

SEBASTIÃO PACHECO DUQUE NETO

**EFEITOS DA DISSOCIAÇÃO DO RITMO CIRCADIANO DA ATIVIDADE
LOCOMOTORA SOBRE A ATIVIDADE EXPLORATÓRIA, MEMÓRIA,
ANSIEDADE E DEPRESSÃO EM RATOS**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal do Rio Grande do Norte, para
obtenção do título de Mestre em
Psicobiologia.

NATAL, 2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

SEBASTIÃO PACHECO DUQUE NETO

**EFEITOS DA DISSOCIAÇÃO DO RITMO CIRCADIANO DA ATIVIDADE
LOCOMOTORA SOBRE A ATIVIDADE EXPLORATÓRIA, MEMÓRIA,
ANSIEDADE E DEPRESSÃO EM RATOS**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal do Rio Grande do Norte, para
obtenção do título de Mestre em
Psicobiologia.

ORIENTADOR: Prof. Dr. John Fontenele Araújo

NATAL, 2006

Título: “EFEITOS DA DISSOCIAÇÃO DO RITMO CIRCADIANO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA SOBRE A ATIVIDADE EXPLORATÓRIA, MEMÓRIA, ANSIEDADE E DEPRESSÃO EM RATOS”

Autor: SEBASTIÃO PACHECO DUQUE NETO

Data da Defesa: 02 de junho de 2006.

Banca Examinadora:

Prof. John Fontenele Araújo (UFRN)

Profa. Débora Hipólida (UNIFESP)

Profa. Alessandra Mussi Ribeiro (FAARN)

***“Tarvez por iguinorância ou mardade das pió, furaro os óio
do assum preto pra ele assim cantá mio”***

Patativa do Assaré

AGRADECIMENTOS

Não saberia aqui escalar ninguém em ordem de importância para agradecê-las.... Mas meus pais, que são dois grandes amigos que tenho na vida, o que seria hoje sem eles? Não falo na concepção, falo no Amor, dedicação, respeito, apoio incondicionais SEMPRE. Agradeço a vocês, meus pais, por tudo que tenho e sou. Meu respeito por vocês é sagrado, meu Amor por vocês é infinito.

Quero agradecer à minha irmã Cristiane, que foi sempre minha segunda mãe, porém a mais severa; devo a você tanta coisa, Cris, que só na próxima pra te pagar... Por isso te amo, tanto, que sinto sua falta e penso em você todos os dias. Obrigado, Cris.

Quero agradecer minha irmãzinha Michelle, que se mistura nos meus sentimentos como minha melhor amiga, minha conselheira, minha questionadora das coisas da vida. Sua inteligência, docura, força e Amor me enobrece apenas por ser seu irmão. Porquê você é Luz, minha irmã, obrigado!

Quero fazer um agradecimento especial ao meu orientador, Prof. John, que intercala o papel de professor com o papel de amigo. John, agora entendo porquê todos lhe agradecem falando de sua paciência! Obrigado pelos ensinamentos, apoio e respeito nessa etapa tão importante para mim. Obrigado pela atenção nos momentos difíceis de minha vida pessoal. Obrigado por me aceitar como orientando duas vezes... À você, elemento-chave, com todo meu respeito e admiração, dedico meus esforços.

Ao elenco de seres maravilhosos envolvidos no meu crescimento: Tio Zi, Tia Ceça, minha Tia Zilda, minha Tia Ednéia, e você Iara, só tenho que lhes agradecer e dedicar Amor! Ao Grupo Vanguarda, pelas emanções, Paz e Harmonia! D. Neide! Obrigado pelo respeito e cuidado comigo... Sou da família, né? D. Graça, obrigado por me ter na sua casa; sei que sempre fui mais do que um pensionista.

Quero agradecer à Prof^a Sílvia Moraes Arruda, minha primeira orientadora na Anatomia da UFPE, hoje minha amigona Sílvia; quanta coisa aprendi com você, minha querida... Obrigado pela força! Esse é um recado do seu Sebastian.

Quero agradecer à Prof^a Belmira, da Fisiologia da UFPE, pelo incentivo para que eu viesse para Natal. Logo compreendi aquela nossa conversa sobre realizar sonhos...

Verónica Valentinuzzi! Sempre sábia e atenciosa, sempre próxima, num misto de orientadora e amiga; que orgulho de tê-la por perto. Sei que posso sempre contar com você. Nossa ligação é forte, professora! Muito obrigado por tudo.

Com Prof^a Miriam Stela redefino meus conceitos de doçura e atenção. Obrigado por suas orientações na minha Qualificação; obrigado por sempre ter me recebido no seu laboratório, eu sempre querendo fazer algo com o hipotálamo de um ou de outro...

Meu amigo e colega Breno, companheiro durante todos os experimentos, amigo de muitos bate-papos. É com muito orgulho que posso dizer que você é meu amigo e colega! Valeu, Breno! Valeu, mesmo!

Quero agradecer à Graça, à minha antiga turma de 2002 pela torcida para o meu regresso, e à minha turma de 2004, aos colegas do LabCrono! Minha amiga Fabiana (Binha), pelos debates, meus amigos José, André e Rosi, todos me recebendo sempre de braços abertos. À você, Tati, pelas palavras de incentivo e paciência pelo uso do seu computador!

Quero agradecer aos Professores da Pós-Graduação pelos ensinamentos e elegância no convívio e na construção do conhecimento. Sinto muito orgulho de minha formação. Obrigado pelo incentivo e respeito. Que eu possa correspondê-los.

Agradeço aos meus amigos de longa data, em especial à vocês, Berg, Fábio, Ricardo, Guilherme; às minhas amigas Ana Maria, Geo, Greyce, Lauana, Malu, Patrícia, Rossana Fisher, não tenho palavras, mas vocês sabem das coisas...

Gostaria de dedicar um momento especial a você, Tony, meu colega, amigo e companheiro de todas as horas... Faz seis anos que minha vida mudou desde quando nos encontramos novamente. Por tudo o que você é pra mim e eu sou pra você, por sua sabedoria e prumo nas intempéries pelas quais passamos, eu lhe agradeço. Agradeço pelo orgulho que você sente por mim. Agradeço a você as mensagens que envia pra mim, você que é um canal aberto para tudo o que é Bom. Obrigado por tudo, e que continuemos a caminhada sempre juntos. Isso é um decreto, Tony.

Agradeço finalmente à CAPES e FAPERN, pelo apoio financeiro, sem o qual não estaria me candidatando aqui ao título de Mestre em Psicobiologia pelo Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	
ABSTRACT	
1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	17
2.1. OBJETIVO GERAL	17
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1. Testes e Procedimentos Técnicos	19
3.1.1. Campo Aberto	19
3.1.2. Labirinto em Cruz Elevada (LCE)	20
3.1.3. Esquiva Passiva	21
3.1.4. Reconhecimento de Objetos	21
3.1.5. Nado Forçado	23
3.2. Comportamentos Avaliados	23
3.2.1. Atividade Exploratória	23
3.2.2. Ansiedade	23
3.2.3. Depressão	24
3.2.4. Memória	24
4. ANÁLISE DOS DADOS	25
5. RESULTADOS	26
5.1. Atividade Exploratória	27
5.2. Ansiedade	27
5.3. Depressão	30
5.4. Memória	30
6. DISCUSSÃO	34
7. CONCLUSÕES	47
8. BIBLIOGRAFIA	48

RESUMO

A expressão rítmica de parâmetros fisiológicos e comportamentais é gerada endogenamente e modulada pelo ciclo claro-escuro (CE). Em humanos, perturbações nas relações de fase dos ritmos entre si, e com as pistas ambientais, causadas por distúrbios do sono, trabalho em turno, *jet lag*, ou desordens afetivas, podem gerar desordens temporais internas com alterações comportamentais e autonômicas relacionadas ao humor, cognição, metabolismo ou função cardiovascular, entre outras. Alguns autores tentam explicar esse fenômeno através do modelo obtido em ratos, em que a imposição de ciclo CE simétrico de 22 horas acarreta a dissociação do ritmo circadiano da atividade locomotora em dois componentes, em que um é sincronizado ao ciclo CE imposto e o outro segue em livre-curso. A proposta desse trabalho é avaliar em ratos os efeitos da dissociação do ritmo circadiano da atividade locomotora sobre a atividade exploratória e desempenho em testes que avaliam memória, ansiedade e depressão, em comparação com ratos em ciclo CE de 24 horas.

PALAVRAS-CHAVE: Ritmos Circadianos, Dissociação, Atividade Exploratória, Ansiedade, Depressão, Memória.

ABSTRACT

The rhythmic expression of physiological and behavioral patterns is endogenously generated and modulated by the light-dark (LD) cycle. In humans, perturbations in the phase relationship among rhythms and to environmental cues, by sleep disturbance, shift work, jet lag or affective disorders can also lead to internal temporal disorders and disturbance in diverse behavioral and autonomic variables related to mood, cognition, metabolism or cardiovascular functions, between others. Some authors attempt to explain this phenomena by a model in rat that a imposed symmetrical LD cycle os 22 hours, promove an dissociation of the circadian rhythm of locomotor activity characterized by two components, one synchronized by LD cycle and another free running. The purpose of this work is to evaluate the effect of the dissociation of the circadian rhythm of the locomotor activity in exploration activity, memory performance, anxiety and depression-like behavioral animal models tests.

KEY WORDS: Circadian Rhythms, Dissociation, Exploratory activity, Anxiety, Depression, Memory.

1. INTRODUÇÃO

As variáveis fisiológicas e comportamentais, como o ciclo sono-vigília, as secreções hormonais, a atividade locomotora, as funções autonômicas, os estados afetivos, o desempenho cognitivo, todas apresentam um padrão rítmico na sua expressão, e são conhecidas como ritmos biológicos. Os ritmos biológicos são gerados endogenamente e obedecem as modulações sincronizadoras do ambiente, estando presentes do nível celular até o sistêmico (Marques e Menna-Barreto, 2003). O ciclo claro-escuro (CE) é considerado o principal fator ambiental para que ocorra o ajuste e sincronização dos ritmos circadianos das funções biológicas com as flutuações cíclicas do ambiente externo (oscilação com período próximo de 24 horas). Porém, o padrão rítmico do organismo não depende necessariamente de um ciclo do ambiente externo para se expressar. Isso pode ser visto quando as condições do ambiente são mantidas constantes (ausência de pistas ambientais sincronizadoras). Nessas condições o organismo expressa seu ritmo endógeno, com um período próprio, o que caracterizamos como livre-curso (Marques, Golombek e Moreno 2003).

O padrão rítmico das funções biológicas se deve a processos de caráter adaptativo que permitem às funções do organismo se expressarem em momentos mais propícios, o que maximiza o potencial da resposta desse organismo. Dessa forma, perturbações dos ritmos circadianos de várias funções podem levar a diversos distúrbios orgânicos e comportamentais, como visto nos trabalhadores em turnos (Knutson, 2003), na depressão (Bunney e Bunney, 2000), após viagens transmeridianas, bem como nos distúrbios do sono e suas conseqüências no desempenho cognitivo e humor (Monk, 1997), no metabolismo (Karlsson, *et al.*, 2003), na função cardiovascular (Mitani, *et. al.*, 2005), ou na função respiratória (Chen e Tang, 1989).

O *Sistema de Sincronização Circadiana* (Araújo, 2005) é o responsável pelas oscilações dos fenômenos biológicos circadianos, promovendo uma relação de fase estável entre as funções biológicas e os ciclos ambientais (relação de fase externa), bem como das funções biológicas entre si (relação de fase interna). As respostas fisiológicas e comportamentais para serem eficientes dependem da estabilidade dessas

relações de fase. Ao mesmo tempo, o sistema de sincronização circadiana permite ao organismo se ajustar a modificações do ambiente, o que caracteriza um perfil de plasticidade do sistema, embora obedecendo a limites específicos de sincronização, que caracteriza a estabilidade do sistema de sincronização circadiana. A partir das relações de fases que as funções biológicas de um organismo possuem entre si, se estabelece uma seqüência temporal harmônica na sua expressão rítmica, o que conhecemos como *Ordem Temporal Interna* – OTI (Marques, 2002). Por outro lado, as perturbações dos ritmos circadianos podem levar a *desordens temporais internas* (Borbély, *et al.*, 2001; Rajaratnam e Arendt, 2001; Marques, Golombek e Moreno, 2003).

Enquanto que na condição de ordem temporal interna funções biológicas mutuamente sincronizadas expressam períodos de oscilação semelhantes entre si, na condição de desordem temporal interna essas funções tendem a expressar períodos diferentes, refletindo que elas são controladas por osciladores endógenos distintos. Nessa condição, essas variáveis se apresentam dessincronizadas entre si. A esse fenômeno chamamos *dessincronização interna*, que se caracteriza pelo fato de dois ou mais ritmos circadianos, antes mutuamente sincronizados, passarem a expressar períodos diferentes entre si (Marques, 2002; Marques, Golombek e Moreno 2003).

A dessincronização interna pode ser classificada em espontânea, transitória e forçada, dependendo do fenômeno que a causou. A dessincronização interna *espontânea* é vista quando o indivíduo é submetido a condições constantes, que se caracteriza pelo desacoplamento de duas ou mais variáveis, mudando constantemente suas relações de fase. No caso da dessincronização interna *transitória*, o deslocamento da fase do ciclo ambiental faz com que os ritmos do indivíduo se tornem dessincronizados, uma vez que haverá aqui uma quebra transitória de relação de fase externa; tais episódios ocorrem em mudanças bruscas de fuso horário, como pode ser encontrado nas viagens transmeridianas, levando aos efeitos *jet lag* (Chiesa e Golombek, 1999).

Em condições experimentais quando o indivíduo é exposto a ciclos CE com período diferente de 24 horas, pode ser visto que o ciclo sono-vigília oscila com período maior que 28 horas ou menor do que 22 horas. Embora podendo haver

diferenças interindividuais marcantes com relação à duração do período (Aschoff, 1998), disso resulta a separação entre o ritmo de temperatura corporal, que oscila com período menor que 24 horas, e o ciclo sono-vigília, que se apresenta dessincronizado em relação ao mínimo da temperatura corporal. A esse fenômeno caracterizamos por uma dessincronização interna *forçada* (Aschoff, 1988a, 1988b).

Vários trabalhos apontam uma modulação circadiana dos processos envolvidos na cognição, como nos processos de aprendizagem e memória. O bom desempenho para se realizar determinadas tarefas é determinado pela hora do dia, o que pode ser visto em humanos (Monk *et al.*, 1997), em roedores (Valentinuzzi *et al.*, 2001; Chaudhury e Colwell, 2002; Ralph, M. R. *et al.*, 2002; Valentinuzzi, Menna-Barreto e Xavier, 2004), aves (Valentinuzzi e Ferrari, 1997) e em primatas não-humanos (Valentinuzzi *et al.*, 2005). Por exemplo, algumas tarefas aprendidas após uma sessão de treino são melhor executadas em horários que sejam múltiplos de 24 horas do horário do treino, ou seja, o desempenho do indivíduo será melhor 24 horas após o aprendizado da tarefa, do que 12 horas após. Esse padrão rítmico também foi encontrado em camundongos mantidos em fotoperíodo esqueleto, durante protocolo de condicionamento contextual de medo (Valentinuzzi *et al.*, 2001, 2002).

Por outro lado, em estudos realizados com humanos e animais, perturbações da ritmicidade circadiana do ciclo de atividade-reposo, levam ao comprometimento do desempenho cognitivo. Nos protocolos de privação de sono são vistos déficits de memória, avaliada por meio de diferentes testes, tanto para roedores como para humanos. Estudos apontam que privação crônica de sono e irregularidade do ciclo sono-vigília, devido às demandas escolares, está associada ao comprometimento do desempenho escolar em estudantes universitários (Medeiros *et al.*, 2001). O comprometimento das funções cognitivas devido a perturbações do ritmo circadiano de atividade-reposo, também são causas comuns, por exemplo, de acidentes de trabalho e de trânsito, o que coloca em riscos o sujeito e a sociedade (Akerstedt *et al.*, 2005; Rosekind, 2005).

No trabalho de Almondes e Araújo (2003), pode ser visto que numa população de estudantes universitários, a irregularidade do ciclo sono-vigília está relacionada com o surgimento de estado de ansiedade. Alterações circadianas do humor,

perturbações do sono e o envolvimento de alterações de outros ritmos circadianos são encontrados também em indivíduos com depressão (Wirz-Justice, 2006).

Distúrbios do comportamento e humor, sinais e sintomas de depressão, sensação subjetiva de mal-estar, distúrbios do sono, podem ser encontrados agudamente em indivíduos que realizam viagens transmeridianas (Chiesa e Golombek, 1999). De forma crônica esses mesmos distúrbios somados a desordens autonômicas, ou metabólicas como obesidade e / ou diabetes, também afetam trabalhadores em turno e turno noturno (Costa, 1996; Karlsson *et al.*, 2003; Mitani *et al.*, 2005). Há trabalhos que mostram que nesses indivíduos há uma maior incidência de câncer se comparados à população em geral (Davis *et al.*, 2001). Em trabalho realizado com ratos que foram submetidos a mudanças súbitas do ciclo CE, os animais que levaram mais tempo para resincronizar ao novo período de CE apresentaram maior nível de stress, representado pela elevação da concentração plasmática de corticosterona (Weibel, Maccari e Van Reeth, 2002). Dados semelhantes em relação a corticosterona são encontrados em ratos e camundongos após privação prolongada de sono paradoxal (Suchecki e Tufik, 2000).

Os ritmos circadianos possuem um substrato gênico que permite sua expressão com a periodicidade específica para cada espécie e função (Hasting, Reddy e Marywood, 2003). A gênese das alterações dos ritmos circadiano e ultradiano do ciclo sono-vigília, bem como no ritmo circadiano do cortisol e da temperatura, alterações estas que são encontradas nos indivíduos com depressão, além de variações diárias do humor, podem estar sob o controle dos genes envolvidos na sincronização e ritmicidade circadiana (Bunney e Bunney, 2000).

Alguns tipos celulares, como as células de tecido vascular, do tecido hepático e do tecido pulmonar quando mantidos em cultura, sem receber informação neural ou modulação humoral, apresentam oscilação periódica na expressão gênica (Hasting *et al.*, 2003). O sistema de sincronização circadiano não seria formado apenas por um oscilador (estrutura discreta), mas sim por múltiplos osciladores: por osciladores circadianos sincronizados por uma pista ambiental e osciladores circadianos periféricos sincronizados por sinais internos neurais ou humorais (Araújo, 2005), onde através de um processo harmônico de acoplamento entre esses osciladores, se daria a

manutenção da organização temporal do sistema circadiano. O mecanismo pelo qual esse fenômeno de acoplamento ocorre ainda não está estabelecido (Araújo e Marques, 2003).

Os núcleos supraquiasmáticos (NSQ), localizados bilateralmente ao terceiro ventrículo no hipotálamo, são considerados como sede da geração e controle endógeno da ritmicidade circadiana observada nas funções biológicas. Trabalhos sobre a expressão ou mutação de genes que estão envolvidos na geração do padrão rítmico de atividade de células do NSQ, aumentam a lista de evidências do papel dessas estruturas neurais na expressão dos ritmos circadianos. Esses genes mantêm sua expressão rítmica sob escuro constante, respondem a mudanças de fase do ciclo CE, e quando apresentam mutações, provocam alterações no período do ritmo circadiano de atividade-reposo do indivíduo (Lee, Heather e Leahman, 2003).

O NSQ pode ser dividido anatomicamente em uma região ventrolateral e uma dorsomedial, com neuroquímica e funcionalidade distintas (Moore e Silver, 1998; Costa *et al.*, 1998). A porção ventrolateral recebe informações fóticas provenientes da retina, através do trato retinohipotalâmico (TRH), e informações que partem do folheto intergeniculado (FIG) do tálamo e chegam a essa região através do trato genículo-hipotalâmico (Leak e Moore, 2001), bem como informações possivelmente moduladoras dos núcleos da rafe (Cavalcante *et al.*, 2002). Suas principais eferências se dirigem à porção dorsomedial do núcleo, e outras áreas hipotalâmicas como a zona subparaventricular (ZSPV). Os estudos neuroquímicos do NSQ mostram que a região ventrolateral apresenta predominantemente neurônios cujos neurotransmissores são o polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP) e o peptídeo liberador de gastrina (GRP). Aton *et al.* (2005) demonstram que o VIP tem o papel de manter a ritmicidade circadiana e a sincronização de neurônios do NSQ.

A região dorsomedial recebendo informações modulatórias principais da região ventrolateral mantém relações eferentes mais diretas com áreas hipotalâmicas; possui como principal neurotransmissor a vasopressina (VP). Lee *et al.*, (2003) apresentam em sua revisão vários dados que apontam que existe um ritmo endógeno da expressão dos genes envolvidos na ritmicidade circadiana, como os genes *Per1*, *Per2* e *Bmal1*, nessa região, o que foi evidenciado em experimentos onde ratos mantidos em escuro

constante, apresentando-se em livre-curso, expressaram ritmicidade neuroquímica apenas nessa região.

Esses dados em conjunto nos levam a identificar que no NSQ existe uma atividade sincronizada 1) entre as próprias células da região ventrolateral, 2) entre as próprias células da região dorsomedial, e 3) entre os neurônios da região ventrolateral, com os da região dorsomedial (Miller, 1998).

O modelo da dissociação do ritmo circadiano da atividade locomotora em ratos, desenvolvido pelo Grupo de Cronobiologia da Universidade de Barcelona, parece ser um modelo experimental que se aproxima do que ocorre com a dessincronização interna. Nesse modelo, ratos jovens e adultos submetidos a ciclos CE simétricos de 22 horas (T22) apresentam simultaneamente dois componentes do ritmo circadiano de atividade locomotora, onde um componente está sincronizado com o ciclo CE, e o outro segue em livre-curso, com período endógeno maior que 24 horas. Esse fenômeno é visto como sendo consequência da perda do acoplamento entre os osciladores circadianos (Vilaplana *et al.*, 1997).

Os dois componentes encontrados nessa condição são dependentes de alguns fatores como o nível de atividade motora do animal e intensidade luminosa, como visto por Cambras *et al.* (2000). Nesse estudo os animais que tinham a presença da roda de atividade na gaiola, e que apresentaram maior atividade motora se mantiveram sincronizados ao ciclo CE imposto, sugerindo um maior acoplamento entre os osciladores. Também em estudo com humanos adultos e idosos, foi observado que a intensidade luminosa e o nível de atividade física contribuem para o nível de sincronização entre os osciladores circadianos (Monk, 2000).

Uma vez que a intensidade luminosa pode afetar o nível de acoplamento entre os osciladores, o fotoperíodo ao qual o animal se encontra pode apresentar papel importante na manutenção desse nível de acoplamento. Essa hipótese foi testada no trabalho de Cambras, Chiesa, Araújo e Díez-Noguera (2004), onde um grupo de ratos foi submetido a ciclos CE com período de 22 horas (T22) e outro grupo ao período de 23 horas (T23). Nesse trabalho o tamanho do fotoperíodo variou entre subgrupos desde 23% a 77% do ciclo com luz. Os autores encontraram que em fotoperíodos longos o componente sincronizado com o ciclo CE é mais evidente, enquanto que o

componente em livre-curso é mais evidente em fotoperíodos de dias curtos. Esses dados podem mostrar níveis hierárquicos distintos de sincronização do sistema de sincronização circadiano com os ciclos ambientais de CE, o que reforça mais uma vez sua característica de estabilidade e plasticidade.

Horacio De La Iglesia *et al.* (2004) submetendo ratos albinos machos ao protocolo de dissociação e analisando a expressão dos genes *Per1* e *Bmal1* no NSQ desses animais, mostra que os dois componentes rítmicos da atividade locomotora encontrados durante essa condição, estão correlacionados com a atividade distinta das regiões ventrolateral e dorsomedial do NSQ. Esses dados fornecem informações importantes à cerca do papel funcional dessas regiões do NSQ durante o fenômeno de dissociação do ritmo circadiano da atividade locomotora. Em trabalhos clássicos de Moore e colaboradores (Moore e Silver, 1998; Leak e Moore, 2001), foram mapeadas as aferências e eferências do NSQ de ratos a importantes regiões do hipotálamo, tálamo e do prosencéfalo basal, como o núcleo paraventricular do hipotálamo, núcleo paraventricular do tálamo, zona subparaventricular, sistema límbico, regiões estas envolvidas na regulação de funções autonômicas e comportamentos motivacionais complexos, que podem estar relacionadas com as disfunções encontradas na desordem temporal interna.

O modelo de dissociação da ritmicidade circadiana da atividade locomotora por ciclo de T22 parece ser um modelo animal para estudo da desordem temporal interna. Como em algumas situações como no trabalho noturno e em turnos, no *jet lag*, humanos apresentam dessincronização interna com alterações comportamentais tais como na memória e no comportamento afetivo e humor, nosso trabalho tem o objetivo de avaliar se ratos com dissociação do ritmo circadiano da atividade locomotora também apresentam alterações nestes comportamentos.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil comportamental de ratos albinos adultos machos durante a condição de dissociação do ritmo circadiano de atividade locomotora em ciclo CE simétrico de 22 horas (T22, CE 11:11) – Modelo de Dissociação.

2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

2.2.1. Avaliar o efeito do Modelo de Dissociação sobre a atividade exploratória;

2.2.2. Avaliar o efeito do Modelo de Dissociação sobre comportamentos de ansiedade;

2.2.3. Avaliar o efeito do Modelo de Dissociação sobre comportamentos de depressão;

2.2.4. Avaliar o efeito do Modelo de Dissociação sobre a memória contextual de medo e de reconhecimento de objeto.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste experimento utilizamos ratos albinos Wistar adultos machos provenientes do Biotério do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco – Recife. Os animais foram mantidos em temperatura controlada ($21^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), com água e comida (Purina®) *ad libitum*, alojados em duplas, com exceção para 4 (quatro) animais que foram mantidos 1 (um) por gaiola. As gaiolas foram separadas em número de 4 e após serem enumeradas e etiquetadas, acondicionadas em caixas com sistema de iluminação, refrigeração e circulação de ar independentes, com seu interior isolado visual e acusticamente da sala de experimentos e do laboratório. Os animais foram separados em dois grupos:

- A) Grupo controle (T24) mantido em ciclo CE de 24 horas com a luz acendendo às 18:00h e apagando às 06:00h (CE 12:12), $n = 8$;
- B) Grupo experimental (T22) mantido em ciclo CE de 22 horas (CE 11:11), $n = 12$.

O registro da atividade motora dos animais foi realizado através do uso de sensores infravermelho sensíveis ao movimento, posicionados acima das gaiolas. Nesse sistema de registro automático desenvolvido pelo LabCrono – Laboratório de Cronobiologia do Departamento de Fisiologia da UFRN, a leitura do deslocamento é traduzida em sinal elétrico, que é enviado a um programa de computador que armazena os registros a cada 5 minutos, gerando uma unidade arbitrária para fins de análise.

Após 50 dias na condição de ciclo CE e caracterizada a condição de dissociação para o grupo em T22, realizamos, nessa ordem, os Testes de Campo Aberto para análise da atividade exploratória, Labirinto em Cruz Elevado para mensurar o estado de ansiedade, Esquiva Passiva pelo método de plataforma (*step down*) e Teste de Reconhecimento de Objetos para avaliação da memória de curto-prazo e de longo-prazo, e o Teste de Nado Forçado utilizado para identificar estado de depressão.

Cada teste foi realizado em duas sessões de 5 minutos cada (Sessão 1 – S1 ou Pré-teste, e Sessão 2 – S2 ou Teste), com intervalos entre as sessões de 24 horas (para o grupo T24) ou 22 horas (para o grupo T22), sempre no meio da fase escura do ciclo

CE de cada condição experimental, com nível de iluminação de 30 lux no interior dos aparatos. Todas as sessões foram filmadas utilizando-se uma microcâmera posicionada acima dos aparatos; as imagens foram armazenadas no computador do laboratório e gravadas em *compact disc* para posterior análise dos dados. Durante a aplicação dos testes dois membros do laboratório estavam presentes na sala de experimentos, onde um realizava a manipulação dos animais e limpeza dos aparatos, e o outro se encarregava no manuseio do computador utilizado para registro. Em cada teste sempre o mesmo experimentador manipulava os animais. Os animais receberam uma marcação na cauda feita com o uso de lápis dermográfico atóxico (Pilot®). Essa marcação foi utilizada para identificação do animal quando em dupla (por exemplo, animal A1G2 referindo-se a animal 1 da gaiola 2). Os aparatos foram construídos em madeira, e impermeabilizados. Antes da sessão do primeiro animal a ser testado, e após a sessão de cada animal foi realizada a retirada de fezes ou urina, com limpeza com álcool a 46%, ambos procedimentos com o uso de papel toalha.

3.1. Testes e Procedimentos Técnicos

3.1.1. Campo Aberto (Fig. 1)

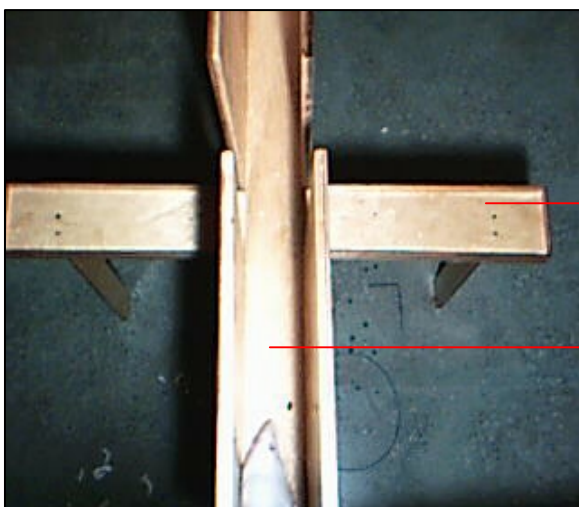
O aparato consistia de uma arena construída de madeira, com área de 50cm x 50 cm dividida em 25 quadrados de dimensão semelhante, e paredes laterais de 50cm de altura, o comportamento exploratório do animal foi avaliado em relação 1) ao número de quadrados totais percorridos, 2) número de quadrados percorridos nos primeiros 30 segundos de cada sessão.



Fig. 1. Animal explorando a periferia do Campo Aberto.

3.1.2. Labirinto em Cruz Elevado – LCE (Fig. 2)

O aparato construído em madeira é formado por quatro braços perpendiculares de 50cm de comprimento cada, sendo dois braços com paredes laterais de 50cm de altura (braços fechados) e dois braços sem paredes laterais apenas com uma borda de 1cm de altura (braços abertos), elevados a uma altura de 50cm do piso. O cruzamento dos braços abertos e fechados dá origem a uma área central de 10cm x 10cm (centro). Foi medida a porcentagem do tempo de permanência 1) nos braços aberto – %TBA e 2) no centro do labirinto – %TC.



→ Braço aberto

→ Braço fechado

Fig. 2. Animal posicionado no braço fechado do Labirinto em Cruz Elevado.

3.1.3. Esquiva Passiva (Fig. 3)

O aparato para realização do teste consistia de uma adaptação de uma caixa de Skinner de acrílico, com piso de grade metálica, e uma plataforma de madeira. O interior da caixa possuía as seguintes dimensões: 20 cm de altura, piso metálico com área de 24 x 20 cm; a plataforma de madeira de formato retangular media 10 cm de largura x 19 cm de comprimento. O animal foi colocado sobre a plataforma, recebendo um choque com intensidade de 0,5 mA nas patas, caso descesse da plataforma para a grade (Treino). Após 30 minutos, o animal era recolocado sobre a plataforma, porém sem receber o estímulo elétrico caso descesse para o piso em grade (Teste 1, Memória de curto-prazo – MCP). Passadas 24 horas (T24) ou 22 horas (T22), novamente o animal foi recolocado sobre a plataforma (Teste 2, Memória de longo-prazo – MLP). Avaliamos durante os 5 minutos das sessões de teste o a latência em segundos para descida da plataforma em direção à grade.



Fig. 3. Animal sobre a plataforma de madeira durante o Teste de Esquiva Passiva.

3.1.4. Reconhecimento de Objetos (Fig. 4)

O teste foi realizado na arena do campo aberto com o uso de 3 (três) tipos de objetos de cor branca, com formatos diferentes, sendo dois objetos A (objA1 e objA2) de

porcelana fosca, idênticos na forma côncava; um objeto B (objB) de plástico na forma retangular com superfície em auto-relevo; e um objeto C (objC), uma caneca de porcelana de superfície lisa e brilhante. A escolha de qual objeto seria A, B ou C, bem como sua posição no campo aberto, ou seja, lado direito e lado esquerdo em relação à tela do computador, foi feita de forma aleatória através de sorteio por um membro do laboratório, em dia anterior ao início do experimento. O teste era composto de 1) pré-exposição de 5 minutos ao campo aberto, 2) apresentação de objA1 e objA2 – Treino, 3) apresentação de objA e objB – Teste 1, realizado 1 hora e 30 minutos após o Treino (para memória de curto prazo – MCP), e 4) apresentação de objA e objC – Teste 2 (para memória de longo prazo – MLP), realizado 24 horas (para T24) ou 22 horas (para T22) após o Treino. Foram mensurados o Tempo de Exploração e a Frequência dos contatos com cada objeto, além do Índice de Reconhecimento, sendo $Ir > 0,5$ reflete o reconhecimento do novo objeto:

$$Ir = \frac{T \text{ objA}}{T \text{ objA} + T \text{ obj Novo}}$$

Onde:

T objA = tempo de exploração do objeto A;

T obj Novo = tempo de exploração do objeto B ou C.



Fig. 4. Exemplo do posicionamento de objetos na arena do campo aberto para realização do Teste de Reconhecimento de Objetos.

3.1.5. Nado Forçado (Fig. 5)

O teste consistiu na colocação do animal em um recipiente plástico de 25 cm de diâmetro, com coluna d'água de 25 cm de altura. Nessa condição o animal nada tentando deslocar-se sobre a água, tenta sair do recipiente investindo sobre as paredes laterais, e por fim mantém-se apenas boiando na superfície, parâmetro chamado de *imobilidade*, considerado como índice de desistência relacionado ao estado depressivo. Foi registrada a latência em segundos para o início do comportamento de imobilidade. Ao ser retirado da água o animal foi secado com toalha, só depois retornando à sua gaiola de origem. O conteúdo do recipiente foi renovado para cada animal testado.



Fig. 5. Animal mantendo-se imóvel sobre a superfície da água durante a realização do Teste de Nado Forçado.

3.2. Comportamentos Avaliados

3.2.1. Atividade exploratória

- Avaliada através do número total de quadrados percorridos no campo aberto.

3.2.2. Ansiedade

- Avaliada através 1) da %TBA, 2) %TC do labirinto em cruz elevado, e 3) número total de quadrados atravessados nos primeiros 30 segundos no campo aberto.

3.2.3. Depressão

- Avaliada através da latência para imobilidade no teste do nado forçado.

3.2.4. Memória

- Avaliada através 1) da latência em segundos para descer da plataforma no teste de esquiva passiva, e 2) do tempo e frequência de contato com objetos novos no teste de reconhecimento de objeto.

4. ANÁLISE DOS DADOS

O padrão de atividade motora dos animais foi analisado através da construção de Actogramas e Periodogramas, utilizando-se o programa *El Temps*® desenvolvido pelo Grupo de Cronobiologia da Universidade de Barcelona, juntamente com o programa de registro de atividade desenvolvido por nosso laboratório – LabCrono. As variáveis mensuradas nos testes comportamentais de Campo Aberto, Labirinto em Cruz Elevado, Reconhecimento de Objeto e Nado Forçado foram analisadas estatisticamente através do Teste *t* de *student*; para o teste de Esquiva Passiva utilizamos o Teste de Kruskal-Wallis. Todos os testes foram analisados através do programa *SPSS*®, com nível de significância $\leq 0,05$.

5. RESULTADOS

Os animais em T22 apresentaram a dissociação do ritmo circadiano de atividade locomotora com a expressão de dois componentes simultâneos, um com período de 1320 minutos e outro com período de 1490 min. Os animais em T24 se apresentaram sincronizados ao ciclo CE, com período de 1440 minutos (Fig. 6).

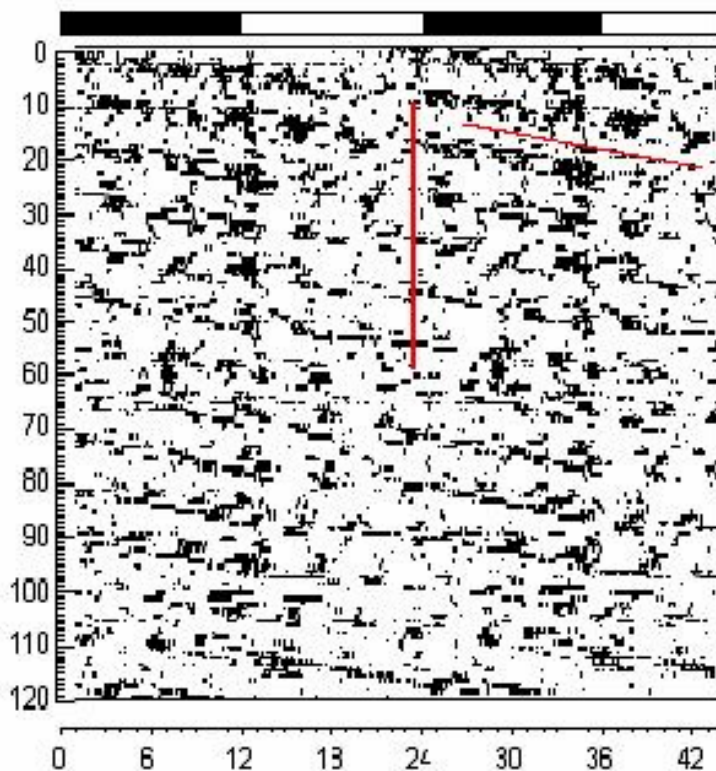


Fig. 6. Actograma em duplo *plotting* representado em 22 horas de um dos animais em T22. Observam-se dois componentes do ritmo circadiano de atividade locomotora, um sincronizado ao ciclo CE (linha vertical) e outro em livre-curso (linha diagonal) não-sincronizado. Eixo y representa os dias ao longo do experimento. Eixo x representa as horas do dia.

5.1. Atividade exploratória

Os animais em T22 apresentaram maior atividade exploratória evidenciada no teste de Campo Aberto (Fig. 7), visto através do número total de quadrados atravessados durante os 5 minutos da sessão 1 (T24: $28,0 \pm 21,09$; T22: $95,75 \pm 23,45$; $t = 6,73$; $p < 0,001$) e sessão 2 (T24: $54,75 \pm 18,0$; T22: $77,2 \pm 29,17$; $t = 2,1$; $p = 0,048$).

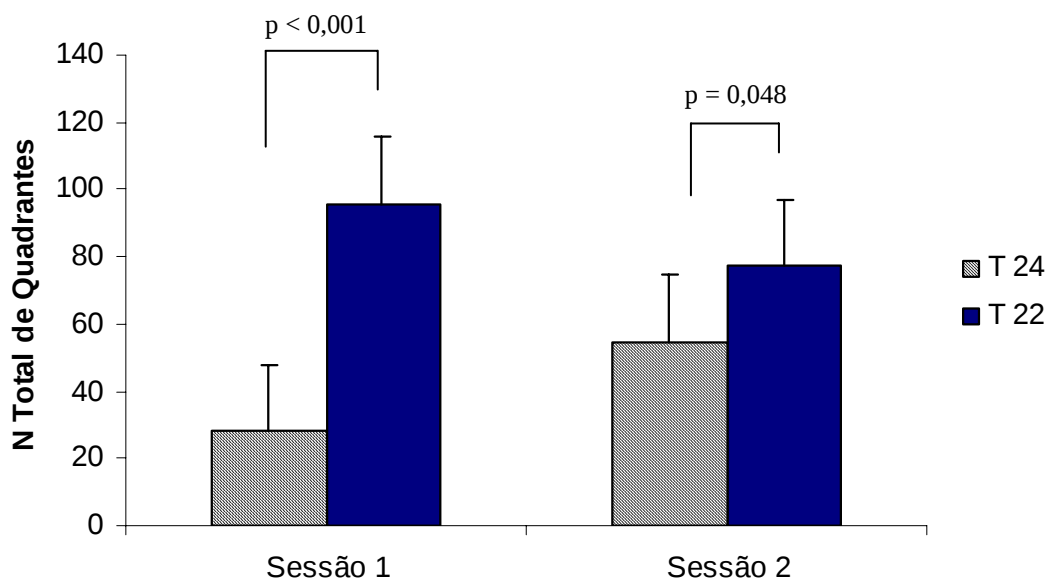


Fig. 7. Número total de quadrados atravessados no teste de campo aberto na sessão 1 e sessão 2.

5.2. Ansiedade

No teste do Labirinto em Cruz Elevado, o animal é levado ao conflito entre explorar o novo e evitar o risco a que pode se expor. Para a primeira sessão, S1, os dados apontam diferenças comportamentais nas respostas entre os grupos. Nessa sessão, os animais em T22 apresentaram maior tempo de exploração dos braços abertos e centro do labirinto. O gráfico da Fig. 8 revela maior %TBA (T24: $1,83 \pm 2,93$; T22: $13,36 \pm$

10,31; $t = 3,66$; $p = 0,003$), enquanto a Fig. 9 nos mostra maior %TC (T24: $22,60 \pm 9,24$; T22: $39,01 \pm 10,10$; $t = 3,75$; $p = 0,002$). A atividade exploratória evidenciada nos primeiros 30 segundos de cada sessão do teste de campo aberto também foi um parâmetro avaliado como índice para análise do comportamento de ansiedade. A Fig. 10 mostra que o grupo em T22 apresentou maior índice de atividade exploratória nos primeiros 30 segundos da sessão 1 do teste de campo aberto, representado pelo número de quadrados totais atravessados (T24: $5 \pm 4,5$; T22: $19,33 \pm 7,96$; $t = 5,13$; $p = 0,0001$).

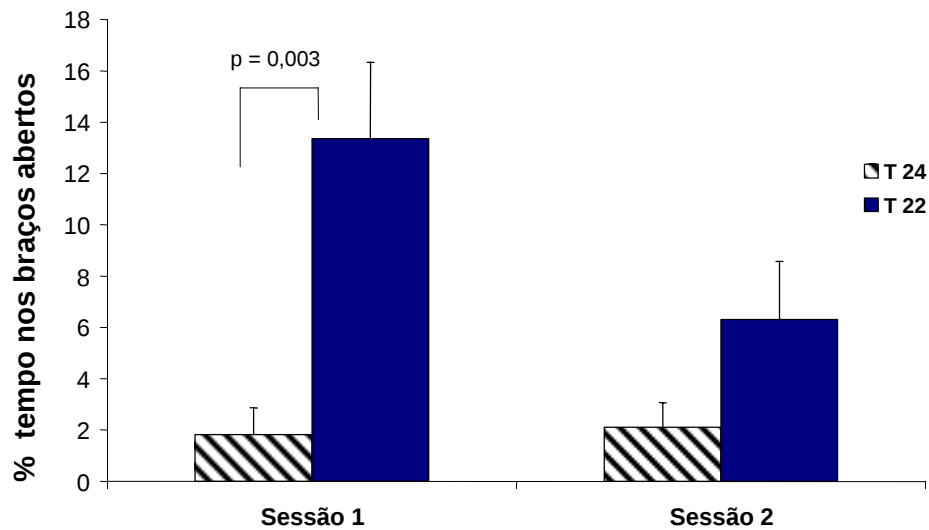


Fig. 8. Porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos do LCE (%TBA) durante a sessão 1 e sessão 2.

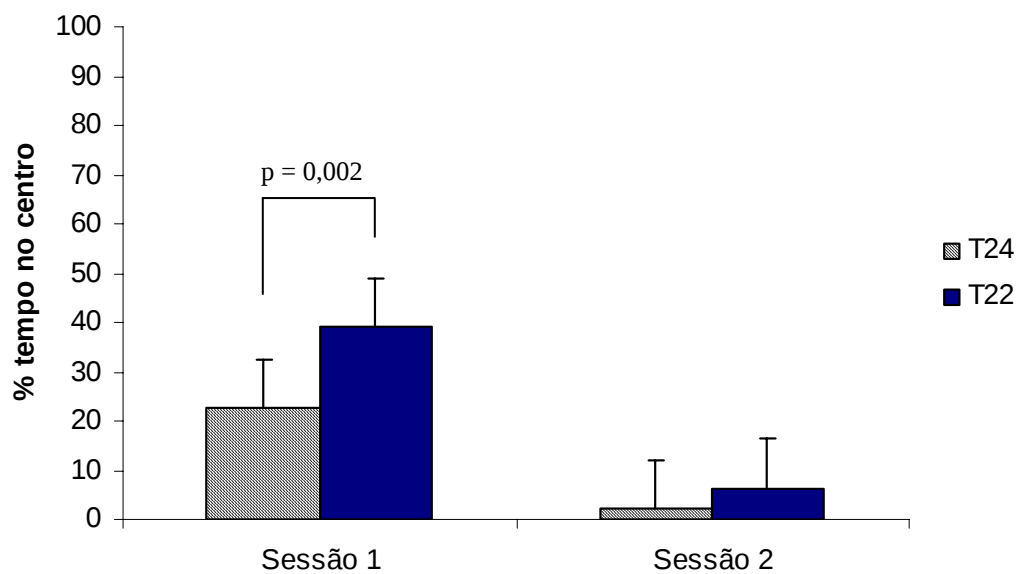


Fig. 9. Porcentagem do tempo de permanência no centro do LCE (%TC) durante a sessão 1 e sessão 2.

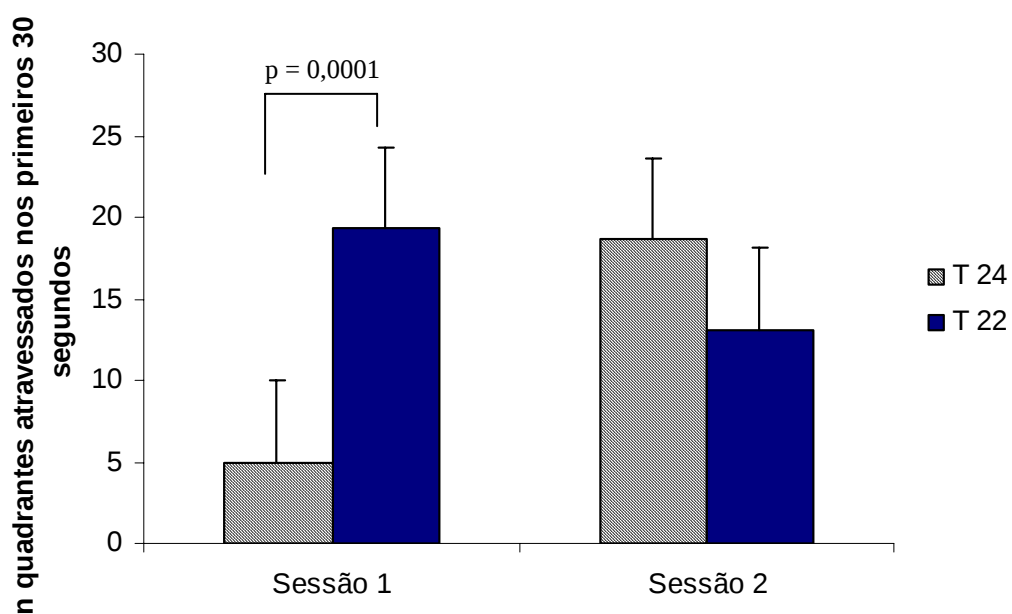


Fig. 10. Número total de quadrados atravessados nos primeiros 30 segundos na sessão 1 e sessão 2 do teste de campo aberto.

5.3. Depressão

As médias das latências para imobilidade no Pré-teste e Teste são mostradas na Fig. 11. No Pré-teste o grupo em T22 apresentou maior latência para imobilidade ($T24 = 25,5 \pm 21,1$ seg e $T22 = 107,9 \pm 27,4$; $t = 58$; $p = 0,001$), não havendo diferença estatística no Teste ($T24 = 12,2 \pm 9,1$ seg e $T22 = 24,8 \pm 30,3$ seg; $t = 1,4$; $p = 0,199$).

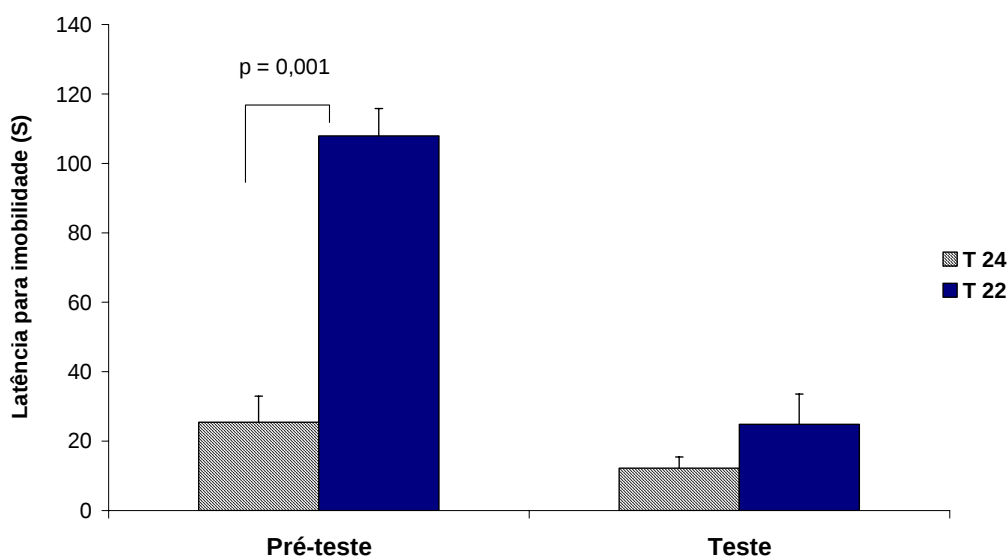


Fig. 11. Latência para imobilidade no teste de nado forçado nas sessões de Pré-teste e Teste.

5.4. Memória

Para o teste de Esquiva Passiva, o grupo em T22, em relação ao grupo em T24, apresentou menor latência em segundos para descer da plataforma durante o Teste 1, 30 minutos após o Treino (MCP, $X^2 = 7,563$; $p = 0,006$) (Fig. 12). O Teste 2 realizado 22 horas depois do Treino (MLP) não mostrou diferença entre os grupos. Quando comparamos o nível de atividade locomotora agrupando animais que aprenderam a tarefa no teste de Esquiva Passiva, e agrupando os animais que não aprenderam, não encontramos diferença (dados não apresentados).

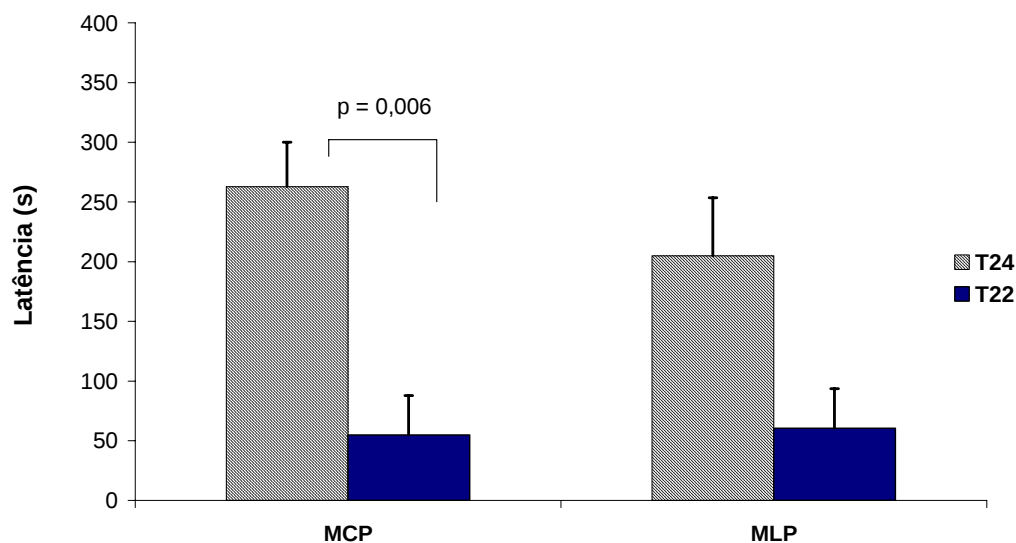


Fig. 12. Latência em segundos para descer da plataforma durante o Teste 1 (MCP) e Teste 2 (MLP) no teste de esquiwa passiva.

Durante a sessão de Treino para o teste de Reconhecimento de Objeto, onde foram apresentados dois objetos idênticos (A1 e A2), não houve diferença entre os grupos com relação ao Tempo de Exploração ou Frequência de contatos com os objetos, o que seria esperado já que os objetos são idênticos (Fig. 13). No Teste 1 (realizado 1h e 30min após o Treino) encontramos que tanto o grupo T24 como o grupo T22 apresentaram maior Tempo de Exploração e Frequência de contato para o objeto B, em relação ao objeto A, o que revela seu reconhecimento pelo novo (Fig. 14). Os gráficos da Fig. 14 se referem para o grupo em T22 o Tempo de Exploração ($t = - 3,9$; $p = 0,002$) e Frequência de contatos ($t = - 5,2$; $p = 0,0002$) para o objeto B relativo ao objeto A, com índice de reconhecimento, $ir = 0,827$. Para o grupo em T24 a Fig. 14 ainda se refere ao Tempo de Exploração ($t = - 3,8$; $p = 0,006$) e Frequência de contatos dos objetos A e B ($t = - 5,0$; $p = 0,001$), com $ir = 0,747$. Na Fig. 15 temos os gráficos do desempenho no Teste 2, realizado 22 horas ou 24 horas depois do Treino. Ambos os grupos não mostraram bom desempenho em reconhecer o objeto novo. A Fig. 16 nos mostra o gráfico com índice de reconhecimento ($ir > 0,5$) para os dois grupos nas três situações (Treino, Teste 1 e Teste2).

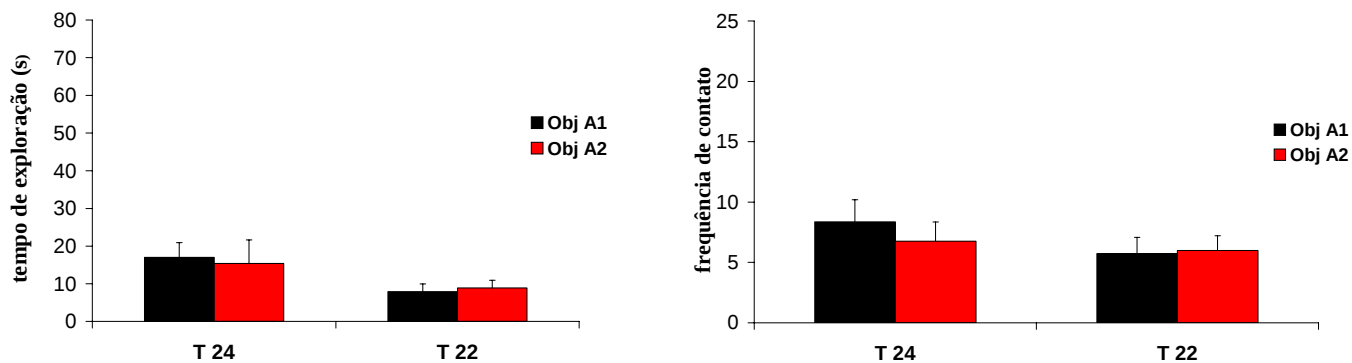


Fig. 13. Tempo de exploração e frequência de contato com o objeto A1 (ObjA1) e objeto A2 (ObjA2) durante a sessão de Treino.

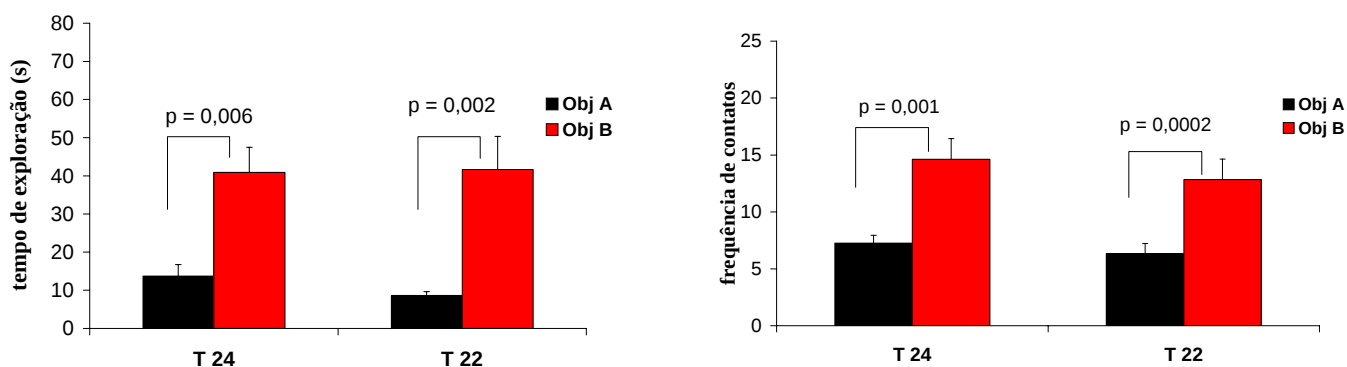


Fig. 14. Tempo de exploração e frequência de contato com o objeto A (ObjA) e objeto B (ObjB) durante o Teste 1.

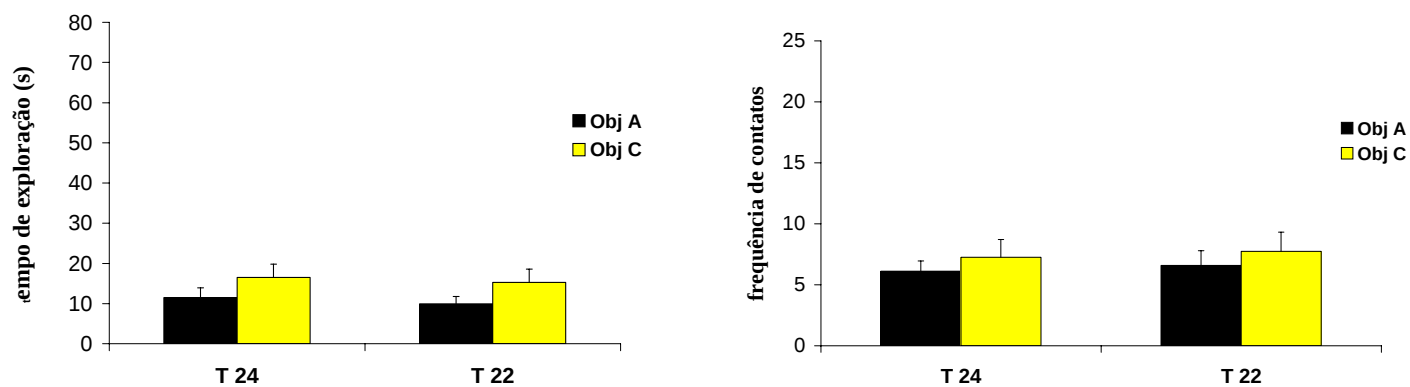


Fig. 15. Tempo de exploração e frequência de contato com o objeto A (ObjA) e objeto C (ObjC) durante o Teste 2.

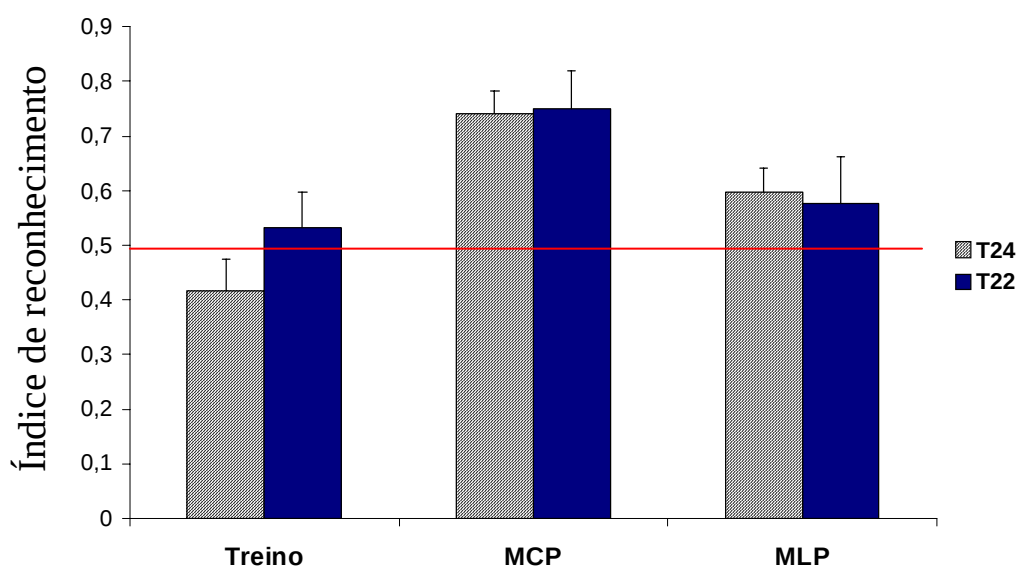


Fig. 16. Índice de reconhecimento, $ir > 0,5$, para os animais em T24 e T22 durante as sessões de Treino, MCP (memória de curto-prazo, Teste 1) e MLP (memória de longo- prazo, Teste 2).

6. DISCUSSÃO

No nosso estudo os animais em T22 apresentaram dois componentes circadianos da expressão da atividade locomotora, os quais foram: 1) sincronizado com o ciclo CE de 22 horas, com um período de 1320 min, e 2) em livre-curso, com período de 1490 min, caracterizando a dissociação do ritmo circadiano da atividade locomotora (Campuzano *et al.*, 1997).

O modelo de dissociação do ritmo circadiano da atividade locomotora em ratos tem sido utilizado sob várias condições experimentais, tais como diferentes tamanhos de gaiolas, diferentes níveis de atividade locomotora com o uso da roda-de-atividade (Campuzano *et al.*, 1999; Cambras *et al.*, 2000), modificações na duração do fotoperíodo (Cambras *et al.*, 2004), e na presença de toca (Bastos, 2005). Ou seja, a análise comportamental resultante desse modelo até então foi estudada a partir da expressão do ritmo de atividade locomotora. Modificações comportamentais que envolvam sistemas de memória, estados afetivos e motivacionais, está sendo descrito pela primeira vez por nosso grupo.

Há indicações de que o modelo de dissociação reflete modificações funcionais ao nível do núcleo supraquiasmático, estrutura central do sistema de sincronização circadiano. Considerando as relações que esse núcleo estabelece funcionalmente e anatomicamente com diversos sistemas orgânicos nos faz supor que as modificações comportamentais observadas sejam resultantes da condição de dissociação. O trabalho do Horácio de La Iglesia *et al.* (2004) mostra claramente que ratos submetidos ao período (T) de 22 horas (CE 11:11) apresentaram ao nível das duas regiões do NSQ expressão distinta de genes envolvidos na ritmicidade circadiana, sendo a expressão gênica na região ventrolateral sincronizada com o ciclo CE de 22 horas, e a expressão gênica na região dorsomedial sincronizada com a atividade e repouso do componente não-sincronizado. Esse trabalho destaca o papel funcional do modelo de dissociação do ritmo circadiano da atividade locomotora.

Nos nossos experimentos encontramos que os animais em T22 apresentaram modificações comportamentais que envolvem sistemas complexos na geração e modulação de comportamentos e estados motivacionais. Analisando durante o teste de

campo aberto a atividade exploratória, encontramos que esta foi maior para os animais dissociados (T22) em relação ao grupo controle (T24), tanto na primeira sessão (S1) como na segunda sessão (S2) do teste, refletida através da contagem do número total de quadrados atravessados. Podemos dizer que houve maior atividade exploratória durante a realização do teste, mas não maior atividade locomotora, pois os registros de atividade motora mostram que a atividade total é semelhante em ambos os grupos. Sabemos ainda que o nível de atividade motora do animal favorece ao acoplamento dos osciladores circadianos. Campuzano *et al.* (1999) encontraram que a presença de uma roda-de-atividade e maior atividade motora em ratos mantidos em T22, impediu o surgimento do padrão de dissociação, sugerindo que a dissociação é favorecida quando a mobilidade do animal é reduzida.

Atividade exploratória e respostas comportamentais relacionadas com ansiedade podem ser analisadas através do teste de campo aberto tanto em ratos como em camundongos. O número de quadrados atravessados durante as sessões do teste reflete a motivação que o animal apresenta em explorar o novo, ao mesmo tempo em que o expõe ao risco de uma arena aberta. Nos parece que os animais em ciclo CE de 11:11 apresentaram mais motivação em explorar o ambiente novo, talvez pelo fato de apresentarem menor nível de respostas comportamentais inibitórias (como a imobilidade motora) por parte de seus sistemas que desencadeiam comportamentos de alerta para o medo frente a riscos potenciais. Essas respostas inibitórias estão subjacentes a comportamentos encontrados nas condições de ansiedade. O nível de ansiedade do animal durante o teste de campo aberto pode ser inferido através de sua atividade exploratória nos primeiros 30 segundos de exposição ao aparato. Observamos que os animais em T22 exploraram mais o campo aberto durante os 30 segundos iniciais da primeira sessão de testes (S1). Alguns autores propõem que essa análise sugere menor ansiedade por parte do animal, que tende a explorar mais o campo aberto nos primeiros 30 segundos dessa tarefa (Kalynchuk *et al.*, 1997).

Esse perfil comportamental de menor ansiedade dos animais em T22 também foi visto durante a realização do teste do labirinto em cruz elevado (LCE). O teste do labirinto em cruz elevado já está bem estabelecido na literatura para avaliar respostas de ansiedade em roedores frente a manipulações tanto comportamentais como

farmacológicas. Essas manipulações avaliam como o animal reage às condições ansiogênicas ou ansiolíticas, sendo que basicamente o parâmetro avaliado é o registro do número de vezes e do tempo que o animal visita os braços abertos do aparato. O teste impõe ao animal o conflito de explorar o novo e evitar o risco de um ambiente desconhecido. Os animais tendem a apresentar a preferência de permanecer nos braços fechados, evitando os braços abertos e o centro do labirinto, ambientes considerados de risco (Rodgers, Cao, Holmes, 1997).

Na primeira sessão do teste (S1) o grupo em T22 explorando mais vezes e passando mais tempo nos braços abertos e centro do labirinto, apresenta menor nível de ansiedade em relação aos animais em T24, frente ao interesse e conflito de explorar o labirinto. Na segunda sessão (S2) não encontramos diferenças significativas entre os grupos, o que está de acordo com trabalhos de outros autores que mostram que durante o teste de LCE a exposição prévia ao aparato do teste modifica o desempenho do animal numa segunda exposição. Essa mudança comportamental pode ser vista a partir de índices mais baixos de exploração dos braços abertos (Carobrez & Bertoglio, 2000, 2002). Com relação aos animais em T22, o decaimento nos índices de exploração dos braços abertos e centro do labirinto na segunda sessão nos faz sugerir que esse padrão de evitar essas áreas foi adquirido a partir da primeira sessão, realizada na mesma hora circadiana, 22 horas antes. O mesmo fenômeno foi observado com relação a índices menores de atividade exploratória dos animais em T22 nos primeiros 30 segundos da segunda exposição ao campo aberto.

Outros fatores podem modificar a resposta comportamental do animal durante as sessões de testes do labirinto em cruz elevado, como a presença de ruídos ou odores de um predador na região dos braços abertos, bem como o nível de intensidade luminosa (Carobrez & Bertoglio, 2005). Esta última é considerada por alguns autores como uma diferença metodológica importante entre laboratórios, o que pode dificultar a generalização dos resultados encontrados, independentemente das condições ansiogênicas ou ansiolíticas às quais os animais estejam submetidos, uma vez que altas intensidades luminosas são aversivas para animais de hábitos noturnos. Utilizamos nos nossos experimentos intensidade luminosa de aproximadamente 30 lux, de modo que ao nível do centro e braços do labirinto, a consideramos como de baixa intensidade,

não sendo capaz de interferir de forma ansiogênica na resposta do animal. No trabalho de Carobrez e Bertoglio (2002) os animais que foram testados no labirinto a uma intensidade luminosa de 44 lux, considerada pelos autores como “baixa intensidade”, apresentaram maior exploração dos braços abertos quando comparados àqueles submetidos ao teste com intensidade luminosa de 600 lux, “alta intensidade” segundo esses autores.

Os comportamentos dos animais em T22 frente a condições que avaliam ansiedade podem surgir pelo aspecto de que a condição de CE 11:11 gera maior motivação por parte do animal, o que pode ser possível pelo fato de que esses indivíduos não estejam avaliando bem situações de riscos iminentes a que podem se expor. A condição de dissociação pode perturbar o funcionamento de sistemas que fazem parte do arcabouço das respostas comportamentais de preservação do sujeito frente a riscos. O substrato neural subjacente ao complexo de estímulos e respostas de medo envolve estruturas límbicas, principalmente os núcleos do complexo amigdalóide, mais especificamente os núcleos do complexo basolateral e núcleo central, estruturas que têm papel importante no controle das respostas de estados emocionais (Le Doux, 2000; Maren, 2005). É bem conhecido na literatura que lesão ou inativação do complexo basolateral da amígdala diminui a resposta de imobilidade em ratos e camundongos durante os testes que utilizam tarefas relacionadas a um componente aversivo que desencadeia respostas de medo. Esses núcleos recebem informações da formação hipocampal a cerca do local e hora de um evento aversivo aprendido, possuindo então, papel importante na integração de informações de estímulos condicionados e incondicionados, fundamentais na aquisição de informações biologicamente relevantes para o indivíduo. Essas informações integradas são projetadas a outras áreas encefálicas envolvidas na regulação tanto de estados emocionais, como respostas autonômicas e comportamentos motivados (Gale, 2004).

De tal modo, pensando no aspecto de que as respostas comportamentais que evidenciamos sejam conseqüências da desorganização funcional do NSQ e suas repercussões sobre seus efetores, pode estar ocorrendo então perturbações funcionais a sistemas que estão envolvidos em respostas adaptativas do sujeito frente a situações de riscos que geram comportamentos de medo. Lamont *et al.* (2005) encontraram que o

núcleo central e o complexo basolateral da amígdala expressam de forma rítmica o gene *Per2*, envolvido na regulação circadiana, e que essa expressão de *Per2* no complexo basolateral e núcleo central pode ser dependente da integridade funcional do núcleo supraquiasmático. Os autores mostram nesse trabalho que após lesão do NSQ, a expressão do gene no complexo basolateral e núcleo central foi abolida, demonstrando que esse padrão rítmico depende da integridade funcional do NSQ. O núcleo central da amígdala, juntamente com o núcleo do leito da estria terminal (núcleo intersticial), estão também relacionados com respostas envolvidas com o comportamento de ansiedade. Animais que sofrem lesão dessas regiões, não apresentam respostas de medo e ansiedade frente a um ambiente de risco potencial (Walker *et al.*, 2003). Além do núcleo intersticial possuir relação com o complexo basolateral da amígdala e núcleo central, relação que por si só interfere na função dessa estrutura, a expressão rítmica de *Per2* no núcleo intersticial também está abolida nas lesões que afetam o NSQ (Amir *et al.*, 2004). Com os dados desses estudos podemos relacionar mais uma vez os dados que temos em relação ao comportamento de menor ansiedade dos animais do grupo em T22 no que se refere aos parâmetros avaliados nos testes de campo aberto e labirinto em cruz elevado. Podemos sugerir que a condição de dissociação promove uma perturbação funcional na organização e expressão da atividade do núcleo supraquiasmático, inclusive no que diz respeito às suas relações funcionais com sistemas envolvidos com estados afetivos, relações estas que se expressam através de respostas comportamentais alteradas.

Outra condição afetiva que avaliamos foram os comportamentos relacionados com a depressão, através do teste do nado forçado. Esse é um teste bem estabelecido na literatura para ser estudada a depressão no âmbito de sua terapêutica farmacológica e comportamentos em ratos e camundongos (Lucki, 1997; Kalynchuk *et al.*, 2005; Lino-de-Oliveira, Lima e Carobrez, 2005). O teste consiste em submeter o animal a um recipiente com água impondo a este que nade; o animal tenta sair do recipiente investindo sobre suas paredes, e mantêm-se sobre a superfície da água boiando ou nadando. O tempo que decorre do momento em que o animal é posto na água, até “desistir” de nadar, *latência para imobilidade*, é utilizado como parâmetro mais sensível para se identificar comportamento depressivo e resposta à terapêutica

farmacológica (Detke, Rickels, Lucki, 1995). Lino-de-Oliveira *et al.* (2005) apontam que a latência para imobilidade é inversamente proporcional ao nível do comportamento do animal de “desistir” de sair da água, tendo um papel importante na triagem da droga antidepressiva serotoninérgica ou noradrenérgica empregada. Encontramos na sessão de Pré-Teste que os animais em T22 apresentaram maior latência para imobilidade, ou seja, passaram mais tempo nadando ou tentando subir pelas paredes do tanque com água, podendo refletir menor comportamento depressivo em relação aos animais em T24.

Há vários dados na literatura que apontam a relação entre o sistema de sincronização circadiano com estados afetivos, incluindo a depressão. Tanto a depressão maior, como a Doença Sazonal Afetiva, caracterizada por eventos recorrentes de depressão, cursam com distúrbios do sono, perturbações no perfil rítmico da temperatura corporal e cortisol, ou oscilações psicopatológicas do humor durante o dia, bem como ansiedade. Alguns trabalhos apontam que uma desorganização nas relações de fase externa, entre os osciladores circadianos e o ambiente externo, podem estar subjacentes aos distúrbios circadianos encontrados nessas condições, como é visto também no caso de trabalhadores em turno e turno noturno.

A melhora dos sintomas depressivos com o uso de fototerapia, e os sinais e sintomas encontrados em indivíduos que perturbam seus ritmos circadianos, como no caso da irregularidade do ciclo sono-vigília e o surgimento de ansiedade, se somam aos dados que relacionam o sistema de sincronização circadiano e a gênese da doença depressiva (Bunney e Bunney, 2000; Almondes e Araújo, 2003). São vistos em ensaios clínicos, padrões distintos de anormalidades circadianas em distúrbios afetivos ao ponto que podem servir inclusive para o estabelecimento diagnóstico (Yannielli, 2002). Por outro lado, se os distúrbios de ritmos circadianos são de significância etiológica para as desordens afetivas e do humor ou se são uma consequência dos comportamentos alterados, ainda não está claro, segundo Wirz-Justice em revisão recente (2006).

Em modelos animais, ratos privados de sono paradoxal apresentam maior latência para imobilidade durante o teste do nado forçado, sendo essa resposta

semelhante ao tratamento farmacológico com inibidores de recaptação de serotonina ou noradrenalina (Berger *et al.*, 1997; Adrien, J., 2002). O modelo dos dois processos de regulação do sono considera que a estrutura interna e duração do sono são uma consequência da interação de processos circadianos e homeostáticos (pressão homeostática do sono, que é dependente do tempo de vigília e que se dissipa com a consolidação do sono). Manipulações do ciclo sono-vigília seja na sua duração, através de privação parcial ou total do sono (envolvimento do processo homeostático), seja na sua alocação temporal, com privação parcial do sono e avanço de fase (interação entre os processos homeostático e circadiano), surte efeitos positivos na população de sujeitos com depressão. Esse efeito terapêutico é considerado pelos autores ser devido à elevação da pressão homeostática do controle do sono que nesses indivíduos estaria deficiente, com o processo circadiano permanecendo sem ser afetado (Wirz-Justice e den Hoofdakker, 1999).

Outros autores ainda apontam que tanto a privação parcial do sono como a privação total são igualmente efetivas nos seus efeitos antidepressivos, o que significaria que a duração do sono deve ser mais importante na melhora dos sintomas depressivos do que sua alocação temporal (componente circadiano). Avanços da fase de sono em 6 horas, que trazem respostas positivas em sujeitos com depressão, indicam que a relação de fase entre o sono e o sistema circadiano pode ser o elemento essencial na melhora dos sintomas após manipulações do sono, embora que com a mudança de fase, a duração do sono também se modificaria, ou seja, o processo homeostático (Berger, *et al.*, 1997; Wirz-Justice e den Hoofdakker, 1999).

Nossos dados mostram que os animais em T22 apresentaram menores índices de depressão e ansiedade, entidades que na prática clínica cursam juntas. Interessantes são os dados de Sucheki *et al.* (2002) que mostram que ratos privados de sono paradoxal ao serem expostos ao labirinto em cruz elevado, apresentam maior exploração dos braços abertos, mesmo apresentando níveis basais elevados de corticosterona se comparados a animais que não tenham sido submetidos a essa condição de estresse, o que faz os autores concluírem que a privação de sono promoveu um efeito adicional para o comportamento de menor ansiedade. Embora não tenha sido objetivo do nosso experimento, pode ser considerado como uma limitação o

fato de não conhecermos os níveis e perfil de secreção de corticosterona, bem como o comportamento do sono dos animais em T22. Uma vez que o modelo de dissociação da ritmicidade circadiana da atividade locomotora se deve às modificações funcionais no que diz respeito ao acoplamento entre os grupos de osciladores do núcleo supraquiasmático, podemos sugerir que as respostas comportamentais de menor ansiedade e menor índice de depressão obtidas com a realização dos testes do labirinto em cruz elevado e campo aberto, e nado forçado refletem modificações do componente circadiano de controle de diversas funções comportamentais, como possivelmente o ciclo sono-vigília.

Dois protocolos experimentais são utilizados em humanos na investigação dos componentes endógenos envolvidos na regulação circadiana de variáveis comportamentais como o desempenho cognitivo (Monk *et al.*, 1997), variáveis fisiológicas como a temperatura, cortisol e função pulmonar (Spengler e Shea, 2000), bem como estados afetivos como a depressão (Koorengevel e Beersma, 2002). O protocolo de *rotina constante*, com o intuito de evitar os fatores que possam interferir ou mascarar respostas do sistema de sincronização circadiano, consiste em manter indivíduos em uma condição de ambiente constante, sem pistas sincronizadoras, baixo nível de luminosidade, e manutenção do estado de vigília (Duffy e Dijk, 2002). Porém há limitações nesse protocolo quando se investiga mecanismos envolvidos na regulação do humor, pois a privação de sono que o protocolo impõe leva a uma deterioração do humor nos indivíduos sadios, e uma melhora do humor em indivíduos com depressão, além de outros efeitos desagradáveis que a privação do sono promove. O protocolo de *dessincronização forçada* submete os sujeitos a ciclos de CE de 20 ou 28 horas, evitando-se os efeitos da privação de sono; a contribuição da pressão homeostática do sono e do sistema de sincronização circadiano no controle endógeno das diversas variáveis fisiológicas podem ser analisadas separadamente (Koorengevel e Beersma, 2002).

Nesses protocolos é possível identificar em humanos a manifestação do controle endógeno sobre o perfil rítmico das variáveis estudadas, no que se refere à relação de fases ou amplitude, por exemplo. Em humanos submetidos à *dessincronização forçada* pode ser visto que o ritmo circadiano da temperatura central se dissocia do ritmo

circadiano do ciclo sono-vigília, o que pode ser explicado a partir da existência de múltiplos osciladores endógenos distintos. Numa condição de pistas ambientais sincronizadoras conflitantes, ou que levem o sistema de sincronização ao seu limite inferior de sincronização, o acoplamento entre esses osciladores se perde ou se torna débil, de modo que são encontrados padrões distintos de oscilação. No modelo de dissociação em T22 o que vimos é que o surgimento simultâneo de dois componentes circadianos distintos da atividade locomotora se deve à atividade de dois grupos de osciladores localizados no NSQ (de la Iglesia *et al.*, 2004).

Reafirmando ainda a necessidade de estudos do comportamento do ciclo sono-vigília de animais em dissociação do ritmo circadiano da atividade locomotora, estabelecendo os parâmetros eletrofisiológicos e hormonais, sugerimos que o modelo de dissociação em T22 utilizado por nosso grupo pode servir como modelo experimental para estudo das desordens do ritmo circadiano do ciclo sono-vigília. O modelo pode apresentar vantagem em relação a modelos clássicos de privação de sono no que se refere à duração da fase de coletas de dados do experimento, pois os animais são mantidos por longo tempo na condição de ciclo CE de 11:11, ao passo que protocolos de privação de sono paradoxal duram comumente 96 horas, devido ao estresse severo ao qual os animais se encontram, o que envolve inclusive aspectos éticos.

O modelo de dissociação nos permitiu avaliar em ratos respostas afetivas e cognitivas durante uma condição de dessincronização forçada. O desempenho cognitivo dos animais em T22 em tarefas que avaliam memória, foi investigado através dos testes de esquiva passiva e reconhecimento de objeto. O teste de esquiva passiva se baseia no paradigma de condicionamento contextual de medo, onde o indivíduo aprende que determinado estímulo inócuo, como um contexto ou um som, pode estar associado à ocorrência de um estímulo nocivo, como um choque elétrico. O pareamento desses estímulos desencadeia respostas de medo condicionadas, com alterações autonômicas e comportamentais, como respostas cardiovasculares e respiratórias, imobilidade e vocalização (Maren, 2005). O modelo que utilizamos – *step down* consiste em o animal associar que receberá um choque elétrico nas patas assim que tocar o chão de grade metálica da caixa de testes (Treino), ao passo que

estará livre de choques elétricos se permanecer sobre uma plataforma de madeira que a caixa possui. O animal demonstra que aprende o local seguro na caixa permanecendo o maior tempo sobre a plataforma durante as sessões de testes, subsequentes ao treino. O grupo em T22 apresentou pior desempenho durante o Teste 1, realizado 30 minutos após o Treino, e que se refere à memória a curto-prazo. Para avaliar memória a longo-prazo, o Teste 2, realizado 22 horas ou 24 horas após o Treino, não mostrou diferença significativa entre os grupos.

Ainda para avaliar o desempenho entre os grupos em testes de memória, após realizarmos o teste de esquiva passiva, procedemos com a aplicação de uma tarefa que não utilizasse necessariamente os sistemas neurais diretamente envolvidos nas tarefas que envolvem medo e aprendizagem, o teste de reconhecimento de objeto (Simon, 1997). Como resultado não encontramos diferenças no desempenho entre os dois grupos, onde no Teste 1, referente a memória a curto-prazo, e realizado 1h e 30min após o Treino, ambos os grupos exploraram mais vezes o objeto novo, enquanto que no Teste 2, realizado 24 horas ou 22 horas após o Teste, para avaliar memória a longo-prazo, para ambos os grupos não houve bom desempenho para a tarefa de reconhecer o objeto novo.

Um aspecto metodológico que pode comprometer a análise da resposta do animal no teste de esquiva passiva se refere à atividade motora. Uma vez que nesse teste o animal precisa associar sua permanência sobre a plataforma com o fato de estar livre de choque elétrico, podendo apresentar como resposta a imobilidade motora, alterações no nível de atividade motora podem confundir a análise dos resultados. Quando comparamos o nível de atividade motora dos indivíduos de ambos os grupos que obtiveram bom desempenho na tarefa, com os indivíduos com mau desempenho de ambos os grupos, não encontramos diferença significativa. Dessa forma, o prejuízo na resposta ao teste de esquiva passiva não ocorreu devido a uma maior atividade motora do animal, o que poderia ocorrer uma vez que o animal deveria permanecer sobre a plataforma, ou seja, ficar inativo, caso tivesse aprendido a tarefa.

Os resultados da avaliação cognitiva dos animais em T22 durante a realização de testes de memória nos mostram que o desempenho dos animais dissociados foi pior em relação aos animais em T24 apenas na tarefa que envolveu aprendizagem

relacionada ao medo condicionado, que é o caso da esquiva passiva, mas não na tarefa que envolve reconhecimento de objetos. O substrato neuroanatômico envolvido na aquisição e armazenamento de informações aprendidas nas tarefas de medo condicionado a um contexto se utiliza necessariamente dos núcleos do complexo amigdalóide, sobretudo o complexo basolateral, constituintes do sistema límbico. A partir das evidências das relações indiretas que o NSQ mantém com o sistema límbico, nos remetemos aos experimentos de Lamont *et al.* (2005) que nos apresentam como resultados que a expressão rítmica do gene *Per2* no complexo basolateral é dependente da integridade funcional do NSQ. Como no nosso experimento encontramos que animais em T22 apresentaram pior desempenho em tarefa que envolve memória de medo condicionado, comparados a animais mantidos em ciclo CE de 12:12, os dados com relação à expressão gênica do trabalho de Lamont *et al.* (2005), vem nos trazer a ótica da biologia molecular corroborando com nossos achados comportamentais, de modo que sugerimos que a perturbação funcional do NSQ provocada pela dissociação do ritmo circadiano da atividade locomotora promove alteração no funcionamento de estruturas e sistemas envolvidos com o desempenho cognitivo de determinadas tarefas que avaliam memória.

Porém, o comprometimento mnemônico dos animais do grupo em T22 que ocorreu no teste de esquiva passiva, não foi observado durante o teste do labirinto em cruz elevado, que também pode ser utilizado para avaliar memória. Não houve diferença significativa entre os grupos na segunda sessão (S2) quando analisamos o tempo de permanência nos braços abertos ou centro do labirinto. Como discutimos anteriormente, esse decaimento nos índices comportamentais se refere à habituação aos braços abertos e centro do labirinto que os animais em T22 apresentaram, o que mostra que esse grupo aprendeu sobre o contexto, que gera riscos. Estamos propondo em nosso trabalho que, decorrente da perturbação funcional do NSQ causada pelo ciclo CE de 11:11, uma perturbação funcional ao nível do núcleo central e complexo basolateral da amígdala pode estar relacionada a índices menores de ansiedade e comprometimento do desempenho de ratos em teste de memória frente a uma tarefa que envolve medo condicionado a um contexto. O que podemos então inferir sobre a memória utilizada pelos animais em T22 durante o teste do labirinto em cruz elevado?

O medo que gera ansiedade durante o teste do labirinto pode ser considerado como um medo inato (tanto à ambientes novos, como aos espaços abertos) de preservação ecológica, e possivelmente os animais em T22 expressaram essa resposta a partir de uma única exposição ao labirinto. De outro modo, o medo desencadeado no teste de esQUIVA passiva se refere a um elevado grau de ativação dos sistemas envolvidos nas respostas de medo, condicionado a um contexto que não condiz com a ecologia comportamental de roedores, envolvendo assim uma maior rede de circuitos neurais e respostas comportamentais engajados na aquisição de informações. Respostas de medo inato parecem diferir em relação ao medo condicionado quando são analisadas conjuntamente memória e ansiedade por meio de manipulações farmacológicas através do protocolo do labirinto em cruz elevado modificado, no qual um dos braços fechados do labirinto possui um estímulo aversivo condicionado, sendo possível nessas condições analisar ao mesmo tempo memória e ansiedade, e suas relações (Silva e Frussa-Filho, 2000).

Nas condições que encontramos desordens temporais internas que comprometem a expressão fisiológica de várias funções orgânicas, como em indivíduos com distúrbios do ritmo circadiano do sono, como nas jornadas de trabalho noturno ou em turnos, na privação de sono decorrente ou não desses esquemas de trabalho, como nas mudanças bruscas de fuso horário, ou na depressão, nessas condições o dano à saúde e ao bem-estar do indivíduo e da sociedade justifica o estabelecimento de modelos de estudo que possam esclarecer os mecanismos subjacentes a essas desordens, de modo que intervenções terapêuticas possam ser desenvolvidas. Os dados que apresentamos nos fazem sugerir que o modelo de dissociação do ritmo circadiano da atividade locomotora de ratos em T22, que afeta o funcionamento do sistema de sincronização circadiano, promove modificações comportamentais que podem estar correlacionadas com alterações importantes e pontuais de componentes endógenos que modulam o funcionamento de sistemas neuroendócrinos envolvidos nos processos de regulação e manutenção de comportamentos motivacionais e cognitivos complexos, como nos estados afetivos, no ciclo sono-vigília e na memória.

Das perspectivas de pesquisas futuras que o modelo permite serem realizadas, podem estar a investigação de sistemas de neurotransmissão, o envolvimento de estruturas neurais nas análises comportamentais decorrentes da condição de dissociação, estudos eletrofisiológicos, dosagens hormonais, bem como o comportamento de funções autonômicas ou a expressão de “genes-relógio” em tecidos periféricos. Até o momento o modelo de dissociação do ritmo circadiano da atividade locomotora em T22 foi conseguido apenas em ratos (Chiesa, *et al.*, 2005). A necessidade de generalizar os dados a outras espécies, como primatas não-humanos, pode ser vista como uma etapa a se atingir. Dessa forma, caso ocorra a dissociação do ritmo circadiano de atividade locomotora para a espécie em questão, a análise do comportamento do sono ou o uso de testes comportamentais específicos para a espécie podem ser empregados, o que aumentará a rede de informações a cerca do esclarecimento dos mecanismos funcionais que modulam a expressão do fenômeno rítmico nas diversas funções fisiológicas e comportamentais.

7. CONCLUSÕES

Os nossos resultados permitem concluir que ratos Wistar com dissociação do ritmo circadiano da atividade locomotora por ciclo CE de 22 horas (T22; 11:11), comparados com ratos em ciclo CE de 24 horas (T24; 12:12) apresentaram modificações em comportamentos relacionados à atividade exploratória, ansiedade, depressão e memória, avaliados a partir dos testes de campo aberto, labirinto em cruz elevado, nado forçado, esquiva passiva e reconhecimento de objeto. As modificações observadas foram:

1. Maior atividade exploratória;
2. Menor índice de ansiedade;
3. Menor índice de depressão;
4. Comprometimento da memória contextual de medo, mas não para reconhecimento de objetos.

8. BIBLIOGRAFIA

Abrahamson. E., Moore, R. Y. (2001). Suprachiasmatic Nucleus in the Mouse: Retinal Inervation, Intrinsic Organization and Efferent Projections. *Brain Research*, 916, 172-191.

Adrien, J. (2002). Neurobiological Bases for the Relation Between Sleep and Depression. *Sleep Medicine Reviews*, 6(5), 341-351.

Aguilar-Roblero, R., Granado-Fuentes, D., Caldelas, I., Salazar-Juárez, A., Escobar, C. (2002). Bases Neurales de la Cronobiología Humana: El Sistema Circadiano Distribuido. In: Golombek, D. (ed). *Cronobiología Humana: Ritmos y Relojes Biologicos en la Salud y en la Enfermedad*. (p: 67-83). Buenos Aires: Universidad Nacional de Quilmes.

Akerstedt, T., Fredlund, P., Gillberg, M., Jansson, B. (2005). A Prospective Study of Fatal Occupational Accidents – Relationship to Sleeping Difficulties and Occupational Factors. *Journal of Sleep Research*, 11, 69-71.

Almondes, K. M., Araújo, J. F. (2003). Padrão do Ciclo Sono-Vigília e Ansiedade em Estudantes Universitários. *Estudos de Psicologia*, 8(1), 37-43.

Amir, S., Lamont, E. W., Robinson, B., Stewart, J. (2004). A Circadian Rhythm in the Expression of PERIOD2 Protein Reveals a Novel SCN-Controlled Oscillator in the Oval Nucleus of the Bed Nucleus os the Stria Terminalis. *The Journal of Neuroscience*, 24(4), 781-790.

Araújo, J. F. e Marques, N. (2003). Intermodulação de Frequências dos Ritmos Biológicos. In: Marques, N. e Menna-Barreto, L. (orgs). *Cronobiologia: Princípios e Aplicações*. (pp: 99-117). São Paulo: Editora Universidade de São Paulo.

Araújo, J. F. (2005). Relógios biológicos existem? *Neurociências*, 2(4), 187-188.

Aschoff, J. (1988a). The Circadian System of Man. In: Aschoff, J. (ed). *Handbook of Behavioral Neurobiology: Biological Rhythms*. (p: 311-331). New York: Plenum.

Aschoff, J. (1988b). Free Running and Entrained Circadian Rhythms. In: Aschoff, J. (ed). *Handbook of Behavioral Neurobiology: Biological Rhythms*. (p: 81-93) New York: Plenum.

Aschoff, J. (1998). Circadian Parameters as Individual Characteristics. *Journal of Biological Rhythms*, 13(2), 123-131.

Aton, S. J., Colwell, C. S., Harmar, A. J., Waschek, J., Herzog, E. D. (2005). Vasoactive Intestinal Polypeptide Mediates Circadian Rhythmicity and Synchrony in Mammalian Clock Neurons. *Nature Neuroscience*, 8(4), 476-483.

Bastos, J. R. (2005). Dissociação do Ritmo Circadiano de Atividade Motora de Ratos sob Ciclo Claro-Escuro Simétrico de 22 horas em Condições Seminaturais. Dissertação de Mestrado. Natal, UFRN.

Berger, M., Vollmann, J., Hoagen, F., König, A., Lohner, H., Voderholzer, U., Riemann, D. (1997). Sleep Deprivation Combined with Consecutive Sleep Phase Advance as a Fast-Acting Therapy in Depression: An Open Pilot Trial in Medicated and Unmedicated Patients. *American Journal of Psychiatry*, 154(6), 870-872.

Bertoglio, L. J., Carobrez, A. P. (2000). Previous Maze Experience Required to Increase Open Arms Avoidance in Rats Submitted to the Elevated Plus-maze Model of Anxiety. *Behavioural Brain Research*, 108: 197-203.

Bertoglio, L. J., Carobrez, A. P. (2002). Behavioral Profile of Rats Submitted to Session 1-session 2 in the Elevated Plus-maze During Diurnal / Nocturnal Phases and Under Different Illumination Conditions. *Behavioural Brain Research*, 132, 135-143.

Bertoglio, L. J., Carobrez, A. P. (2005). Ethological and Temporal Analyses of Anxiety-like Behavior: the Elevated Plus-maze Model 20 years on. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 29(8), 1193-1205.

Borbély, A. A. (2001). Processes Underlying the Regulation of the Sleep-wake Cycle. In: Takahashi, R. W., Turek, F., Moore, R. Y. (eds). *Handbook of Behavioral Neurobiology: Circadian Clocks*. (p: 458-479). New York: Kluwer Academic / Plenum.

Bunney, W. E., Bunney, B. G. (2000). Molecular Clock Genes in Man and Lower Animals: Possible Implications for Circadian Abnormalities in Depression. *Neuropsychopharmacology*, 22(4), 335-345.

Cambras, T., Vilaplana, A., Campuzano, M. M., Canal-Corretger, & Díez-Noguera, A. (2000). Entrainment of the Rat Motor Activity Rhythm: Effects of Light-Dark Cycles and Physical Exercise. *Physiology & Behaviour*, 70, 227-232.

Cambras, T., Chiesa, J., Araújo, J. F., Díez-Noguera, A. (2004). Effects of Photoperiod on Rat Motor Activity Rhythm at the Lower Limit of Entrainment. *Journal of Biological Rhythms*, 19(3), 216-225.

Campuzano, A., Vilaplana, J., Cambras, T., Díez-Noguera, A. (1997). Dissociation of the Rat Motor Activity Under T Cycles Shorter than 24 Hours. *Physiology & Behaviour*, 63(2), 171-176.

Campuzano, A., Vilaplana, J., Cambras, T., Díez-Noguera, A. (1999). The Role of Wheel Running in the Coupling of the two Simultaneous Circadian Rhythms of the Motor Activity in Rat. *Biological Rhythms*, 30(5), 497-507.

Cavalcante, J. S., Alves, A. S., Costa, M. S. M. O., Britto, L. R. G. (2002). Differential Distribution of Afferents Containing Serotonin and Neuropeptide Y within the Marmoset Suprachiasmatic Nucleus. *Brain Research*, 927, 200-203.

Chen, H., Tang, Y. (1989). Sleep Loss Impairs Inspiratory Muscle Endurance. *American Review of Respiratory Disease*, 140, 907-909.

Chiesa, J. J., Golombek, D. A. (1999). Fisiología de la Desincronización por Vuelos Transmeridianos de Larga Duración (*Jet Lag*). *Actas de Fisiología*, 5, 21-38.

Chiesa, J. J., Anglès-Pujolràs, M., Díez-Noguera, A., Cambras, T. (2005). Activity Rhythm of Golden Hamster (*Mesocricetus auratus*) Can Be Entrained to a 19-h Light-Dark Cycle. *American Journal of Physiology – Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 289, R998-R1005.

Costa, G. (1996). The Impact of Shift and Night Work on Health. *Applied Ergonomic*, 27(1), 9-16.

Costa, M. S. M. O., Moreira, L., Alones, V., Lu, J., Santee, U. R., Cavalcante, J. S., Moraes, P. R. A., Britto, L. R. G., Menaker, M. (1998). Characterization of the Circadian System in a Brazilian Species of Monkey (*Callithrix jacchus*): Immunohistochemical Analysis and Retinal Projections. *Biological Rhythm Research*, 29, 393-403.

Davis, S., Mirick, D. K., Stevens, R. G. (2001). Night Shift Work, Light at Night, and Risk of Breast Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 93(20), 1557-1562.

de la Iglesia, H. O., Cambras, T., Schwartz, W. J., Díez-Noguera, A. (2004). Forced Desynchronization of Dual Circadian Oscillators within the Rat Suprachiasmatic Nucleus. *Current Biology*, 14, 796-800.

Dellu, S., Fauchey, V., Le Moal, M., Simon, H. (1997). Extension of a New Two-trial Memory Task in the Rat: Influence of the Environmental Context on Recognition Processes. *Neurobiology of Learning and Memory*, 67(2), 112-120.

Detke, M. J., Rickels, M., Lucki, I. (1995). Active Behaviors in the Rat Forced Swimming Test Differentially Produced by Serotonergic and Noradrenergic Antidepressants. *Psychopharmacology*, 121, 66-72.

Duffy, J. F., Dijk, D-J. (2002). Getting Through to Circadian Oscillators: Why Use Constant Routines? *Journal of Biological Rhythms*, 17(1), 4-13.

Gale, G. D., Anagnostaras, S. G., Godsil, B. P., Mitchell, S., Nozawat, T., Sage, J. R., Wiltgen, B., Fanselow, M. (2004). Role of the Basolateral Amygdala in the Storage of Fear Memories Across the Adult Lifetime of Rats. *The Journal of Neuroscience*, 24(15), 3810-3815.

Gregus, A., Wintink, A. J., Davis, A. C., Kalynchuk, L. E. (2005). Effect of Repeated Corticosterone Injections and Restraint Stress on Anxiety and Depression-like Behavior in Male Rats. *Behavioural Brain Research*, 156, 105-114.

Hasting, M. H., Reddy, A. B., Marywood, E. S. (2003). A Clockwork Web: Circadian Timing in Brain and Periphery, in Health and Disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 4, 649-661.

Kalynchuk, L. E., Pinel, J. P., Treit, D., Kippin, T. E. (1997). Changes in Emotional Behavior Produced by Long-term Amygdala Kindling in Rats. *Biological Psychiatry*, 41, 438-451.

Karlsson, B. H., Knutsson, A. K., Lindahl, B. O., Alfredsson, L. S. (2003). Metabolic Disturbance in Male Workers with Rotating Three-shift Work. Results of the WOLF Study. *International Archive in Occupational Environmental Health*, 69, 83-90.

Knutson, A. (2003). Health disorders of shift work. *Occupational Medicine*, 53, 103-108.

Koorengevel, K. M., Beersma, D. G. M. (2002). A Forced Desynchrony Study of Circadian Pacemaker Characteristics in Seasonal Affective Disorder. *Journal of Biological Rhythms*, 17(5), 463-475.

Lamont, E. W., Robinson, B., Stewart, J., Amir, S. (2005). The Central and Basolateral Nuclei of the Amygdala Exhibit Opposite Diurnal Rhythm of Expression of the Clock Protein Period 2. *PNAS*, 102(11), 4180-4184.

Le Doux, J. E. (2000). Emotion Circuits in the Brain. *Annual Review of Neuroscience*, 23, 155-184.

Leak, R. K., Moore, R. Y. (2001). Topographic Organization of Suprachiasmatic Nucleus Projection Neurons. *The Journal of Comparative Neurology*, 433, 312-334.

Lee, H. S., Billings, H. J., Lehman, M. N. (2003). The Suprachiasmatic Nucleus: A Clock of Multiple Components. *Journal of Biological Rhythms*, 18(6), 435-449.

Lino-de-Oliveira, C., Lima, T. C. M., Carobrez, A. P. (2005). Structure of the Rat Behaviour in the Forced Swimming Test. *Behavioural Brain Research*, 158, 243-250.

Lucki, I. (1997). The Forced Swimming Test as a Model for Core and Component Behavioral Effects of Antidepressant Drugs. *Behavioural Pharmacology*, 8, 523-532.

Maren, S. (2005). Building and Burying Fear Memories in the Brain. *The Neuroscientist*, 11(1), 89-99.

Marques, M. D. (2002). Ritmos Biológicos y Ciclos Ambientales: Sincronización. In: Golombek, D. (ed). *Cronobiología Humana: Ritmos y Relojes Biologicos en la Salud y en la Enfermedad*. (p: 85-99). Buenos Aires: Universidad Nacional de Quilmes.

Marques, M. D., Golombek, D., Moreno, C. (2003). Adaptação Temporal. In: Marques, N. e Menna-Barreto, L. (orgs). *Cronobiologia: Princípios e Aplicações*. (p: 55-98). São Paulo: Editora Universidade de São Paulo.

Medeiros, A. L., Mendes, D. B., Lima, P. F., Araújo, J. F. (2001). The Relationship Between Sleep-Wake Cycle and Academic Performance in Medical Students. *Biological Rhythm Research*, 32(2), 263-270.

Miller, J. D. (1998). The SCN is Comprised of a Population of Coupled Oscillators. *Chronobiology International*, 15(5), 489-511.

Mitani, S., Fujita, M., Shirakawa, T. (2005). Circadian Variation of Cardiac Autonomic Nervous Profile is Affected in Japanese Ambulance Men with a Working System of 24-h Shifts. *International Archive in Occupational Environmental Health*.

Monk, T. H., Buysse, D. J., Reynolds, C. F., Berga, S. L., Jarret, D. B., Begley, A. E., Kupfer, D. J. (1997). Circadian Rhythms in Human Performance and Mood Under Constant Conditions. *Journal of Sleep Research*, 6, 9-18.

Monk, T. (2000). What Can the Chronobiologist Do to Help the Shift Worker? *Journal of Biological Rhythms*, 15(2), 86-94.

Moore, R. Y., Silver, R. (1998). Suprachiasmatic Nucleus Organization. *Chronobiology International*, 15(5), 475-487.

Ralph, M. R., Ko, C. H., Antoniadis, E. A., Seco, P., Irani, F., Presta, C., McDonald, R. J. (2002). The Significance of Circadian Phase for Performance on a Reinward-based Learning Task in Hamsters. *Behavioural Brain Research*, 136, 179-184.

Rajaratnam, S. M., Arendt, J. (2001). Health in a 24-h society. *Lancet*, 358, 999-1006.

Rodgers, R. J., Cao, B. J., Holmes, A. (1997). Animal Models of Anxiety: An Ethological Perspective. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 30, 289-304.

Rosekind, M. (2005). Underestimating the Societal Costs of Impaired alertness: Safety, Health and Productivity Risks. *Sleep Medicine*, 6(suppl. 1), 521-525.

Spengler, C. M., Shea, S. A. (2000). Endogenous Circadian Rhythm of Pulmonary Function in Healthy Humans. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 162, 1038-1046.

Silva, R. H., Chehin, A. B., Kameda, S. R., Takatsu-Coleman, A. L., Abílio, V. C., Tufik, S., Frussa-Filho, R. (2004). Effects of Pré- or Post-training Paradoxal Sleep

Deprivation on Two Animal Models of Learning and Memory in Mice. *Neurobiology of Learning and Memory*, 82(2), 90-98.

Suchecki, D. & Tufik, S. (2000). Social Stability Attenuates the Stress in the Modified Multiple Platform Method for Paradoxal Sleep Deprivation in the Rat. *Physiology & Behaviour*, 69, 309-316.

Suchecki, D., Tiba, P. A., Tufik, S. (2002). Hormonal and Behavioural Responses of Paradoxal Sleep-Deprived Rats to the Elevated Plus Maze. *Journal of Neuroendocrinology*, 14, 549-554.

Valentinuzzi, V. S., Ferrari, E. A. M. (1997). Habituation to Sound During Morning and Night Sessions in Pigeons (*Columba livia*). *Physiology & Behavior*, 67, 1203-1209.

Valentinuzzi, V. S., Kolker, D. E., Vitaterna, M. H., Ferrari, E. A. M., Takahashi, J. S., Turek, F. W. (2001). Effect of Circadian Phase on Context and Cued Fear Conditioning in C57BL/6J Mice. *Animal Learning & Behavior*, 29(2), 133-142.

Valentinuzzi, V. S. (2002). Ritmos en Processos de Aprendizaje y Memoria: El Sistema Circadiano Distribuido. In: Golombek, D. (ed). *Cronobiología Humana: Ritmos y Relojes Biologicos en la Salud y en la Enfermedad*. (p: 189-205). Buenos Aires: Universidad Nacional de Quilmes.

Valentinuzzi, V. S., Menna-Barreto, L., Xavier, G. F. (2004). Effect of Circadian Phase on Performance in the Water Maze Task. *Journal of Biological Rhythms*, 19(4), 312-324.

Valentinuzzi, V. S., Duque Neto, S. P., Tércio, B. C., Santana, K., Araújo, J. F. (2005). Efeito Temporal no Condicionamento de Lugar em Primata (*Callithrix*

jacchus). [Resumo]. In Time, Memory and Sleep. *International Symposium on Circadian Rhythms, Sleep and Memory* (p. 21). Natal.

Walker, D. L., Toufexis, D. J., Davis, M. (2003). Role of the Bed Nucleus of the Stria Terminalis versus the Amygdala in Fear, Stress, and Anxiety. *European Journal of Pharmacology*, 463, 199-216.

Weibel, L., Maccari, S., Van Reeth, O. (2002). Circadian Clock Functioning Is Linked to Acute Stress Reactivity in Rats. *Journal of Biological Rhythms*, 17(5), 438-446.

Wirz-Justice, A., den Hoofdakker, R. H. (1999). Sleep Deprivation in Depression: What Do We Know, Where Do We Go?. *Biological Psychiatry*, 46: 445-453.

Wirz-Justice, A. (2006). Biological Rhythm Disturbances in Mood Disorders. *International Clinical Psychopharmacology*, 21(suppl. 1), S11-S15.

Wright, K. P., Hull, J. T., Czeisler, C. A. (2002). Relationship between Alertness, Performance and Body Temperature in Humans. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 283, R1370-R1377.

Yannielli, P. (2002). Cronobiología de la Ansiedad y de la Depresión Mayor. In: Golombek, D. (ed). *Cronobiología Humana: Ritmos y Relojes Biologicos en la Salud y en la Enfermedad*. (p: 171-187). Buenos Aires: Universidad Nacional de Quilmes.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)