (modelo FaceCam 1020, Genius[®]) pelo software Debut e os vídeos foram posteriormente analisados pelo software de rastreamento *Ethowactcher*(UFSC, Brasil).



Figura 8. Rato durante o teste de Esquiwa Passiva em cima da plataforma de madeira.
Fonte: Laboratório de Estudos em Memória e Cognição -LEMCOG/ UFPB (2017).

Três animais do Grupo T22 foram retirados da análise estatística para o Teste da Esquiwa Passiva e quatro animais na análise do Campo Aberto por ter sido constatado, posteriormente, que as tarefas não foram realizadas na noite de coincidência. Um animal foi excluído da análise estatística do grupo controle para o teste de Esquiwa Passiva por falha técnica durante a execução do teste.

5.4 Coleta e análise dos dados de atividade locomotora

A atividade locomotora dos ratos foi registrada continuamente através de sensores de movimento por infravermelho instalados sobre as gaiolas conectados a um computador por uma placa de aquisição de dados da HYTEK Automation Inc. (iUSBDAQ-U120816AO). Os dados foram totalizados e registrados em intervalos de 5

minutos pelo software SAP – Sistema de Acionamento Programado (desenvolvido pelo Laboratório de Cronobiologia – UFRN). O controle do acionamento da iluminação da sala também foi realizado por esse software.

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

5.5 Procedimentos estatísticos

Pelas saídas do *Ethowactcher* (UFSC, Brasil) e do Toolbox Autotyping (Patelet al, 2014) foram coletados dados das análises de vídeo para os testes de CA e EP. 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 $p < 0,05$. Para o teste de CA, após teste de normalidade, foi realizada uma ANOVA de uma via para amostras independentes que comparou as médias das medidas comportamentais: distância total percorrida, velocidade média, thigmotáxis máximo e mínimo, entre os 3 grupos.

As médias da latência para descer da plataforma nos testes de EP para memória de curto e longo prazo não apresentaram distribuição normal. Logo, foi utilizada a estatística não-paramétrica através do teste de Kruskal Wallis para comparação entre os grupos.

6. RESULTADOS

6.1. Parâmetros comportamentais

6.1.1 Campo Aberto

A distância total percorrida pelos animais foi analisada por meio da ANOVA de uma via para amostras independentes. Não houve diferenças na distância total percorrida [$F(2,35)$: 0,247; $p = 0,783$], conforme pode ser observado na Figura 9.

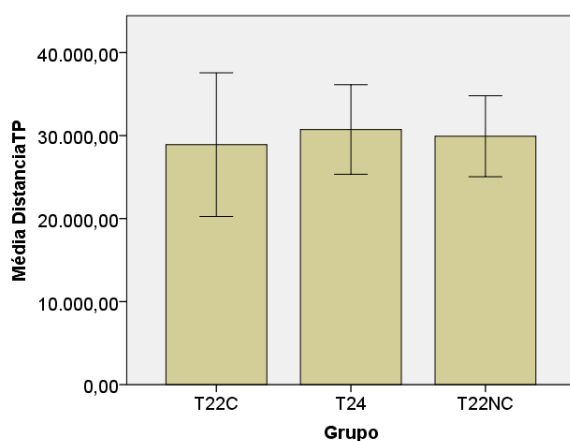


Figura 9. Distância total percorrida em pixels no Teste de Campo Aberto.(Média $\pm$ Desvio Padrão).

A velocidade percorrida (pixels/s) também foi analisada por uma ANOVA de uma via para amostras independentes. Não houve diferença significativa da velocidade [$F(2,35)$: 0,251, $p = 0,779$] entre os grupos, conforme pode ser observado na figura 10.

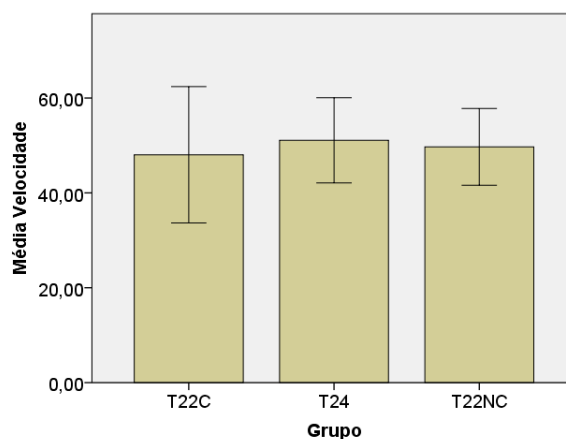


Figura 10 - Velocidade média (pixels/segundo) percorrida entre os grupos na tarefa de Campo Aberto. (Média $\pm$ Desvio Padrão).

As variáveis thigmotaxis máximo e mínimo são medidas comportamentais de ansiedade e demonstram a tendência que o animal apresenta de permanecer nas arestas do campo aberto. Não houve diferenças entre os grupos para thigmotaxis máximo [$F(2,35): 0,823, p = 0,447$] e thigmotaxis mínimo [$F(2,35): 0,777, p = 0,926$], conforme pode ser visto nas figura 11.

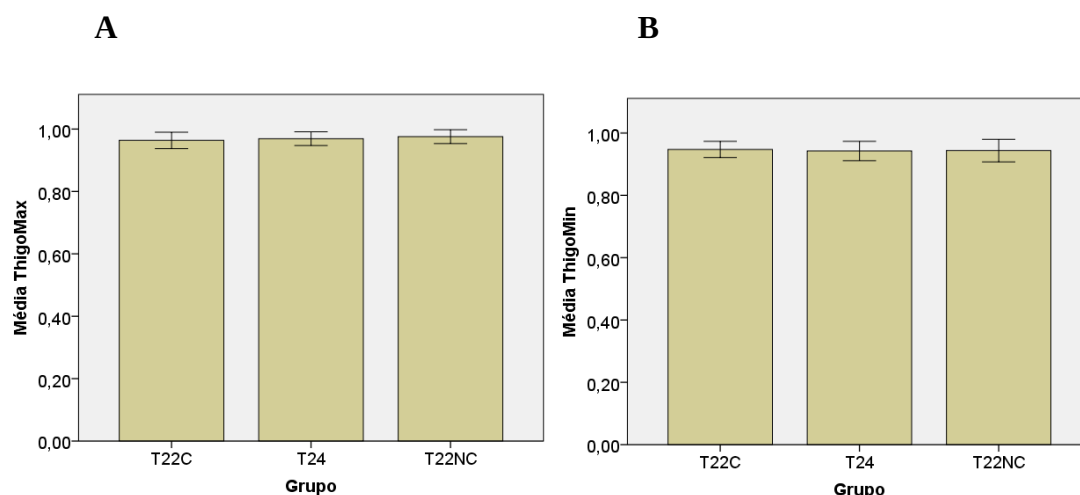


Figura 11. Medida comportamental de ansiedade thigmotaxis máximo (A) e mínimo (B) entre os grupos na tarefa de Campo Aberto. (média $\pm$ Desvio Padrão).

Além da análise das medidas comportamentais, o Toolbox Autotyping (Patelet *al.*, 2014) disponibiliza a representação gráfica do campo aberto para todos os animais analisados, bem como as áreas de maior permanência na arena circular, conforme pode ser observado na figura 7.

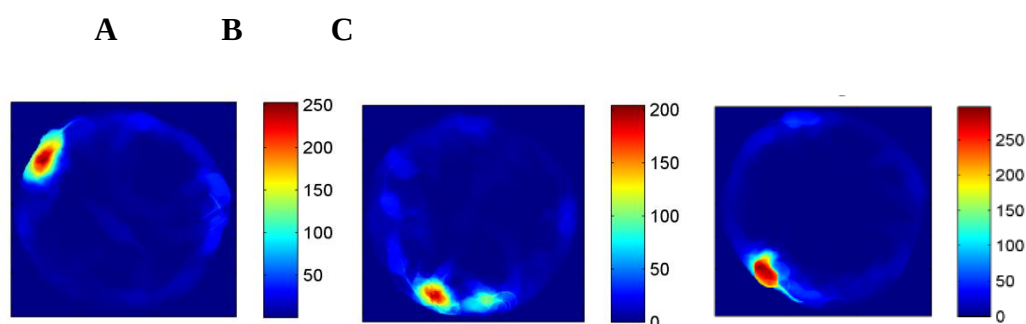


Figura 12. Exemplos das representações gráficas das áreas de maior permanência do animal durante o teste de CA: A – T 22 – Ratoque realizou a tarefa na noite de coincidência, B – T22h – Rato que realizou a tarefa na noite de não-coincidência e C– T24 – rato do grupo controle.

6.1.2 Esquiva Passiva

A latência para descer da plataforma referente à memória de curto prazo foi analisada através do teste de Kruskal Wallis. Não foram observadas diferenças entre os grupos ($\chi^2(2) = 5,460$, $p = 0,065$): noite de coincidência (T22C), noite de não coincidência (T22NC) e Grupo controle (T24). O gráfico pode ser visto na figura 13.

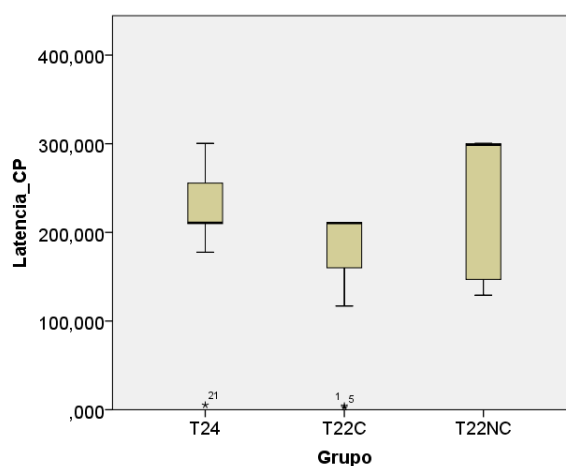


Figura 13. Latência de descida da plataforma durante o teste de Esquiva Passiva para memória de curto prazo. Não houve diferenças na latência de curto prazo entre grupo controle (T24) e grupo experimental (T22) que foi subdividido em: animais que realizaram os testes na noite de coincidência e não-coincidência (Mediana e intervalo interquartilico).

A latência para descer da plataforma referente à memória de longo prazo também foi analisada através do teste de Kruskal Wallis, não sendo encontradas diferenças entre os grupos ($\chi^2(2) = 3,233$, $p = 0,199$), conforme pode ser observado na figura 14.

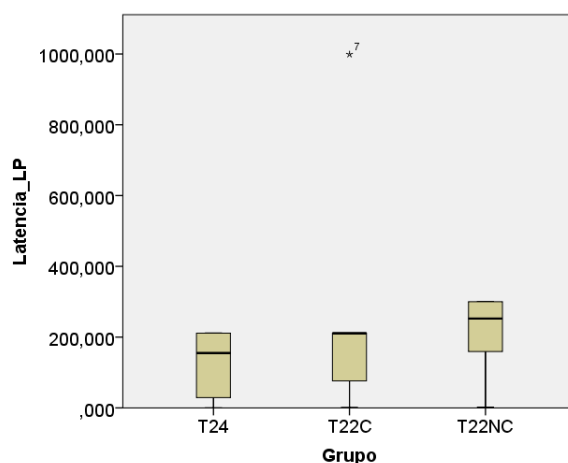


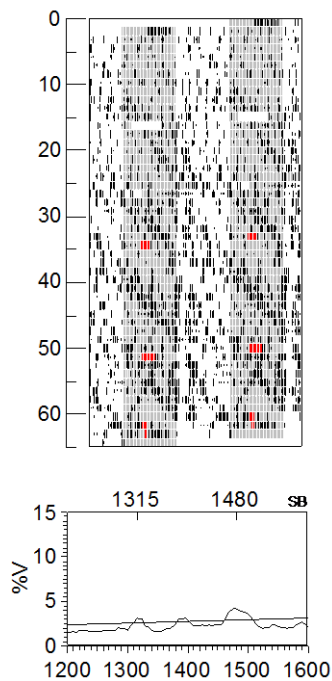
Figura 14. Latência de descida da plataforma durante o teste de Esquiva Passiva para memória de longo prazo. Não houve diferenças na latência de longo prazo entre grupo controle (T24) e grupo experimental (T22) que foi subdividido em: animais que realizaram os testes na noite de coincidência e não-coincidência (Mediana e intervalo interquartilico).

6.1.3 Dados de atividade locomotora

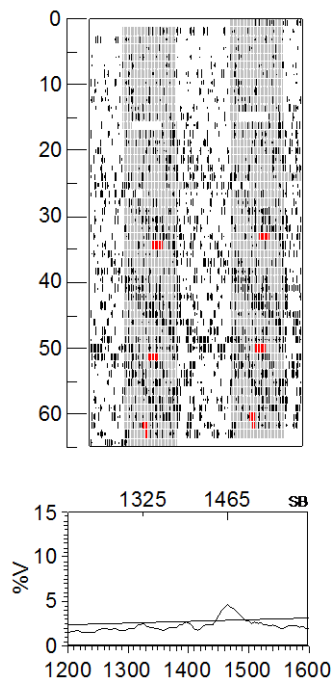
Observou-se que todos os animais do grupo experimental T22 dissociaram, pois apresentaram a expressão de dois ritmos na atividade locomotora: um com o mesmo período do ciclo CE ($s^2 = 4,60 \pm 1,27$) e outro que se expressou em livre-curso ($s^2 = 3,49 \pm 0,59$). Todos os animais do grupo controle sincronizaram ao CE 24h, demonstrando um ritmo estável sincronizado ao CE ($s^2 = 9,77 \pm 4,34$). As representações gráficas do ritmo circadiano de atividade locomotora dos animais T22 que realizaram as tarefas na noite de não-coincidência, T22 - noite de coincidência e do Grupo controle, com seus respectivos periodogramas (Sokolove-Bushell) podem ser vistas abaixo, nas figuras 15, 16 e 17.

GRUPO T 22 – NOITE DE NÃO-COINCIDÊNCIA

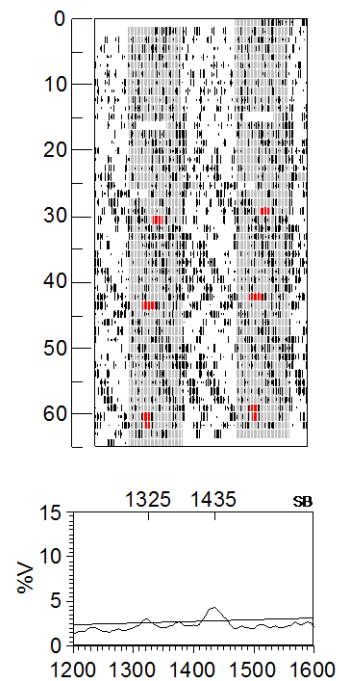
D16



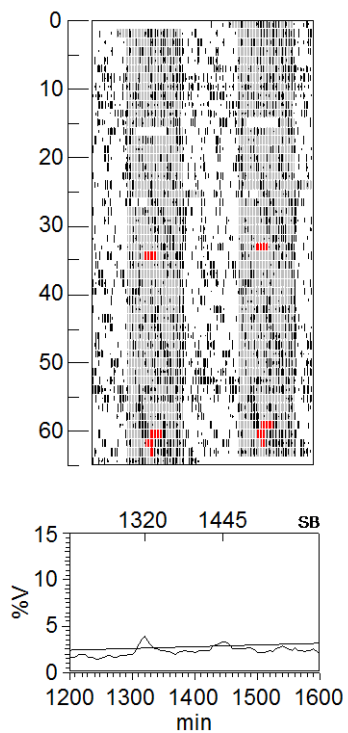
D17



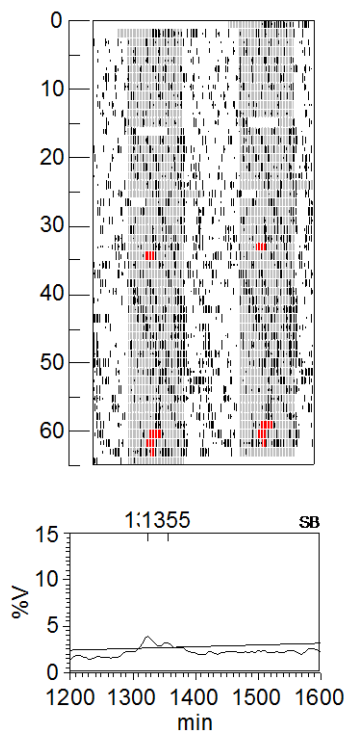
D18



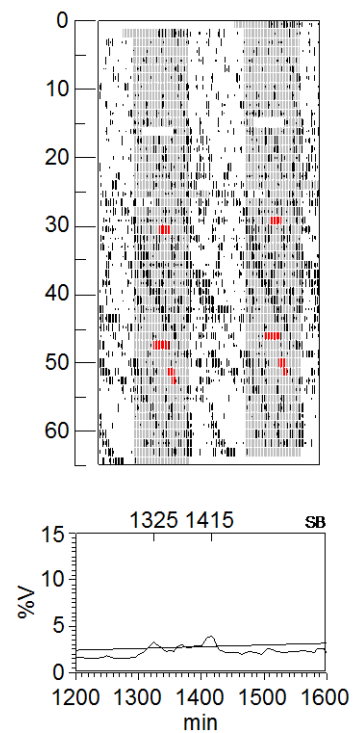
D24

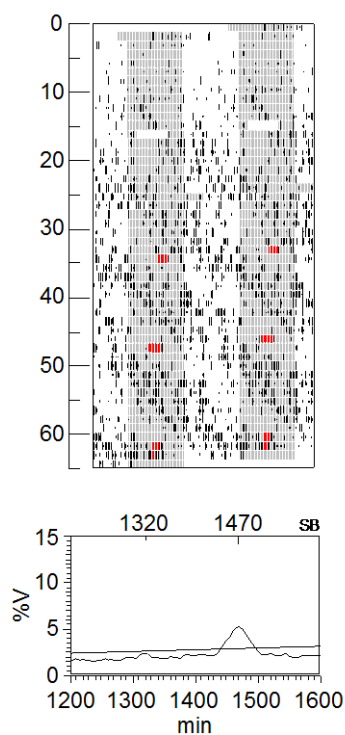
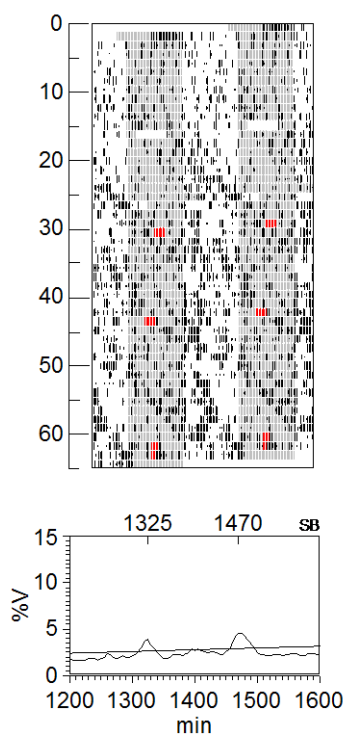
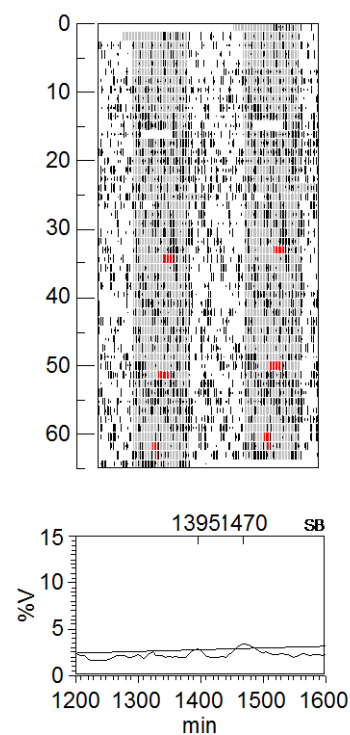
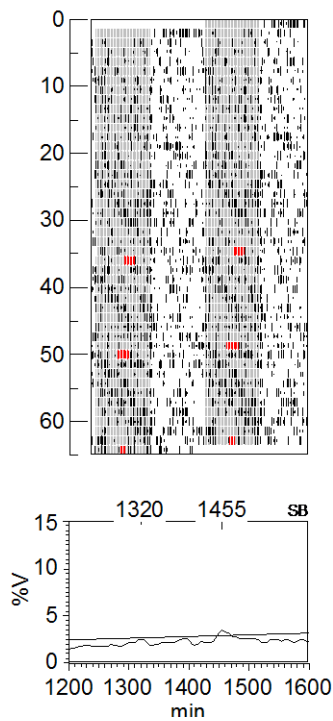
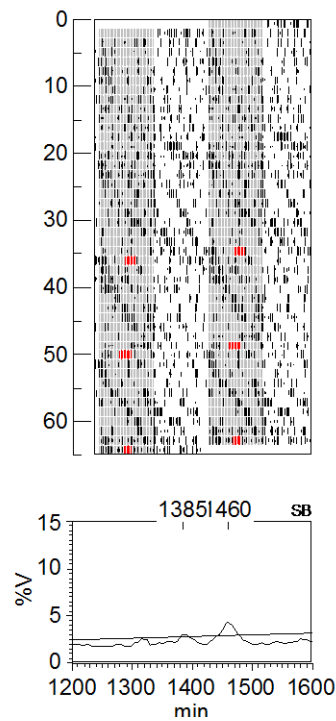
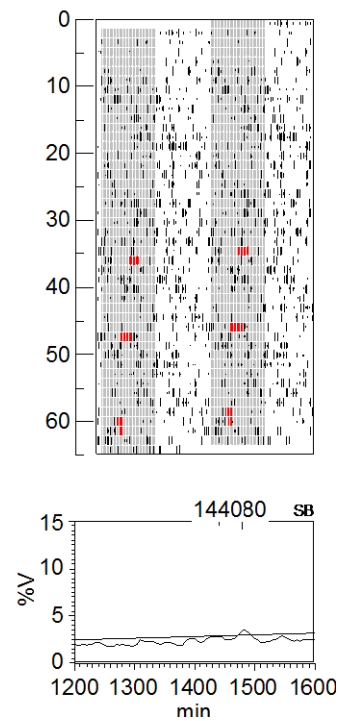


D26



D28



D29**D30****D31****D19****D25****D27**

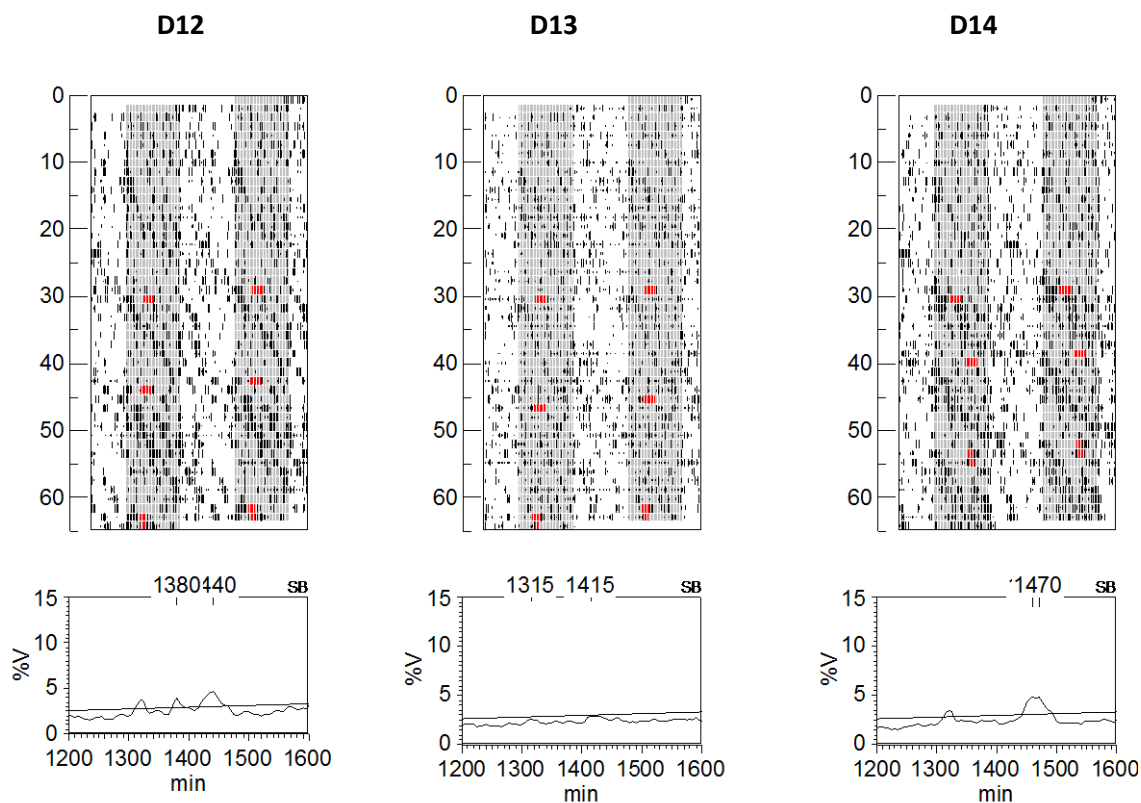
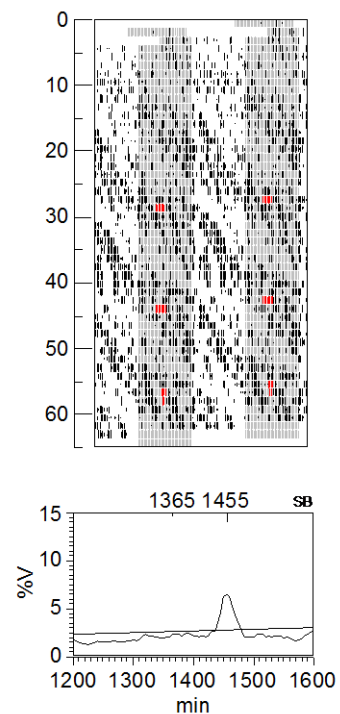
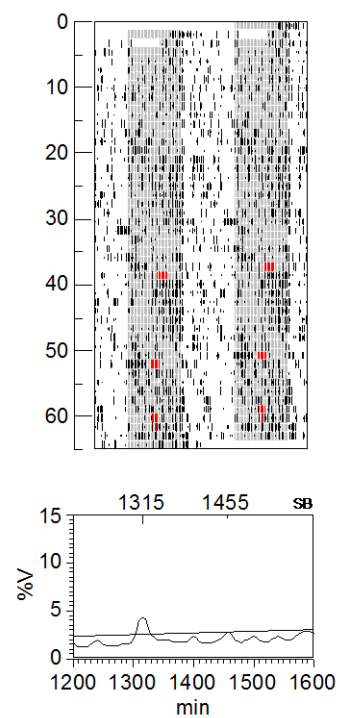


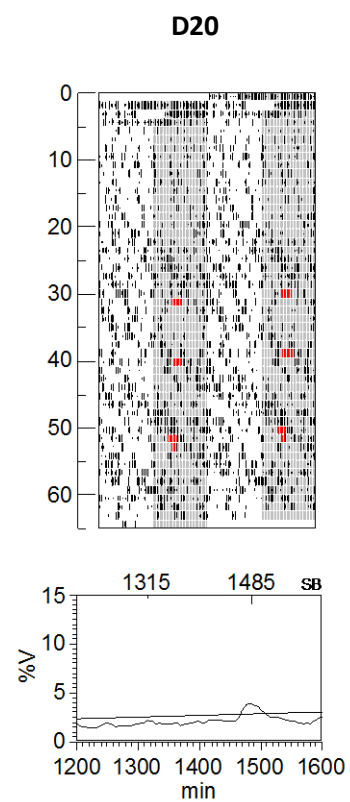
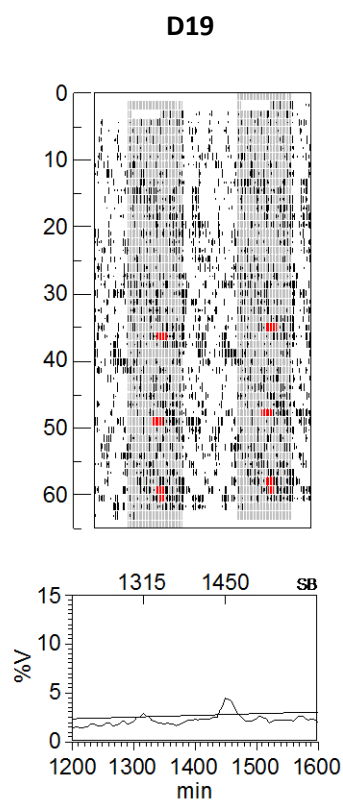
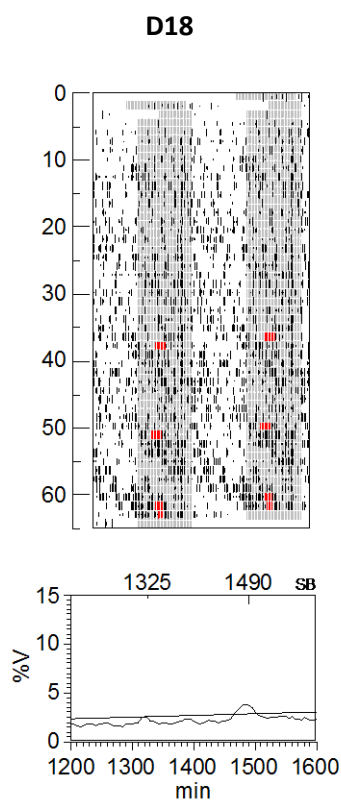
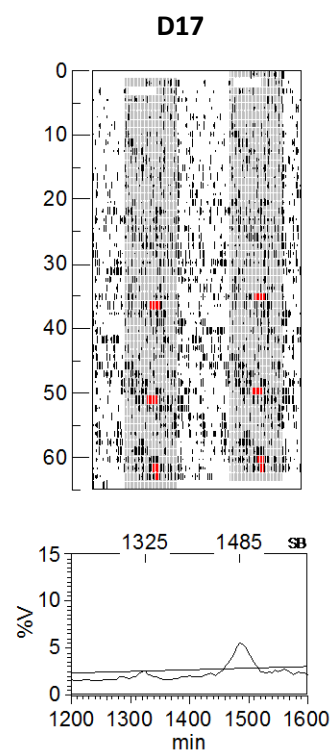
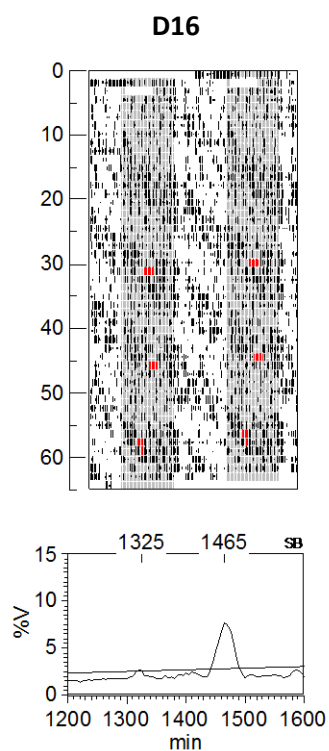
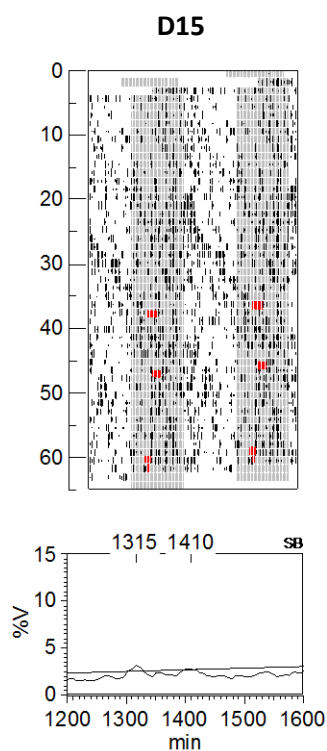
Figura 15. Actogramas plotados duplamente e periodogramas (Sokolove-Bushell) dos animais em T22 que realizaram a tarefa na noite de não-coincidência. As colunas brancas representam as fases de claro e as cinzas as fases de escuro. Os pontos em vermelho situados verticalmente, de cima para baixo, correspondem aos momentos em que foram realizados os respectivos testes comportamentais: 1) Campo aberto 2) Tarefa de Reconhecimento Espacial Associativo 3) Esquiva Passiva. Vale ressaltar que a tarefa de Reconhecimento Espacial Associativo não será discutida nesta dissertação.

D11



D14





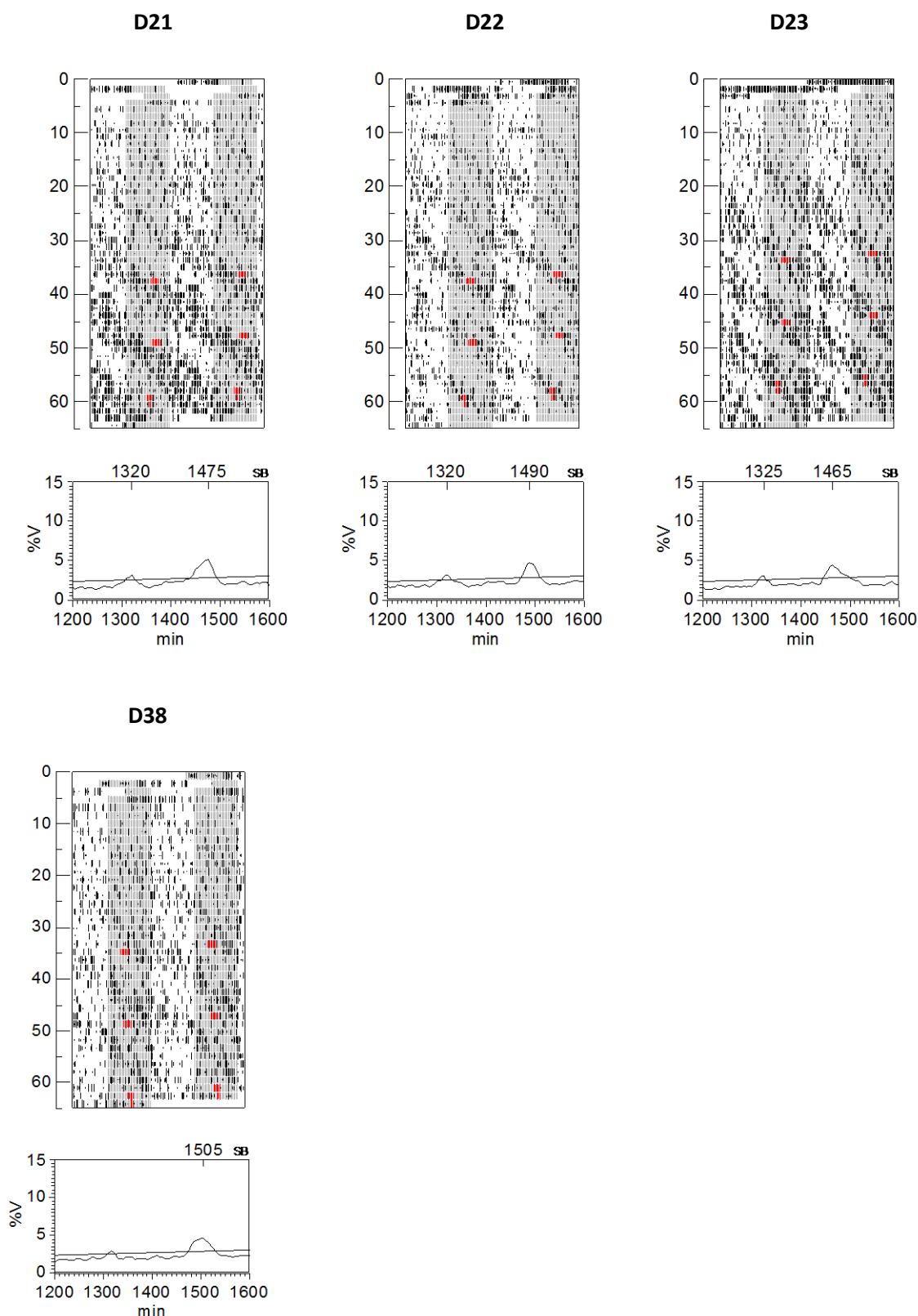
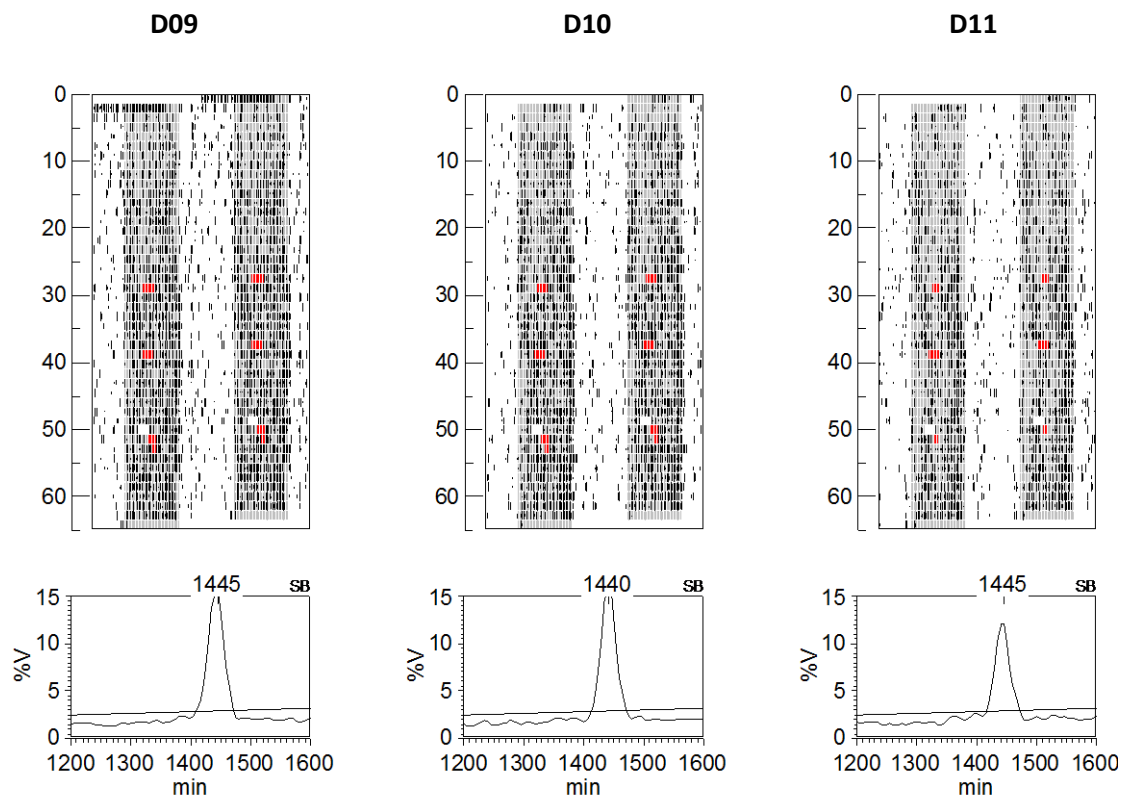
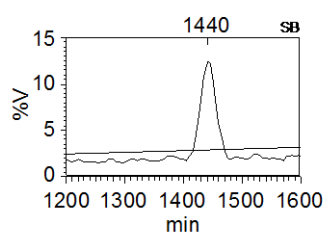
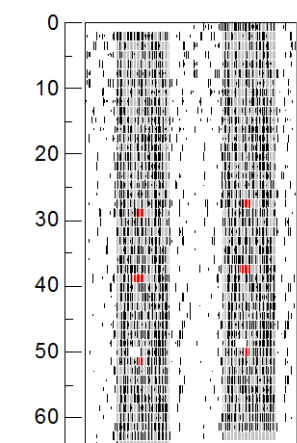
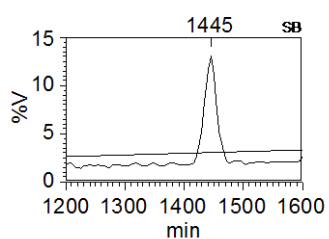
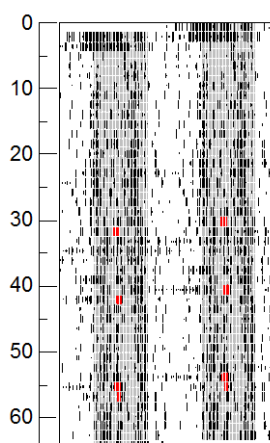
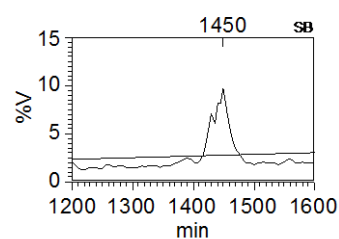
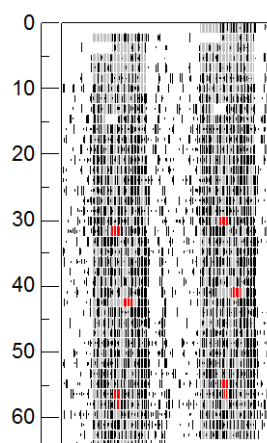
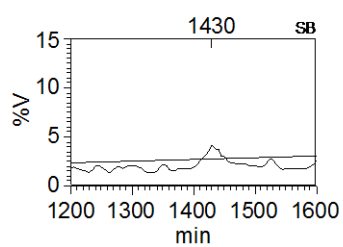
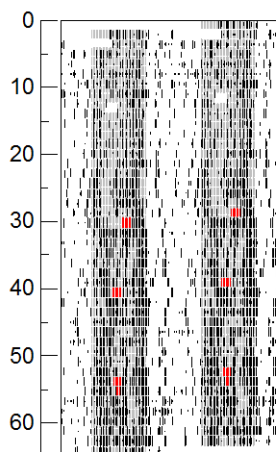
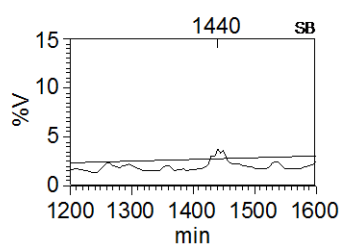
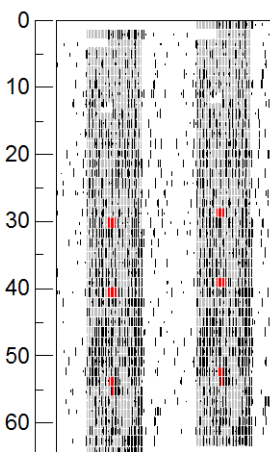
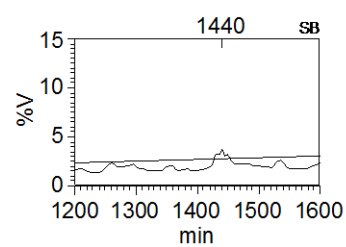
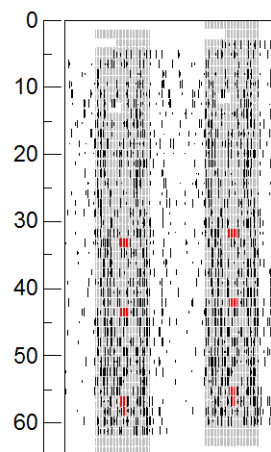


Figura 16. Actogramas plotados duplamente e periodogramas (Sokolove-Bushell) dos animais em T22 que realizaram a tarefa na noite de coincidência. As colunas brancas representam as fases de claro e as cinzas as fases de escuro. Os pontos em vermelho situados verticalmente, de cima para baixo, correspondem aos momentos em que foram realizados os

respectivos testes comportamentais: 1) Campo aberto 2) Tarefa de Reconhecimento Espacial Associativo 3) Esquiva Passiva. Vale ressaltar que a tarefa de Reconhecimento Espacial Associativo não será discutida nesta dissertação.

GRUPO CONTROLE – T24



D38**D23****D30****D24****D25****D26**

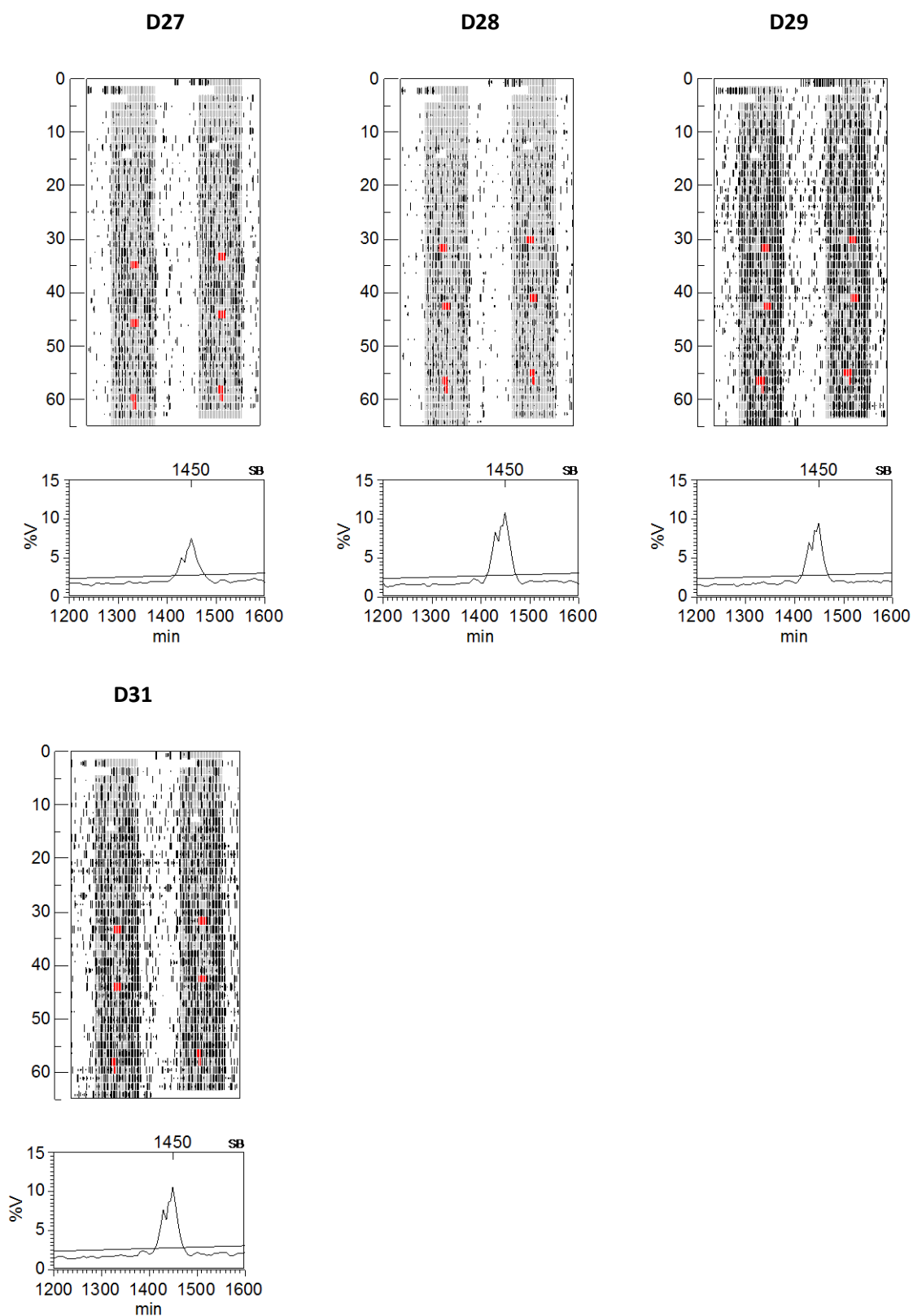


Figura 17. Actogramas plotados duplamente e periodogramas (Sokolove-Bushell) dos animais em T24. As colunas brancas representam as fases de claro e as cinzas as fases de escuro. Os pontos em vermelho situados verticalmente, de cima para baixo, correspondem aos momentos em que foram realizados os respectivos testes comportamentais: 1) Campo aberto 2)

Tarefa de Reconhecimento Espacial Associativo 3) Esquiva Passiva. Vale ressaltar que a tarefa de Reconhecimento Espacial Associativo não será discutida nesta dissertação.

7. DISCUSSÃO

Durante a adolescência, há dois aspectos que determinam o ritmo circadiano: a adaptação ao ambiente e a maturação do animal (Albert *et al.*, 2013). No presente trabalho, os animais sob T22 apresentaram dois ritmos na atividade locomotora, de forma contrária a nossa hipótese inicial. Havíamos previsto que os ratos adolescentes seriam capazes de sincronizar o ciclo CE de 22h, apresentando apenas um ritmo circadiano na atividade locomotora com o mesmo período do ciclo CE, devido à grande plasticidade que acontece nesta fase do desenvolvimento.

Nossa hipótese inicial teve como base o estudo de Albert *et al.* (2013), no qual foi visto que a exposição precoce a padrões de claro-escuro anormais, durante a maturação do sistema circadiano, gera maior coerência interna ou acoplamento no sistema, induzindo a um único ritmo, indicando que os ratos adolescentes são capazes de utilizar um *zeitgeber* como referência temporal mais estável.

Além disso, também não foram encontrados prejuízos induzidos pelo CE de 22h no comportamento do tipo ansioso e na memória aversiva de curto e longo prazo. Diante disso, podemos sugerir três possíveis explicações para os nossos achados: primeiro, mesmo o STC possuindo uma relativa flexibilidade às mudanças ambientais, o ciclo T22 é suficientemente forte para promover a dessincronização interna e externa em ratos adolescentes; segundo, é possível que apesar de dessincronizados, os ratos consigam se adaptar a esta condição (devido a sua alta capacidade plástica, afinal, as tarefas foram realizadas na noite de coincidência e não-coincidência, e ainda assim, o desempenho dos grupos não apresentou diferenças significativas; terceiro, é possível que essas tarefas não sejam sensíveis aos efeitos da dissociação do ritmo circadiano da atividade locomotora.

Poucos trabalhos na literatura investigaram os efeitos da dessincronização interna forçada através do Modelo T22 em ratos durante a adolescência. Em ratos adultos, Neto *et al.*, 2008 também utilizaram o modelo T22 que posteriormente foram avaliados pelo Teste de Esquiva Passiva. Assim como no nosso estudo, os animais apresentaram dois ritmos circadianos de atividade locomotora, porém, diferentemente do que encontramos no nosso trabalho, na fase adulta, os ratos apresentaram prejuízos na tarefa de esquiva passiva para memória de curto e longo prazo.

No que diz respeito ao comportamento do tipo ansioso, Borniger *et al.* (2014) também utilizaram o teste de campo aberto para avaliar os efeitos ansiogênicos

da exposição precoce de ratos à luz artificial durante a noite (LAN) até o início da adolescência, bem como as influências deste protocolo no fenótipo. Quando adultos, esses animais foram avaliados e os machos apresentaram maior tendência em permanecer no centro do campo aberto do que as fêmeas. Porém, não foram encontradas diferenças na distância total percorrida entre os sexos, nem entre os grupos, indicando que a exposição precoce a LAN não influenciou o comportamento do tipo ansioso na fase adulta.

Considerando o protocolo de dessincronização interna forçada como um modelo que também provoca estresse crônico, encontramos na literatura outros trabalhos que avaliaram o desempenho de ratos adolescentes sob estresse crônico nas tarefas de campo aberto e esQUIVA passiva.

O teste de Campo Aberto também foi utilizado no experimento de Mello *et al.* (2009), que investigaram se o exercício físico forçado altera déficits de memória causados pelo estresse da privação materna pós-natal. Contudo, os resultados mostraram que a privação materna não teve efeito sobre o comportamento do tipo ansioso entre os grupos.

Embora existissem estudos relatando ansiedade aumentada em animais adultos previamente expostos à estresse crônico durante a adolescência (McCormick & Green, 2013), estudos investigando os efeitos imediatos do estresse crônico em adolescentes, não encontraram aumento no comportamento do tipo ansioso de animais nos testes do labirinto em cruz elevado e no campo aberto (Leussis & Andersen, 2008, McCormick *et al.*, 2008, Eiland *et al.*, 2012; Yuen *et al.*, 2012).

Li *et al.* (2017) estudaram os efeitos da exposição crônica ao hormônio do estresse, a corticosterona (CORT), tanto em animais adolescentes quanto em adultos. O tratamento CORT produziu uma série de efeitos comportamentais e neurobiológicos que diferiram entre os grupos etários. Enquanto os adultos demonstraram redução da preferência pela sacarose, níveis de ansiedade aumentados e comprometimento cognitivo, os ratos adolescentes apresentaram maior preferência pela sacarose e níveis de ansiedade mais baixos.

Dentro desse contexto, ratos adolescentes parecem apresentar boa capacidade adaptativa aos modelos experimentais que geram estresse crônico, pois também não foram encontrados prejuízos cognitivos e emocionais nos estudos supracitados que utilizaram o teste de campo aberto e a esQUIVA passiva, corroborando com o nosso trabalho.

A maturação das funções comportamentais do córtex pré-frontal, como o controle inibitório, ocorre tanto em humanos como em ratos, durante a adolescência, funções estas que são dependentes das interações do córtex pré-frontal com outras partes do sistema límbico como a amígdala basolateral, podendo afetar a reestruturação e a modulação hormonal do comportamento (Juraska & Willing, 2017).

Como no nosso trabalho não foram encontrados prejuízos cognitivos e emocionais através dos resultados dos testes de campo aberto e esquiva passiva, além da possibilidade das tarefas não serem sensíveis aos efeitos da dissociação do ritmo circadiano, outra possibilidade surge a partir da capacidade plástica do córtex pré-frontal que se encontra em processo de maturação das funções comportamentais durante a adolescência.

Essa hipótese justificaria, em parte, os nossos achados, tendo em vista que, tanto o sistema circadiano do rato adolescente quanto as funções comportamentais mediadas pelo córtex pré-frontal, por encontrarem-se em pleno estágio de desenvolvimento, ainda que em condições de dessincronização, devido a importante capacidade plástica, podem ser capazes de se adaptar ou apresentar uma janela maior de flexibilidade às mudanças que ocorrem nessa fase da vida.

Sugerimos a realização de novos estudos utilizando o modelo T22 ao longo da ontogênese, visando uma melhor compreensão dos efeitos da dessincronização interna forçada durante o desenvolvimento do sistema circadiano, bem como suas implicações nos processos cognitivos e emocionais, a curto, médio e longo prazo.

8. CONCLUSÃO

O modelo T22 de dessincronização interna forçada é capaz de promover a dissociação do ritmo circadiano na atividade locomotora de ratos Wistar adolescentes, porém não induz prejuízos em algumas tarefas amígdala-dependentes que avaliam ansiedade e memória aversiva, provavelmente devido à alta capacidade plástica e adaptativa do organismo durante a adolescência.

9. REFERÊNCIAS

- Albert, N., Silva, C., Díez-Noguera, A., & Cambras, T. (2013). Different adaptation of the motor activity rhythm to chronic phase. *Behavioural Brain Research*, 252, 347-355.
- Albuquerque, F. d., & Silva, R. H. (2009). A amígdala e a tênue fronteira entre memória e emoção. *Rev. psiquiatr.*, 31, 1-18.
- Andrade, L., & Gorenstein, C. (1998). Aspectos gerais das escalas de avaliação de ansiedade. *Rev Psiq Clin*, 25, 285-290.
- Aoki, C., Romeo, R. D., & Smith, S. S. (2017). Adolescence as a Critical Period for Developmental Plasticity. *Brain Research*, 85-86.
- Arble, D., Ramsey, K., Bass, J., & Turek, F. (2010). Circadian disruption and metabolic disease: findings from animal models. *Best Practice and Research Clinical Endocrinology and Metabolism*, 785–800.
- Araújo, J., & Marques, N. (2002). Cronobiologia: uma multidisciplinaridade necessária. *Margem*, 95-112.
- Aschoff, J. (1951). Die 24-Stunden-Periodik der Maus unter konstanten Umweltbedingungen. *Naturwissenschaften*, 38, 506—507.
- Aschoff, J. (1988). Masking of circadian rhythms by Zeitgebers as opposed to entrainment. *Advanced Biosciences*, 73, 149–161.
- Aujard, F., Herzog, E.D, & Block, G.D. (2001). Circadian rhythms in firing rate of individual suprachiasmatic nucleus neurons from adult and middle-aged mice. *Neuroscience*, 106, 255–261.
- Ben-Hamo, M., Tal, K., Paz-Cohen, R., Kronfeld-Schor, N., & Einat, H. (2016). Differential effects of photoperiod length on depression- and anxiety- like behavior in female and male diurnal spiny mice. *Physiol. Behav.*, 165, 1-6.
- Best, J.R. & Miller P.H. (2010). A developmental perspective on executive function. *Child Dev*, 81, 1641–1660.
- Borniger, J. C., McHenry, Z. D., Salloum, B. A., & Nelson, R. J. (2014). Exposure to dim light at night during early development increases adult. *Physiology & Behavior*, 133, 99–106.
- Bueno, C., & Wey, D. (2012). Gênese e ontogênese do ritmo de sono/ vigília em humanos. *Revista da Biologia*, 9, 62–67.
- Buijs, R., & Kalsbeek, A. (2001). Hypothalamic integration of central and peripheral clocks. *Nat Rev Neurosci.*, 2, 521-526.

- Cai, A., Scarbrough, K, Hinkle, D.A, & Wise, P.M. (1997). Fetal grafts containing suprachiasmatic nuclei restore the diurnal rhythm of CRH and POMC mRNA in aging rats. *American Journal of Physiology* , 1764–1770.
- Cambras, T., Weller, J.R, Anglès-Pujoràs, M, Lee, M.L, Christopher, A.D, Díez-Noguera, A, . . . de la Iglesia, H.O. (2007). Circadian desynchronization of core body temperature and sleep stages in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 104, 7634-7639.
- Campuzano, A., Vilaplana, J, Cambras, T, & Díez-Noguera, A. (1998). Dissociation of the rat motor activity rhythm under T cycles shorter than 24 hours. *Physiol Behav* 1998;63:171–6., 63, 171–176.
- Casey, B. J., Siobhan, S. P., Charles, E. G. & Francis S. L. (2013). Treating the developing brain:implications from human imaging and mouse genetics. *Annu.Rev.Med.*, 64, 427–439.
- Casey, B. J. (2015). Beyond Simple Models of Self-Control to Circuit-Based Accounts of Adolescent Behavior. *Annual Review of Psychology*, 66, 295-319.
- Cruz, A. P., & Landeira-Fernandez, J. (2012). *Modelos animais de ansiedade e o estudo experimental de drogas serotoninérgicas*.São Paulo: Manole
- Czeisler, C., & Wright, K.P. (1999). Influence of light on circadian rhythmicity in humans. In F. Turek, & Zee, P.C, *Regulation of Sleep and Circadian Rhythms*. (pp. 149–180.). New York: Marcel Dekker.
- Davidson, L. L., Grigorenko, E. L., Boivin, M. J., Rapa, E. & Stein, A. (2015). A focus on adolescence to reduce neurological,mental health and substance-use disability. *Nature*, 527.
- de la Iglesia, H., Cambras, T, Schwartz, W.J, & Díez-Noguera, A. (2004). Forced desynchronization of dual circadian oscillators within the rat suprachiasmatic nucleus. *Curr Biol.*, 14, 796-800.
- Dunlap, J.C., Loros, J.J., DeCoursey, P.J. (2004). *Chronobiology Biological timekeeping*.Sinauer Associates, Inc. publishers; 504.
- Dyffy, J., & Czeisler, C.A. (2002). Age-related change in the relationship between circadian period, circadian phase, and diurnal preference in humans. *Neurosci Lett.*, 318, 117-120.
- Eiland, L., Ramroop, J., Hill, M.N., Manley, J., McEwen, B.S. (2012). Chronic juvenil estress produces corticolimbic dendritic architectural remodeling and modulates emotional behavior in male and female rats. *Psychoneuroendocrinology*, 37, 39–47.
- El-Henmany, R., Bendová, K.M.Z., Sosniyenko, S., Sumova, A. (2008). Maternal

Control of the fetal and neonatal rat suprachiasmatic nucleus. *Journal of Biological Rhythms*, 23, 435-444.

- Esquivá, E., Lax, P., Pérez-Santonja, J.J., García-Fernández, J.M., & Cuenca, N. (2017). Loss of Melanopsin-Expressing Ganglion Cell Subtypes and Dendritic Degeneration in the Aging Human Retina. *Front. Aging Neurosci.* 1-17.
- Fonken, L. K. & Nelson, R. J. (2011). Illuminating the deleterious effects of light at night. *Med Rep*, 3-18.
- Geib, L., Neto, A.C, Wainberg, R, & Nunes, M.L. (2003). Sono e envelhecimento. *R. Psiquiatr.*, 25, 453-465.
- Graeff, F., & Hetem, L.A.B. . (2004). *Transtornos da Ansiedade*. (Vol. 23). São Paulo: Atheneu.
- Hall, L. C. (1934). Emotional behavior in the rat: I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *Comp Psychol.* 1934, 385-403.
- Halberg, F. (1959). Physiologic 24-hour periodicity in human beings and mice, the lighting regimen and daily routine. In R. Withrow, *Photoperiodism and related phenomena in plants and animals*. (pp. 803-878.). Washington: A.A.A.S.
- Halberg, F. (1960). Temporal coordination of physiologic function. Cold spring Harbor Symp. *Quant. Biol.*, 289-310.
- Haus, E., & Smolensky, M. (2006). Biological clocks and shift work: circadian dysregulation and potential long-term effects. *C. Cancer Causes Control*, 489-500.
- Herman, J.P., Cullinan, W. E., Morano, H. A. & Watson, S.J. (1995). Contribution of the ventral subiculum to inhibitory regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis, *J. Neuroendocrinol.* 7, 475-482.
- Hickey, T., & Spear, P. (1976). Reticulogeniculate projections in hooded and albino rats. *Exp. Brain Res.*, 523-529.
- Huttenlocher, P. (1979). Synaptic density in human frontal cortex - developmental changes and effects of aging. *Brain Res*, 163, 195-205.
- Juraska, J. M., & Willing, J. (2016). Pubertal onset as a critical transition for neural development. *Brain Research*, 1-8.
- 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. Programa de Pós-graduação em Psicobiologia. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Brasil.
- Kováčiková, Z., Sládek, M., Bendová, Z., Illnerová, H., & Sumova, A. (2006). Expression of clock and clock-driven genes in the rat suprachiasmatic nucleus during late fetal and early postnatal development. *J. Biol. Rhythms*, 140-148.
- Kowalska, E., Moriggi, E., Bauer, C., Dibner, C., & Brown, S. (2010). The circadian clock starts ticking at a developmentally early stage. *Journal of Biological Rhythms*, 25, 442-449.
- Leussis M.P. & Andersen S.L. (2008). Is adolescence a sensitive period for depression? Behavioral and neuroanatomical findings from a social stress model. *Synapse*, 62, 22-30.
- Lestienne, R. (1988). From physical to biological time. *Mech Ageing Dev*, 43, 189-228.
- Li, J., Xie, X., Li, Y., Liu, X., Liao, X., Su, Y.-A., & Si, T. (2017). Differential Behavioral and Neurobiological Effects of Chronic Corticosterone Treatment in Adolescent and Adult Rats. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10, 1-16.
- Li, H., & Satinoff, E. (1998). Fetal tissue containing the suprachiasmatic nucleus restores multiple circadian rhythms in old rats. *American Journal of Physiology*, 275, 1735-1744.
- Lima, L., & Vargas, N. N.G. (2014). O Relógio Biológico e os ritmos circadianos de mamíferos: uma contextualização histórica. *Revista da Biologia*, 12 (2), 1-7.
- Mackenzie, J. (1989). Daycase anaesthesia and anxiety. A study of anxiety profiles amongst patients attending a Day Bad Unit. *Anaesth*, 44, 437-440.
- Maren, S. (1997). Neurotoxic or electrolytic lesions of the ventral subiculum produce deficits in the acquisition and expression of Pavlovian fear conditioning in rats, *Behav. Neurosci.* 113 283-290
- Marques, N., & Menna-Barreto, L. (1997). *Cronobiologia: princípios e aplicações*. (3ª ed.). São Paulo: Edusp.
- McGivern, R. F., Andersen, J., Byrd, D., Mutter, K. L., & Reilly, J. (2002). Cognitive efficiency on a match to sample task decreases at the onset of puberty in children. *Brain Cogn.*, 50, 73-89.
- McCormick, C. M., Smith, C. & Mathews, I.Z. (2008). Effects of chronic social stress in adolescence on anxiety and neuroendocrine response to mild stress in male and female rats. *Behav. Brain Res.*, 187, 228-238.
- McCormick, C. M. & Green M. R. (2013). From the stressed adolescent to the anxious and depressed adult: investigations in rodent models. *Neuroscience*, 242-257.

- Mello, P. B., Benetti, F., Cammarota, M., & Izquierdo, I. (2009). Physical exercise can reverse the deficit in fear memory induced. *Neurobiology of Learning and Memory*, 364–369.
- Menna-Barreto, L., & Wey, D. (2007). Ontogênese do sistema de temporização - a construção e as reformas dos ritmos biológicos ao longo da vida humana. *Psicologia USP*, 18 (2), 133-153.
- Menna-Barreto, L., & Díez-Noguera, A. (2012). External temporal organization in biological rhythms. *Biological Rhythm Research*, 43, 1-14.
- Moore, J., Joyner, R., Brill, M., Waxman, S., & Najar-Joa, M. (1978). Simulations of conduction in uniform myelinated fibers. Relative sensitivity to changes in nodal and internodal parameters. *Biophys J*, 147-60.
- Moore, R., & Card, J. (1994). Intergeniculate leaflet: an anatomically and functionally distinct subdivision of the lateral geniculate complex. *J. Comp. Neurol.*, 403-430.
- Moore, R. (1983). Organization and function of a central nervous system circadian oscillator: the suprachiasmatic hypothalamic nucleus. *Fed. Proc. Am. Soc. Exp. Biol.*, 42, 2783-2789.
- Moore, R. (1991). Development of the suprachiasmatic nucleus in: Suprachiasmatic Nucleus: The Mind's Clock. *Oxford University Press*, 197–216.
- Moore, R. Y., & Lenn, N. J. (1972). A retinohypothalamic projection in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 1-14.
- Moore-Ede, M., Sulzman, F.M., & Fuller, C.A. (1982). The Clocks That Time Us: Physiology of the Circadian Timing System. *Harvard University Press*, 464.
- Mrosovsky, N. (1999). Masking: history, definitions and measurement. *Chronobiology International* 16(4): 415–429.
- Neto, S. P., Carneiro, B. T., Valentinuzzi, V. S., & Araújo, J. F. (2008). Dissociation of the circadian rhythm of locomotor activity in a 22 h light–dark cycle. *Physiology & Behavior*, 94, 523–527.
- Pattwell, S.S., Bath, K. G., Casey, B.J., Ninan, I. & Lee, F.S. (2011). Selective early-acquired fear memories under go temporary suppression during adolescence. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 108, 1182–1187.
- Patel, T. P., Gullotti, D. M., Hernandez, P., O'Brien, W. T., Capehart, B. P., Morrison, B., Meaney, D. F. (2014). An open-source toolbox for automated phenotyping of phenotyping of mice in behavioral tasks. *Front. Behav. Neurosci*, 8, 1-16.

- Payne, J., Jackson, E., Ryan, L., Hoscheidt, S., Jacobs, J., & Nadel, L. (2006). The impact of stress on neutral and emotional aspects of episodic memory. *Memory*, 14, 1-16.
- 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, 3-33.
- Pinato, L. (2007). Sistema Serotonérgico: relações com o sistema de temporização circadiano. Tese de Doutorado. Instituto de Ciências Biomédicas III, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- Pittendrigh, C. (1960). Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 25, 159-184.
- Pittendrigh, C. S. (1965). On the Mechanism of the Entrainment of a circadian Clock. In D. Arm, *Sciences and the Sixties* (pp. 96-111). Albuquerque: Proc. Cloudcroft Symp.
- Pittendrigh, C., & Daan, S. (1976). A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. IV. Entrainment: pacemaker as a clock. *Journal of Comparative Physiology A*, 106, 291-331.
- Polanczyk, G., & Lamberte, M. (2012). *Psiquiatria da infância e adolescência*. (1º ed.). Barueri: Manole.
- Ralph, M., & Menaker, M. (1989). GABA regulation of circadian responses to light. I. Involvement of GABAA-benzodiazepine and GABAB receptors. *J Neurosci.*, 9, 2858-2865.
- Rivkees, S. A. (2004). Emergence and influences of circadian rhythmicity in infants. *Clinical Perinatology*, 31, 217-228.
- Rivkees, S. A., & Hao, H. . (2000). Developing circadian rhythmicity. . *Seminars in Perinatology*, 4 (4), 232-242.
- Roozendaal, B., & McGaugh, J. (1996). Amygdaloid nuclei lesions differentially affect glucocorticoid-glucocorticoid induced memory enhancement in an inhibitory avoidance task. *Neurobiol Learn Mem*, 1-8.
- Ruggiero, R. N., Bueno-Júnio, L. S., Ross, J. B., Fachim, H. A., Padovan-Neto, F. E., S. M., Moreira, J. E. (2011). Neurotransmissão g ansmissão glutamatérgica e plasticidade sináptica: aspectos moleculares, clínicos e filogenéticos. *Medicina*, 2(44), 143-56.
- Sadock, B., & Sadock, V. (2010). *Compêndio de psiquiatria: ciência do comportamento e psiquiatria clínica*. (9º ed.). Porto Alegre: Artmed.

- Salgado-Delgado, R., Angeles-Castellanos, M, Buijs, M.R, & Escobar, C. (2008). Internal desynchronization in a model of night-work by forced activity in rats. *Neuroscience*, 154 (3), 922- 931.
- Selemon, L. (2013). A role for synaptic plasticity in the adolescent development of executive function. *Transl.Psychiatr*, 3, 238.
- Sládek, M., Sumova, A, Kováčiková, Z, Bendová, Z, Laurinová , K, & Illnerová, H. (2004). Insight into molecular core clock mechanism of embryonic and early postnatal rat suprachiasmatic nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 101, 6231–6236.
- Smale, L., Michels, K.M.,Moore, R.Y., Morin, L.P.(1990). Destruction of the hamster serotonergic system by 5,7-DHT: effects on circadian rhythm phase, entrainment and response to triazolam. *Brain Res*. 515: 9-19
- Stokkan, K., Yamazaki, S, Tei, H, Sakaki,Y , & Menaker, M. (2001). Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science*, 291, 490-493.
- Sumova, A., Bendová, Z, Sládek, M, El-Hennamy, R, Laurinová, K, Jindra, & Illnerová, H. (2006). Setting the biological time in central and peripheral clocks during ontogenesis. *FEBS Letters*, 580 , 2836–2842.
- Sumova, A.,Sladek, M., Polidarova, L., Novakova, M.,& Houdek, P.(2012).Circadian system from conception till adulthood. *Progress in brain research*, 199, 83-103.
- Subhadeep, D., Srikumar, B.N., Rao, B.S.S,&Kutty, B.M.(2016). Exposure to short photoperiod regime reduces ventral subicular lesion-induced anxiety-like behavior in Wistar rats. *Physiology & Behavior*.170, 124-132.
- Swanson, L., & Petrovich, G. (1998). What is the amygdala? *Trends Neurosci.* , 323-31.
- Tomotani, B. M., & Oda, G. A. (2012). Diurnos ou Noturnos? Discutindo padrões temporais de atividade. *Revista da Biologia*, 9, 1–6.
- Van Gelder, R. (2004). Recent insights into mammalian circadian rhythms. *Sleep*, 27, 166-171.
- Van Reeth, O., Zhang, Y, Zee, P.C, & Turek, F.W. (1992). Aging alters feedback effects of the activity-rest cycle on the circadian feedback effects of the activity-rest cycle on the circadian clock. *American Journal of Physiology*, 263, 981–986.
- Vilaplana, J., Cambras, T, Campuzano, A, & Diez-Noguera, A. (1997). Simultaneous manifestation of free-running and entrained rhythms in the rat motor activity explained by a multioscillatory system. *Chronobiol. Int*, 14, 9 –18.
- Viswanathan, N. (1999). Maternal entrainment in the circadian activity rhythm of

- laboratory mouse (C57BL/6J). *Physiology and Behavior*, 68, 157–162.
- Walton, J.C., Weil, Z.M., & Nelson, R.J. (2011). Influence of Photoperiod on Hormones, Behavior, and Immune Function, *Front Neuroendocr.*, 32, 303–319.
- Yagita, K., Horie, K., Koinuma, S., Nakamura, W., Yamanaka, I., & Urasaki, A. (2010). Development of the circadian oscillator during differentiation of mouse embryonic stem cells in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 3846–3851.
- Yuen, E.Y., Wei, J., Liu, W., Zhong, P., Li, X., Yan, Z. (2012). Repeated stress causes cognitive impairment by suppressing glutamate receptor expression and function in prefrontal cortex. *Neuron*, 73, 962–977.

10. ANEXOS

10.1 Artigo para submissão

Revista Chronobiology International (Classificação Qualis CAPES para Psicologia A2)

Ritmo circadiano da atividade locomotora, comportamento do tipo ansioso e memória aversiva de ratos adolescentes sob ciclo claro-escuro de 22h

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

Abstract

Adolescence is a crucial period of development, in which the body has a high level of plasticity. It is known that adolescents have a physiological delay in the sleep phase, and, at the present time, spend more time active and exposed to light at night reducing the amount of daily sleep. To investigate the possible effects of this condition on anxiety and aversive memory, adolescent rats underwent the Open Field (CA) and Passive Dodge (EP) tasks under a 22h EC cycle. Objective: To evaluate the effects of a 22h EC cycle on anxiety, aversive memory and locomotor activity in adolescent rats. METHODS: 44 male Wistar rats were divided into two groups: T24, n = 13 (EC 12:12 h) and T22, n = 31 (EC 11:11 h), which were kept under controlled conditions of temperature and humidity, with Water and food at will. The tests took place in the dark phase for T24, on the night of coincidence between the biological night environment of each T22 mouse for 16 animals and the night of non-coincidence for 15 T22 animals. The CA and EP tasks were performed when the animals had between 40 and 60 days. All sessions were recorded for total distance walked, total time, velocity and minimum and maximum anxiety indexes (CA), and latency of platform descent time in PE after 30 min for both groups and after 24 h (For the T24 group) and 22 h (for the T22 group) for evaluation of the short and long term memories, respectively. The locomotor activity was recorded continuously and totalized at 5 min intervals. To compare the means between the groups in the CA test, a 1-way ANOVA was performed for independent samples and the Kruskal Wallis test for PE. The research was approved by CEUA of UFPB-N ° 070713. Results: The animals of the T22h presented two rhythms in the locomotor activity and a mean variance of 4.18 ± 1.18 . All animals in the control group synchronized with EC 24h, showing a mean variance of 9.770833 ± 4.34 . No differences were found between groups for: total distance traveled [F (2.35): 0.247; P = 0.783], speed [F (2.35): 0.251; P = 0.779], maximum thigmotaxis [F (2.35): 0.823; P = 0.447] and minimal thigmotaxis [F (2.35): 0.777; P = 0.926]. We also found no differences between groups for: platform descent latency after 30 min ($\chi^2 (2) = 5.460$, p = 0.065 nor after 24 or 22 h $\chi^2 (2) = 3,233$, p = 0,199). Conclusions: The 22h EC cycle promotes dissociation in the circadian rhythm of locomotor activity without altering the levels of anxiety or impairing the aversive memory of adolescent rats.

Keywords: circadian rhythm; Desynchronization; anxiety; Aversive memory

1. Introdução

Pensar na existência de um tempo “biológico” é compreender que o fluxo temporal é irreversível para a matéria viva (Lestienne, 1988), pois os seres vivos são organismos dinâmicos que sofrem transformações ao longo da vida, seja em escalas de tempo mais longas como no processo do envelhecimento, quanto em escalas periódicas de tempo mais curtas que podem durar meses, dias, horas, sendo este dinamismo essencial para a organização temporal das espécies (Bueno & Wey, 2012).

De acordo com Pittendrigh (1965), a periodicidade diária do ciclo claro/escuro teria sido o principal fator para o surgimento de oscilações circadianas. Com isso, a variação da luminosidade ao longo das 24 horas é considerada o principal agente arrastador, isto é capaz de sincronizar os ritmos circadianos ao ambiente externo.

Os ritmos circadianos são gerados e sincronizados pelo sistema de temporização circadiano (STC). Segundo Pittendrigh (1960), este sistema é formado por uma rede de osciladores integrados, ou acoplados, formados pelos Núcleos Supraquiasmáticos (NSQs) que possuem o papel de mensurar o tempo, ajustando-o ao tempo geofísico, ou seja, aos ciclos ambientais como o claro-escuro, dando origem a uma organização temporal interna.

Um dos modelos mais utilizados para promover a dessincronização forçada interna em ratos é o T22. O mesmo consiste na manutenção de um ciclo claro-escuro simétrico com período de 22 h, ou seja, cada fase com duração de 11h. Ratos mantidos sob essa condição de iluminação expressam dois componentes circadianos simultâneos no ritmo da atividade locomotora, com períodos diferentes. Um componente é arrastado pelo ciclo CE externo, nomeado componente sincronizado à luz, enquanto o outro ocorre em livre-curso com um período superior a 24 h, nomeado componente não sincronizado à luz (Campuzano *et al.*, 1998).

Por possuírem períodos distintos, esses ritmos acabam tendo quatro momentos importantes: - dia de coincidência, quando o dia biológico do rato coincide com o dia do ciclo CE (fase de claro); noite de coincidência, quando a noite biológica do rato coincide com a noite do ciclo CE (fase de escuro); dia de não coincidência, quando a noite biológica do rato coincide com o dia do ciclo CE (fase de claro); noite de não coincidência, quando o dia biológico do rato coincide com a noite do ciclo CE (fase de escuro) (de La Iglesia *et al.*, 2004).

Sabe-se que o T22 é um modelo que provoca uma situação estressante para o animal, dessa forma, se faz necessário investigar os efeitos desse protocolo de dessincronização interna forçada em variáveis neurocomportamentais como ansiedade e memória aversiva durante a adolescência.

Há vários estudos com adolescentes submetidos a protocolos de dessincronização, porém poucos trabalhos foram desenvolvidos com modelos animais. Sabendo que durante a adolescência, a plasticidade sináptica é capaz de sofrer mudanças incríveis, sendo um sistema altamente dinâmico (Casey, 2015), esse trabalho justifica-se pela necessidade de se compreender melhor a maturação do sistema circadiano durante a adolescência, suas relações com a ansiedade e memória aversiva, além da importância de se pensar nas influências dos estímulos ambientais e do contexto social na saúde mental dos adolescentes. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos de um ciclo CE de 22 h sobre o ritmo circadiano de atividade locomotora, ansiedade e memória aversiva de ratos adolescentes.

2. Métodos

2.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos (N=44), peso médio inicial $41,8 \text{ g} \pm 13,14$ e peso final médio $244,63 \pm 11,05688$, sendo 1 grupo experimental com 31 animais que foram mantidos em um ciclo claro-escuro (CE) simétrico de 22h e um grupo controle com 13 animais sob ciclo CE simétrico de 24h. Os ratos permaneceram alojados em gaiolas de polipropileno (30 cm de comprimento x 37cm de largura x 16 cm de altura) individualmente, que eram mantidas no interior de cabines de madeira (Figura 1) com condições controladas de temperatura ($23,17 \pm 1,39$), umidade ($42,08 \pm 8,14$), luminosidade (CE de 22h para os grupos experimentais e de 24h para o grupo controle).

Os procedimentos experimentais duraram aproximadamente 42 dias (Figura 2), estes animais já nasciam nas cabines com o CE de 24 h invertido, com o intuito de preservar a segurança das pesquisadoras, reduzindo às idas à Universidade de madrugada. Quando completaram 21 dias, foi realizado o desmame (dia 1 do experimento) e em seguida, foi feita a pesagem dos animais: (peso médio inicial $41,8 \text{ g} \pm 13,14$) e no dia 42, último dia de experimento, (peso final médio $244,63 \pm 11,05688$).

No dia 1, o ciclo CE do grupo experimental foi ajustado para 22h e teve início o experimento. Após aproximadamente 20 dias de CE 22h, os ratos foram submetidos ao

Teste de Campo Aberto e Reconhecimento de Objetos (dia 21 do experimento), 7 dias depois (dia 28 – Tarefa de Reconhecimento Espacial Associativo) e após 7 dias (dia 35 – Esquiva Passiva (EP), conforme pode ser observado na Figura 1. A EP foi a última tarefa por ser mais estressante para o animal. Todos os animais realizaram os testes no meio da fase escura.

O grupo T22 foi subdividido em 2 grupos que realizaram as tarefas, respectivamente: na noite de coincidência (n=16) e na noite de não-coincidência (n=15). O intervalo entre um teste e outro foi de aproximadamente 7 dias, pois dependia do rato estar ou não, na noite de coincidência e na noite de não-coincidência. Para isto, era necessário fazer a inspeção visual diariamente dos actogramas dos animais.

No dia 42, os animais foram para eutanásia e os tecidos cerebrais da região do hipotálamo anterior, córtex pré-frontal e hipocampo foram recolhidos para análise posterior. Nesse estudo, só serão apresentados os resultados para o Teste de Campo Aberto e Esquiva Passiva.

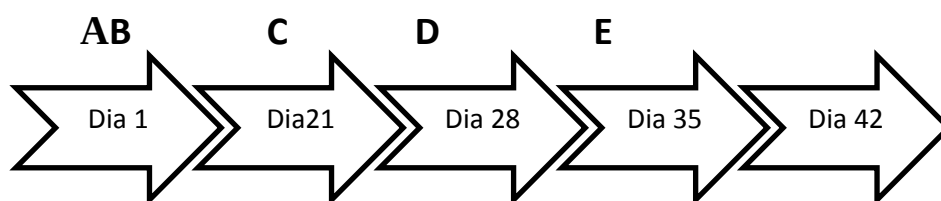


Figura 1. Descrição do Delineamento Experimental. A – Início do Experimento, B – Campo Aberto e Reconhecimento de Objetos, C – Reconhecimento Espacial Associativo, D – Esquiva Passiva, E – Eutanásia.

2.2 Procedimentos experimentais

2.2.1 Campo Aberto

O teste aconteceu no meio da fase escura para o grupo T24, no meio da noite de coincidência para 16 animais do T22h e no meio da noite de não-coincidência para 14 animais do T22h.

No dia do teste, os animais foram trazidos para a sala de comportamento do Laboratório de Estudos em Memória e Cognição – LEMCOG, onde o ruído branco já estava ligado, permanecendo durante todo o teste. Os animais passavam 30 min de habituação na sala antes de iniciarem a tarefa. A temperatura da sala era de aproximadamente 24°C. Cada animal foi colocado individualmente na arena e

observado durante 10 min. No intervalo da troca de um animal para outro o equipamento foi limpo com solução de 5% de álcool e papel toalha, com o intuito de diminuir as pistas olfativas entre um rato e outro.

2.2.2 Esquiva Passiva

O teste ocorreu aproximadamente no dia 35 do experimento. A tarefa consistia em uma sessão de treino com duração de cinco minutos e duas sessões de teste de mesma duração (30 min após o treino para todos os grupos, 24h após o treino para o grupo controle e 22h após o treino para os grupos experimentais) afim de que fossem avaliadas as memórias de curto e longo prazo. No intervalo da troca de um animal para outro o aparato era limpo com solução de 10% de álcool e papel toalha, com o intuito de se minimizar as pistas olfativas entre um animal e outro.

Durante o treino, os animais eram colocados individualmente dentro da caixa da esquiva, em cima de uma plataforma de madeira, se o animal descer com as 4 patas para o assoalho metálico (*step-downavoidance*), o mesmo levará um pequeno choque elétrico de 0,5 μ A. Nas sessões de teste foi avaliado o tempo que o animal levou para descer da plataforma, ou seja, a latência de descida. Todas as sessões foram gravadas através de uma webcam (modelo FaceCam 1020, Genius[®]) pelo software Debut e os vídeos foram posteriormente analisados pelo software de rastreamento *Ethowactcher*(UFSC, Brasil).

2.3 Coleta e análise dos dados de atividade locomotora

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

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

2.4 Procedimentos estatísticos

Através das saídas do Ethowatcher e do Toolbox Autotyping (Patelet *al.*, 2014) foram coletados dados das análises de vídeo para os testes de CA e EP. 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 $p < 0,05$. Para o teste de CA, após teste de normalidade, foi realizada uma ANOVA de uma via para amostras independentes que comparou as médias das medidas comportamentais: distância total percorrida, velocidade média, thigmotáxis máximo e mínimo, entre os 3 grupos.

As médias da latência para descer da plataforma nos testes de EP para memória de curto e longo prazo não apresentaram distribuição normal, logo, foi utilizada a estatística não-paramétrica através do teste de Kruskal Wallis para comparação entre os grupos.

3. Resultados

A distância total percorrida pelos animais foi analisada por meio da ANOVA de uma via para amostras independentes. Não houve diferenças na distância total percorrida [$F(2,35)$: 0,247; $p = 0,783$], conforme pode ser observado na Figura 2.

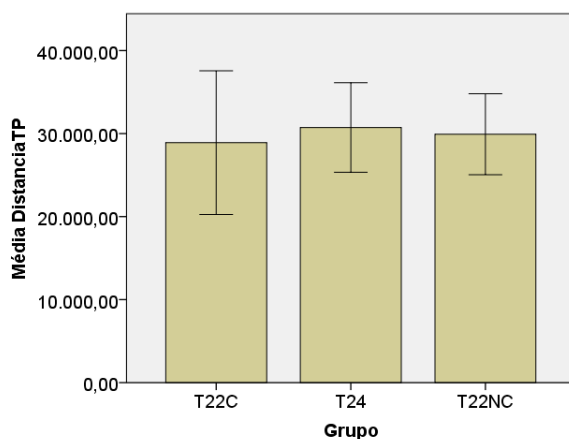


Figura 2. Distância total percorrida em pixels no Teste de Campo Aberto.(Média $\pm$ Desvio Padrão).

A velocidade percorrida (pixels/s) também foi analisada por uma ANOVA de uma via para amostras independentes. Não houve diferença significativa da velocidade [F(2,35): 0,251, $p = 0,779$] entre os grupos, conforme pode ser observado na figura 3.

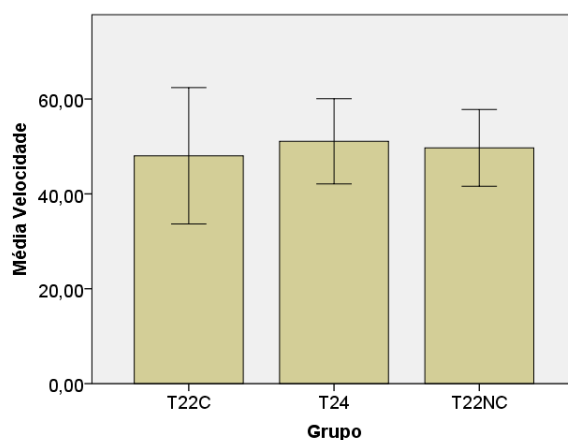


Figura 3 - Velocidade média (pixels/segundo) percorrida entre os grupos na tarefa de Campo Aberto. (Média $\pm$ Desvio Padrão).

As variáveis thigmotaxis máximo e mínimo são medidas comportamentais de ansiedade e demonstram a tendência que o animal apresenta de permanecer nas arestas do campo aberto. Não houve diferenças entre os grupos para thigmotaxis máximo [F(2,35): 0,823, $p = 0,447$] e thigmotaxis mínimo [F(2,35): 0,777, $p = 0,926$], conforme pode ser visto nas figura 4.

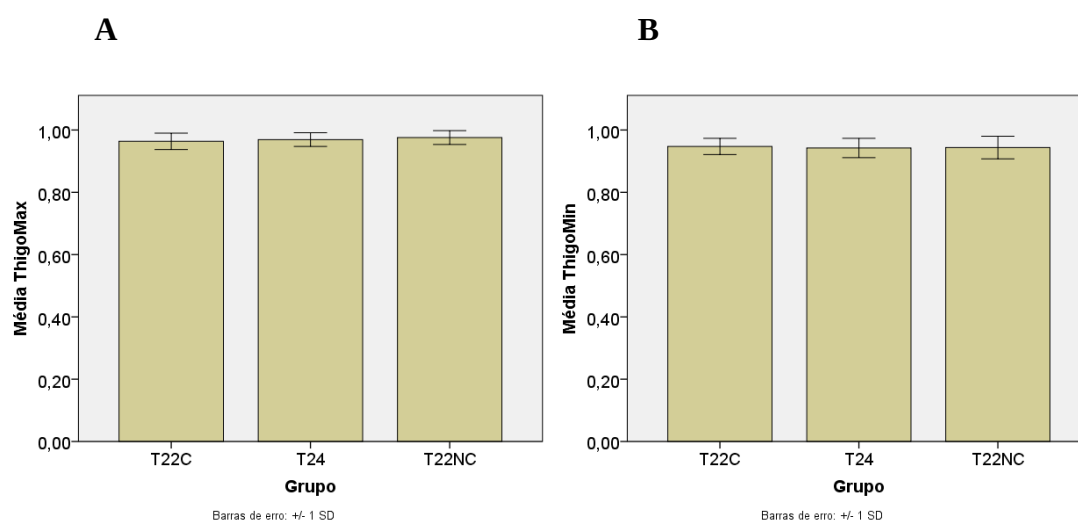


Figura 4. Medida comportamental de ansiedade thigmotaxis máximo (A) e mínimo (B) entre os grupos na tarefa de Campo Aberto. (média $\pm$ Desvio Padrão).

Além da análise das medidas comportamentais, o Toolbox Autotyping (Patelet *al.*, 2014) disponibiliza a representação gráfica do campo aberto para todos os animais analisados, bem como as áreas de maior permanência na arena circular, conforme pode ser observado na figura 5.

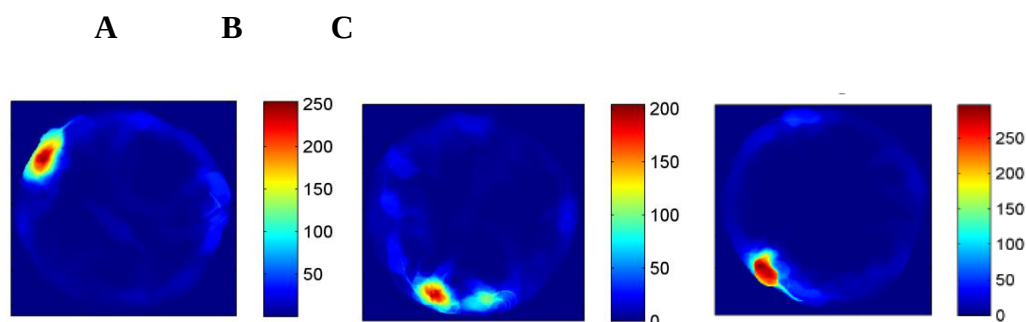


Figura 5. Exemplos das representações gráficas das áreas de maior permanência do animal durante o teste de CA: **A** – T 22 – Ratoque realizou a tarefa na noite de coincidência, **B** – T22h – Rato que realizou a tarefa na noite de não-coincidência e **C**– T24 – rato do grupo controle.

A latência para descer da plataforma referente à memória de curto prazo foi analisada através do teste de Kruskal Wallis. Não foram observadas diferenças entre os grupos ($\chi^2(2) = 5,460$, $p = 0,065$): noite de coincidência (T22C), noite de não coincidência (T22NC) e Grupo controle (T24). O gráfico pode ser visto na figura 6.

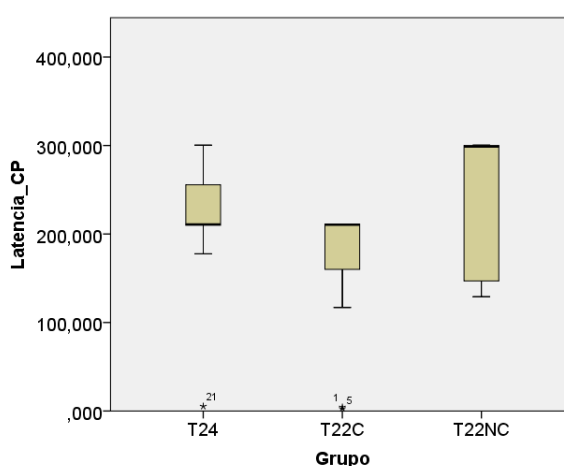


Figura 6. Latência de descida da plataforma durante o teste de Esquiva Passiva para memória de curto prazo. Não houve diferenças na latência de curto prazo entre grupo controle (T24) e grupo experimental (T22) que foi subdividido em: animais que realizaram os testes na noite de coincidência e não-coincidência (Mediana e intervalo interquartílico).

A latência para descer da plataforma referente à memória de longo prazo também foi analisada através do teste de Kruskal Wallis, não sendo encontradas diferenças entre os grupos ($\chi^2(2) = 3,233$, $p = 0,199$), conforme pode ser observado na figura 7.

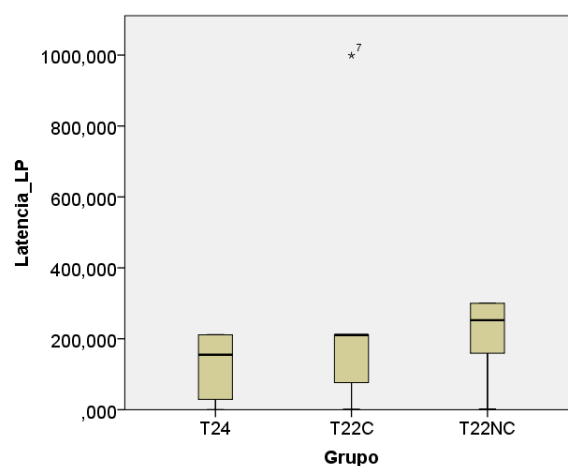


Figura 7. Latência de descida da plataforma durante o teste de Esquiva Passiva para memória de longo prazo. Não houve diferenças na latência de longo prazo entre grupo controle (T24) e grupo experimental (T22) que foi subdividido em: animais que realizaram os testes na noite de coincidência e não-coincidência (Mediana e intervalo interquartilico).

Observou-se que todos os animais do grupo experimental T22 dessincronizaram, pois apresentaram a expressão de dois ritmos simultâneos na atividade locomotora: um com o mesmo período do ciclo CE ($s^2 = 4,60 \pm 1,27$) e outro que se expressou em livre-curso ($s^2 = 3,49 \pm 0,59$). Todos os animais do grupo controle sincronizaram ao CE 24h, demonstrando um ritmo estável sincronizado ao CE ($s^2 = 9,770833 \pm 4,34$). As representações gráficas do ritmo circadiano de atividade locomotora dos animais T22 que realizaram as tarefas na noite de não-coincidência, T22 - noite de coincidência e do Grupo controle, com seus respectivos periodogramas podem ser vistas abaixo.

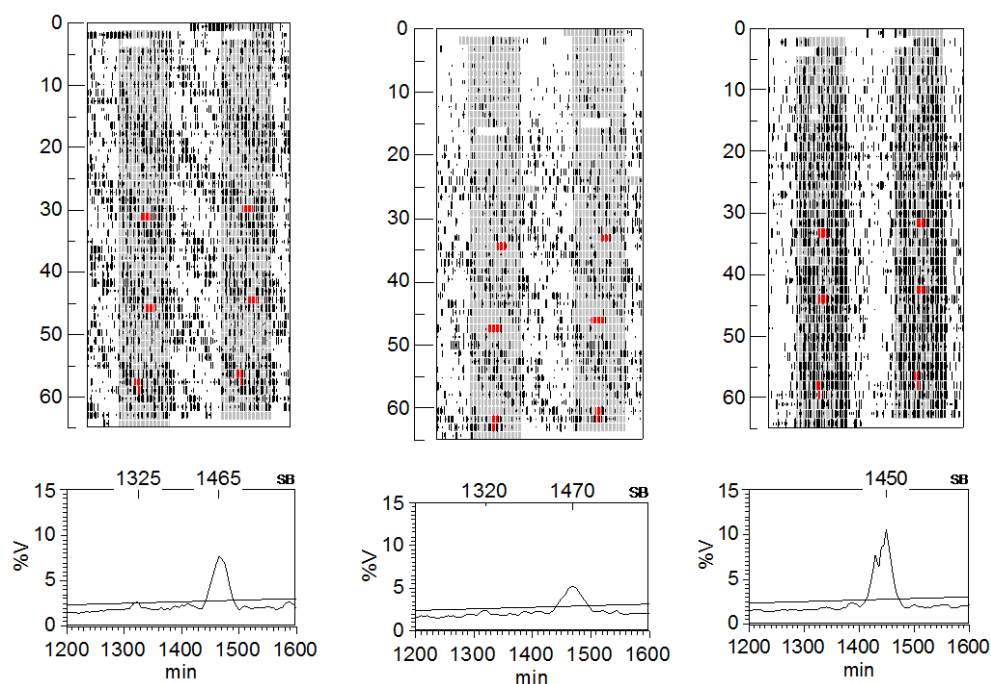


Figura 8. Actogramas de um animal do grupo T22 – Noite de coincidência (esq.), T22 – Noite de não-coincidência (centro) e Grupo Controle (dir.). Os pontos em vermelho situados verticalmente, de cima para baixo, correspondem aos momentos em que foram realizados os respectivos testes comportamentais: 1) Campo aberto 2) Tarefa de Reconhecimento Espacial Associativo 3) Esquiva Passiva. Vale ressaltar que a tarefa de Reconhecimento Espacial Associativo não será discutida nesta dissertação.

4. Discussão

No presente trabalho, os animais sob T22 apresentaram dois ritmos na atividade locomotora, de forma contrária a nossa hipótese inicial. Havíamos previsto que os ratos adolescentes seriam capazes de sincronizar ao ciclo CE de 22h, apresentando apenas um ritmo circadiano na atividade locomotora com o mesmo período do ciclo CE, devido à grande plasticidade que acontece nesta fase do desenvolvimento.

Nossa hipótese inicial teve como base o estudo de Albert *et al.* (2013), no qual foi visto que a exposição precoce a padrões de claro-escuro anormais, durante a maturação do sistema circadiano, gera maior coerência interna ou acoplamento no sistema, induzindo a um único ritmo, indicando que os ratos adolescentes são capazes de utilizar um zeitgeber como referência temporal mais estável.

Além disso, também não foram encontrados prejuízos induzidos pelo CE de 22h nos níveis de ansiedade e na memória aversiva de curto e longo.

Diante disso, podemos sugerir três possíveis explicações para os nossos achados: primeiro, mesmo o STC possuindo uma relativa flexibilidade às mudanças ambientais, o ciclo T22 é suficientemente forte para promover a dessincronização interna e externa em ratos adolescentes; segundo, é possível que apesar de dessincronizados, os ratos consigam se adaptar a esta condição (devido a sua alta capacidade plástica), afinal, as tarefas foram realizadas na noite de coincidência e não-coincidência, e ainda assim, o desempenho dos grupos não apresentou diferenças significativas; terceiro, é possível que essas tarefas não sejam sensíveis aos efeitos da dissociação do ritmo circadiano da atividade locomotora.

Neste trabalho, os ratos adolescentes não apresentaram prejuízos na memória aversiva à curto e longo prazo. Neto *et al.* (2008) também realizaram a EP em ratos adultos sob CE 22h. Assim como no nosso estudo, os animais apresentaram dois ritmos circadianos de atividade locomotora, porém, diferentemente do que encontramos no nosso trabalho, na fase adulta, os ratos apresentaram prejuízos na tarefa de esquiva passiva para memória de curto e longo prazo.

Também não foram encontradas diferenças nos níveis de ansiedade entre os grupos. Bornigeret *al.*(2014) também utilizaram o teste de campo aberto para avaliar a ansiedade em decorrência da exposição precoce de ratos à luz artificial durante a noite (LAN) até o início da adolescência, bem como as influências deste protocolo no fenótipo. Quando adultos, esses animais foram avaliados e os machos apresentaram maior tendência em permanecer no centro do que as fêmeas. Porém, não foram encontradas diferenças na distância total percorrida entre os sexos, nem entre os grupos, indicando que a exposição precoce a LAN não influenciou os níveis de ansiedade avaliados pelo teste de campo aberto na fase adulta.

Considerando o protocolo de dessincronização interna forçada como um modelo que também provoca estresse crônico, encontramos na literatura outros trabalhos que avaliaram o desempenho de ratos adolescentes sob estresse crônico nas tarefas de campo aberto e esquiva passiva.

O teste de Campo Aberto também foi utilizado no experimento de Mello *et al.* (2009), que investigaram se o exercício físico forçado altera déficits de memória causados pelo estresse da privação materna pós-natal. Contudo, os resultados mostraram que a privação materna não teve efeito sobre o comportamento do tipo ansioso entre os grupos.

Embora existissem estudos relatando ansiedade aumentada em animais adultos previamente expostos à estresse crônico durante a adolescência (McCormick & Green, 2013), estudos investigando os efeitos imediatos do estresse crônico em adolescentes, não encontraram aumento nos níveis de ansiedade no desempenho de animais nos testes do labirinto em cruz elevado e no campo aberto (Leussis & Andersen, 2008, McCormick *et al.*, 2008, Eiland *et al.*, 2012; Yuen *et al.*, 2012).

Li *et al.* (2017) estudaram os efeitos da exposição crônica ao hormônio do estresse, a corticosterona (CORT), tanto em animais adolescentes quanto em adultos. O tratamento CORT produziu uma série de efeitos comportamentais e neurobiológicos que diferiram entre os grupos etários. Enquanto os adultos demonstraram redução da preferência pela sacarose, níveis de ansiedade aumentados e comprometimento cognitivo, os ratos adolescentes apresentaram maior preferência pela sacarose e níveis de ansiedade mais baixos.

Dentro desse contexto, ratos adolescentes parecem apresentar boa capacidade adaptativa aos modelos experimentais que geram estresse crônico, pois também não foram encontrados prejuízos cognitivos e emocionais nos estudos supracitados que utilizaram o teste de campo aberto e a esquiva passiva, corroborando com o nosso trabalho.

A maturação das funções comportamentais do córtex pré-frontal, como o controle inibitório, ocorre tanto em humanos como em ratos, durante a adolescência, funções estas que são dependentes das interações do córtex pré-frontal com outras partes do sistema límbico como a amígdala basolateral, podendo afetar a reestruturação e a modulação hormonal do comportamento (Juraska & Willing, 2017).

Como no nosso trabalho não foram encontrados prejuízos cognitivos e emocionais através dos resultados dos testes de campo aberto e esquiva passiva, além da possibilidade das tarefas não serem sensíveis aos efeitos da dissociação do ritmo circadiano, outra possibilidade surge a partir da capacidade plástica do córtex pré-frontal que se encontra em processo de maturação das funções comportamentais durante a adolescência.

Essa hipótese justificaria, em parte, os nossos achados, tendo em vista que, tanto o sistema circadiano do rato adolescente quanto as funções comportamentais mediadas pelo córtex pré-frontal, por encontrarem-se em pleno estágio de desenvolvimento, ainda que em condições de dessincronização, devido a importante capacidade plástica, podem ser capazes de se adaptar às mudanças de claro-escuro ocorridas nessa época.

Sugerimos a realização de novos estudos utilizando o modelo T22 ao longo da ontogênese, visando uma melhor compreensão dos efeitos da dessincronização interna forçada durante o desenvolvimento do sistema circadiano, bem como suas implicações nos processos cognitivos e emocionais, a curto, médio e longo prazo.

5. Conclusão

O modelo T22 de dessincronização interna forçada é capaz de promover a dissociação do ritmo circadiano na atividade locomotora de ratos Wistar adolescentes, porém não induz prejuízos em algumas tarefas amígdala-dependentes que avaliam ansiedade e memória aversiva, provavelmente devido à alta capacidade plástica e adaptativa do organismo durante a adolescência.

Referências

- Albert, N., Silva, C., Díez-Noguera, A., & Cambras, T. (2013). Different adaptation of the motor activity rhythm to chronic phase. *Behavioural Brain Research*, 252, 347-355.
- Borniger, J. C., McHenry, Z. D., Salloum, B. A., & Nelson, R. J. (2014). Exposure to dim light at night during early development increases adult. *Physiology & Behavior*, 133, 99–106.
- Bueno, C., & Wey, D. (2012). Gênese e ontogênese do ritmo de sono/ vigília em humanos. *Revista da Biologia*, 9, 62–67.
- Campuzano, A., Vilaplana, J., Cambras, T., & Díez-Noguera, A. (1998). Dissociation of the rat motor activity rhythm under T cycles shorter than 24 hours. *Physiol Behav* 1998;63:171–6., 63, 171–176.
- Casey, B. J. (2015). Beyond Simple Models of Self-Control to Circuit-Based Accounts of Adolescent Behavior. *Annual Review of Psychology*, 66, 295-319.
- de la Iglesia, H., Cambras, T., Schwartz, W.J., & Díez-Noguera, A. (2004). Forced desynchronization of dual circadian oscillators within the rat suprachiasmatic nucleus. *Curr Biol.*, 14, 796-800.
- Eiland, L. (2012). Chronic juvenile stress produces corticolimbic dendritic architectural remodeling and modulates emotional behavior in male and female rats. *Psychoneuroendocrinology*, 37, 39–47.
- Juraska, J. M., & Willing, J. (2016). Pubertal onset as a critical transition for neural development. *Brain Research*, 1-8.
- Leussis, M. (2008). Is adolescence a sensitive period for depression? Behavioral and

neuroanatomical findings from a social stress model. *Synapse*, 62, 22–30.

Lestienne, R. (1988). From physical to biological time. *Mech Ageing Dev*, 43, 189–228.

Li, J., Xie, X., Li, Y., Liu, X., Liao, X., Su, Y.-A., & Si, T. (2017). Differential Behavioral and Neurobiological Effects of Chronic Corticosterone Treatment in Adolescent and Adult Rats. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10, 1–16.

McCormick, C. (2008). Effects of chronic social stress in adolescence on anxiety and neuroendocrine response to mild stress in male and female rats. *Behav. Brain Res.*, 187, 228–238.

McCormick, C. (2013). From the stressed adolescent to the anxious and depressed adult: investigations in rodent models. *Neuroscience*, 242–257.

Mello, P. B., Benetti, F., Cammarota, M., & Izquierdo, I. (2009). Physical exercise can reverse the deficit in fear memory induced. *Neurobiology of Learning and Memory*, 364–369.

Nader, K., Schafe, G., & Le Doux, J. (2000). Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature* 2000, 722–6.

Neto, S. P., Carneiro, B. T., Valentinuzzi, V. S., & Araújo, J. F. (2008). Dissociation of the circadian rhythm of locomotor activity in a 22 h light–dark cycle. *Physiology & Behavior*, 94, 523–527.

Pittendrigh, C. (1960). Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 25, 159–184.

Pittendrigh, C. S. (1965). On the Mechanism of the Entrainment of a circadian Clock. In D. Arm, *Sciences and the Sixties* (pp. 96–111). Albuquerque: Proc. Cloudcroft Symp.

Smale, L., Michels, K.M., Moore, R.Y., Morin, L.P. Destruction of the hamster serotonergic system by 5,7-DHT: effects on circadian rhythm phase, entrainment and response to triazolam. *Brain Res.* 1990; 515: 9–19

10.2 Certidão CEUA



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



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIDÃO

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

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

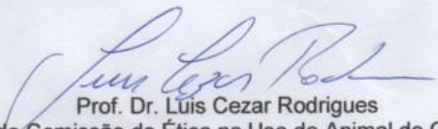
Orientando(a): **Crhistiane Andressa da Silva, (Pós Doutorado)**

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

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

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

Atenciosamente,



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

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