

Universidade Federal de Juiz de Fora
Pós-graduação em Ciências Biológicas
Mestrado em Comportamento e Biologia Animal

Shayenne Elizianne Ramos

**EFEITO DA CONDIÇÃO CLARO/ESCURO E DA INTENSIDADE LUMINOSA NA
APRENDIZAGEM E MEMÓRIA DE TRABALHO DE CAMUNDONGOS SWISS**

Juiz de Fora

2011

Shayenne Elizianne Ramos

**EFEITO DA CONDIÇÃO CLARO/ESCURO E DA INTENSIDADE LUMINOSA NA
APRENDIZAGEM E MEMÓRIA DE TRABALHO DE CAMUNDONGOS SWISS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, área de concentração: Comportamento e Biologia Animal, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Mourão Júnior

Juiz de Fora

2011

Ramos, Shayenne Elizianne

Efeito da condição claro/escuro e da intensidade luminosa na aprendizagem e memória de trabalho de camundongos Swiss / Shayenne Elizianne Ramos. – 2011.

36 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Comportamento e Biologia Animal)—
Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2011.

1. Comportamento animal I. Título.

CDU 591.51

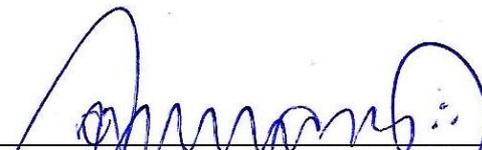
Shayenne Elizianne Ramos

**EFEITO DA CONDIÇÃO CLARO/ESCURO E DA INTENSIDADE LUMINOSA NA
APRENDIZAGEM E MEMÓRIA DE TRABALHO DE CAMUNDONGOS SWISS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, área de concentração: Comportamento e Biologia Animal, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Aprovada em 28 de fevereiro de 2011.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Carlos Alberto Mourão Júnior (Orientador)
Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof. Dr. Luis David Solis Murgas
Universidade Federal de Lavras



Profª. Dra. Sthefane D'ávila de Oliveira e Paula
Universidade Federal de Juiz de Fora

À minha família que esteve sempre ao meu lado, me apoiando e incentivando diante das dificuldades. Amo muito vocês.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador *Carlos Alberto Mourão Júnior* por toda atenção, paciência e confiança depositada no trabalho, por suas críticas e conversas que enriqueceram minha formação profissional e pessoal.

Aos órgãos financiadores do projeto, *UFJF e CAPES*.

À *Universidade Federal de Juiz de Fora* e ao *Departamento de Fisiologia*.

Ao *Centro de Biologia da Reprodução da UFJF (CBR/UFJF)* pelo fornecimento dos animais para a pesquisa.

Ao programa de *pós-graduação*.

À minha amiga e ajudante de laboratório *Natália Trindade de Souza* que me auxiliou durante toda a experimentação.

Ao meu querido amigo *André Rodrigues de Souza* por toda amizade, ajuda e esclarecimento de muitas dúvidas.

Aos amigos do mestrado *Mamede, Jú, Mona, Paula e Fran* que me acolheram com todo carinho em Juiz de Fora e me proporcionaram grandes momentos.

À *minha família*, que mesmo à distância, esteve sempre presente, me apoiando.

À *Deus* por sempre me acompanhar.

RESUMO

Em um organismo, o sistema circadiano modula muitos processos fisiológicos e comportamentais, como aprendizagem e memória. Adicionalmente, a melatonina também tem sido mostrada como moduladora desses processos cognitivos. No entanto, diferentes programas de iluminação são utilizados em animais de produção e a melatonina tem sido usada como suplemento alimentar e no tratamento de alterações da ritmicidade circadiana. Logo, há necessidade de serem realizados mais estudos sobre os efeitos gerados por manipulações no ritmo circadiano e pela melatonina. Como ambos estão diretamente relacionados à iluminação, o presente trabalho teve como objetivo investigar o efeito de diferentes condições de claro/escuro no biotério e intensidade luminosa durante testes comportamentais na aprendizagem e memória de trabalho de camundongos Swiss. No biotério, camundongos Swiss foram mantidos em ciclo claro-escuro de 12:12 h (C), claro constante (L) ou escuro constante (E) e testados no labirinto Lashley III e Teste de Reconhecimento de Objetos sob iluminação de 500 ou 0 lux, resultando seis tratamentos (C500, C0, L500, L0, E500 e E0). Não houve diferença significativa entre o ciclo claro-escuro de 12:12 h, claro constante e escuro constante no biotério e nem entre os testes realizados a 500 e 0 lux. Somente os animais mantidos em escuro constante e testados a 0 lux, tratamento E0, tiveram a aprendizagem e memória de trabalho prejudicados, demonstrados pela aprendizagem mais lenta no labirinto Lashley III e o não reconhecimento do objeto no Teste de Reconhecimento de Objetos.

Palavras-chave: Cognição. Melatonina. Ritmos circadianos. Labirinto Lashley III. Teste de Reconhecimento de Objetos.

ABSTRACT

In an organism, the circadian system modulates many physiological and behavioral processes such as learning and memory. Additionally, melatonin has also been shown to modulate these cognitive processes. However, different lighting programs are used in production animal and the melatonin has been used as a food supplement and in the treatment of circadian rhythmic changes. Therefore, there is need for more studies be conducted on the effects caused by manipulations in the circadian rhythm and by melatonin. Because both are directly related to lighting, this study aimed to investigate the effect of different light/dark conditions in stock room and light intensity during behavioral tests in learning and working memory of Swiss mice. In a stock room, Swiss mice were kept on a 12:12 light/dark cycle (C), constant light (L) or constant darkness (E). They were tested in the Lashley III maze and Object-recognition task under 500 or 0 lx illuminations, resulting in six treatments (C500, C0, L500, L0, E0 and E500). There wasn't significant difference between 12:12 light/dark cycle, constant light and constant darkness conditions in stock room neither between the tests conducted at 500 and 0 lx. Only animals kept in constant darkness and tested at 0 lx, E0 treatment, had impaired learning and working memory, demonstrated by slower learning in the Lashley III maze and the non-recognition of the object in Object-recognition task.

Keywords: Cognition. Melatonin. Circadian rhythm. Lashley III maze. Object-recognition task.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 REVISÃO DE LITERATURA	9
2.1 RITMOS CIRCADIANOS	9
2.2 APREDIZAGEM E MEMÓRIA	16
2.3 TESTES COMPORTAMENTAIS	14
2.3.1 Teste no labirinto Lashley III	14
2.3.2 Teste de Reconhecimento de Objetos (TRO)	15
3 MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1 ANIMAIS	16
3.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	17
3.2.1 Teste no labirinto Lashley III	18
3.2.2 Teste de Reconhecimento de Objetos (TRO)	20
3.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	21
4 RESULTADOS	23
4.1 LABIRINTO LASHLEY III	23
4.2 TESTE DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS	26
5 DISCUSSÃO	27
REFERÊNCIAS	31
ANEXO 1	36

1 INTRODUÇÃO

A iluminação é um fator ambiental importante para diversos organismos, na qual alguns ritmos biológicos são sincronizados com o ciclo claro/escuro, por isso, são conhecidos como ritmos circadianos. Esta ritmicidade é determinada, em mamíferos, pelos Núcleos Supraquiasmáticos. No entanto, são sincronizados com o ciclo claro/escuro ambiental por um sinal humoral dado pelo hormônio melatonina, sintetizado, principalmente, pela glândula pineal durante a fase escura do ciclo (CARDINALI, 1981; MOORE, 1983).

Em um organismo, o sistema circadiano modula diferentes processos fisiológicos e comportamentais (YOUNG, 2000). Há evidências de que esta variação circadiana possa afetar tarefas de aprendizagem e memória (GERSTNER; YIN, 2010) e, ao mesmo tempo, a melatonina tem sido mostrada como moduladora desses processos cognitivos (CAO et al., 2009). No entanto, distintos programas de iluminação são aplicados, na área de zootecnia, em animais de produção (FREITAS et al., 2010) e o hormônio melatonina tem sido utilizado em suplementos alimentares (CAO et al., 2009) e no tratamento do *jet lag* (PAUL et al., 2010, 2011).

Logo, há necessidade de serem realizados mais estudos sobre os efeitos gerados por manipulações no ritmo circadiano e pela melatonina. Como ambos estão diretamente relacionados à iluminação ambiental, uma forma de se estudar tal influência é a partir de manipulações no ciclo claro/escuro e na intensidade luminosa. Parece razoável suspeitar que mudanças no ciclo claro/escuro prejudicam a aprendizagem e memória dos animais e o escuro também causaria déficits em ambos os processos cognitivos por influência do hormônio melatonina.

Como camundongos Swiss possuem o comportamento de neofilia, explorar coisas novas (BERLYNE, 1950; HUGHES, 2007), isso faz com que estes animais sejam modelos de estudo adequados para este tipo de pesquisa. Adicionalmente, não foram encontrados estudos correlacionando a iluminação com aprendizagem e memória de trabalho destes animais.

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo analisar o efeito de diferentes condições de claro/escuro no biotério e intensidade luminosa durante testes comportamentais na aprendizagem e memória de trabalho de camundongos Swiss.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 RITMOS CIRCADIANOS

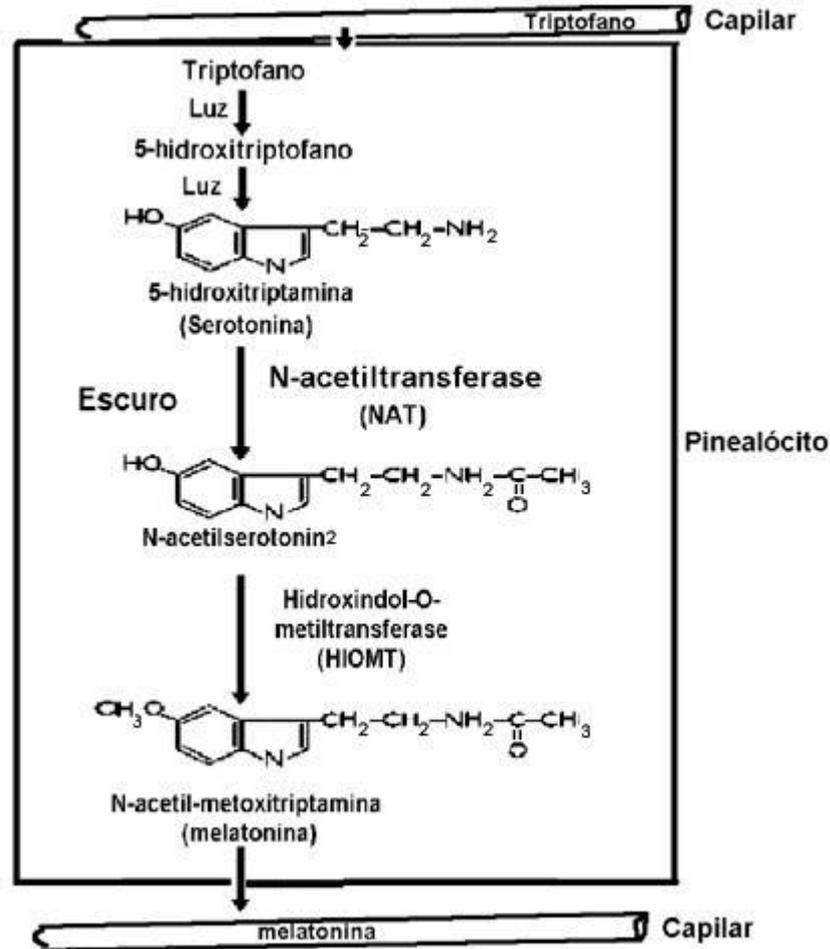
Os ritmos biológicos são manifestações de um fenômeno que se repete com o mesmo período e muitos destes estão associados à iluminação ambiental, por meio do ciclo claro/escuro. Deste modo, são conhecidos como ritmos circadianos e possuem um período de aproximadamente 24 horas, de acordo com a espécie, como atividade-reposo e secreção de hormônios. Os ritmos que não estão associados ao ciclo claro/escuro são agrupados em: infradianos, com períodos maiores que 24 horas, como o ciclo reprodutivo em mulheres, e os ultradianos, cujo período é menor que 24 horas, como respiração e batimento cardíaco (BRIDGES et al., 1993; MARQUES; MENNA-BARRETO, 1997).

A ritmicidade circadiana é determinada por um relógio interno (marca-passo), que são osciladores primários, exibindo um padrão oscilatório geneticamente determinado, auto-sustentado, endógeno, mesmo na ausência de pistas ambientais. Em mamíferos, o marca-passo são os Núcleos Supraquiasmáticos (NSQ), formados por um par de núcleos situados no hipotálamo (MARKUS; BARBOSA JÚNIOR; FERREIRA, 2003).

Os NSQ conferem o ritmo, no entanto, estes são sincronizados com o ciclo claro/escuro ambiental por um sinal humoral dado pelo hormônio melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina). Este hormônio é sintetizado, principalmente, pela glândula pineal em células chamadas pinealócitos (CARDINALI, 1981; MOORE, 1983). Contudo, uma pequena quantidade deste hormônio é produzida na retina, osso, pele, intestino, plaquetas e bile (CLAUSTRAT; BRUN; CHAZOT, 2005).

Na glândula pineal, o aminoácido triptofano é convertido em 5-hidroxitriptofano e este é transformado em serotonina (5-hidroxitriptamina) pela ação da enzima aromática aminoácido descarboxilase. Durante a fase escura do ciclo ocorre a síntese da enzima N-acetiltransferase (NAT), que metaboliza a serotonina em N-acetilserotonina. Parte deste produto lipossolúvel é lançada na circulação, mas parte é metabolizada pela enzima hidroxí-indol-O-metil-transferase (HIOMT) em

melatonina (ARENDR, 1998; MARKUS; BARBOSA JÚNIOR; FERREIRA, 2003), como ilustrado no Esquema 1.

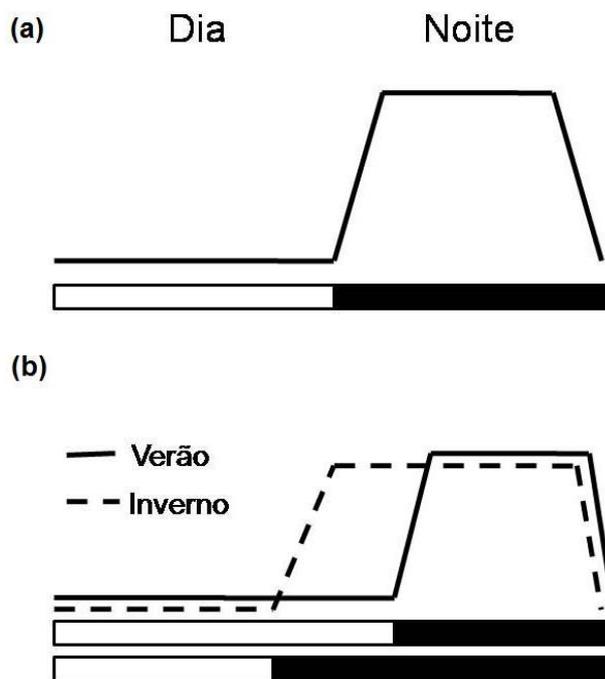


Esquema 1 - Biossíntese de melatonina (Adaptado de MAGANHIN et al., 2008).

A etapa limitante na síntese de melatonina é a conversão da serotonina em N-acetilserotonina, que ocorre somente no período de escuro. Neste período, a atividade da enzima N-acetiltransferase está aumentada em até 100 vezes e é interrompida no final da noite ou quando existe um pulso de luz no período de escuro (TAMURA, 2006).

A transmissão da informação de claro/escuro ambiental chega à pineal de maneira indireta, através de projeções da retina, que ao informar a fase escura ocorre a síntese e secreção de melatonina (CARDINALI, 1981; MOORE, 1983). Isso faz com que seu pico diário coincida sempre com a fase escura, enquanto, durante a fase clara sua concentração encontra-se a níveis basais (ZUKER; BOSHER; DARK, 1983) (Esquema 2a).

De acordo com Arendt e Skene (2005), em condições normais, a duração do período secretório de melatonina são menores no verão (noites curtas) que no inverno (noites longas) (Esquema 2b). Essa alternância do período secretório serve como sinal temporal para a organização de funções dependentes da duração do dia, como reprodução, comportamento e crescimento de pelagem em alguns animais (ARENDDT; SKENE, 2005).



Esquema 2 - Perfis esquemáticos de secreção de melatonina. (a) Perfil circadiano. (b) Perfil sazonal (Adaptado de CIPOLLA-NETO; AFECHE, 2008).

Portanto, é a concentração de melatonina na circulação sanguínea e nos líquidos corpóreos que sinaliza a noite ou o dia no meio exterior e pelas características do seu perfil plasmático noturno (duração do período secretório) qual a estação do ano. A partir disso, o sistema nervoso central dispara mecanismos adaptativos para noite/dia e para a estação do ano correspondente (MARQUES; MENNA-BARRETO, 1997), tanto para animais de hábito diurno quanto de hábito noturno, uma vez que possuem o mesmo padrão de secreção de melatonina (ZEITZER et al., 2000; ZHDANOVA, 2005).

Em um organismo, o sistema circadiano modula muitos processos fisiológicos e comportamentais (LOUDON; SEMIKHODSKII; CROSTHWAIT, 2000; YOUNG, 2000). Há evidências de que esta variação circadiana possa ser uma característica

geral do desempenho de animais em tarefas de aprendizagem e memória (CHAUDHURY; COLWELL, 2002; GERSTNER; YIN, 2010) e, ao mesmo tempo, a melatonina tem sido mostrada como moduladora desses processos cognitivos (CAO et al., 2009; SOTO-MOYANO et al., 2006).

2.2 APRENDIZAGEM E MEMÓRIA

Segundo Silva (2006), as funções cognitivas são estruturas básicas que servem de apoio a todas as operações mentais. Sua origem está nas conexões cerebrais e são capacidades que nos permitem perceber, elaborar e expressar informações (SILVA, 2006). A aprendizagem e a memória são algumas dessas funções.

A aprendizagem consiste no processo pelo qual os animais adquirem informação a respeito do meio e a memória é o mecanismo de retenção ou conservação dessas informações (KANDEL; SCHWARTZ; JESSEL, 1995). A chamada memória de trabalho (ou operacional) é um tipo de memória de curto prazo, que dura poucos segundos, cuja função é armazenar as informações somente enquanto uma determinada tarefa está sendo realizada. É desempenhada pelos neurônios do córtex pré-frontal e depende, simplesmente, da atividade elétrica dos neurônios dessa região (IZQUIERDO, 2002).

Por outro lado, a memória de longa duração pode durar dias, meses ou até anos, pois a informação é fixada de forma permanente, por meio de um processo chamado consolidação da memória. O mecanismo ocorre através da potenciação de longa duração (LTP), na qual há um aumento persistente da resposta de neurônios, principalmente do hipocampo, à breve estimulação repetitiva de um axônio ou conjunto de axônios (IZQUIERDO, 2002). Este é um dos principais mecanismos sinápticos, através dos quais traços de memória são codificados e armazenados no hipocampo, córtex cerebral e em outras regiões do sistema nervoso central (MARTIN; GRIMWOOD; MORRIS, 2000)

Ratos Long-Evans submetidos à dessincronização do ritmo circadiano, por alterações de fase do ciclo claro/escuro, tiveram a memória prejudicada, sugerindo que distúrbios do ritmo circadiano podem prejudicar a consolidação da informação no hipocampo (DEVAN et al., 2001). Este fato pode estar relacionado a ocorrência

de variações, ao longo de 24 horas, da LTP do hipocampo, como demonstrado por Barnes e outros (1977) em ratos, cuja a atividade sináptica foi maior no meio da fase escura e menor no meio da fase clara.

Chaudhury e Colwell (2002) também relataram que a habilidade de aprender uma tarefa de condicionamento aversivo é alterada pelo sistema circadiano. Camundongos C3H e C-57/6J aprenderam essa tarefa melhor durante a fase clara que na escura, mas os mecanismos subjacentes à modulação circadiana da função de aprendizagem e memória são desconhecidos. Porém, segundo esses autores, muitos processos fisiológicos, como secreção de hormônios, que apresentam variação circadiana, poderiam ser a base da mudança na aprendizagem.

O hormônio melatonina, por exemplo, tem sido apontado como modulador dessas funções cognitivas. Testes aplicados por Soto-Moyano e outros (2006) em ratos Long–Evans, demonstraram que a administração de melatonina, nas concentrações de 0,1; 1,0 e 10 mg/Kg injetadas intraperitonealmente 30 minutos antes do teste de memória, prejudicou a memória de trabalho dos animais. Isto foi indicado pelo desempenho deficiente no labirinto radial dos animais que receberam melatonina em comparação aos ratos controle. Segundo os mesmos autores, a melatonina inibiu a LTP de forma dose-dependente, sendo que a dose maior impediu completamente o desenvolvimento da LTP no neocórtex.

Cao e outros (2009) obtiveram o mesmo resultado quando administraram de forma crônica este hormônio em ratos Wistar. Durante 60 dias, os animais receberam 3 mg/Kg de melatonina e tiveram a aprendizagem e memória prejudicadas, uma vez que a melatonina inibiu a atividade elétrica de neurônios do hipocampo (CAO et al., 2009).

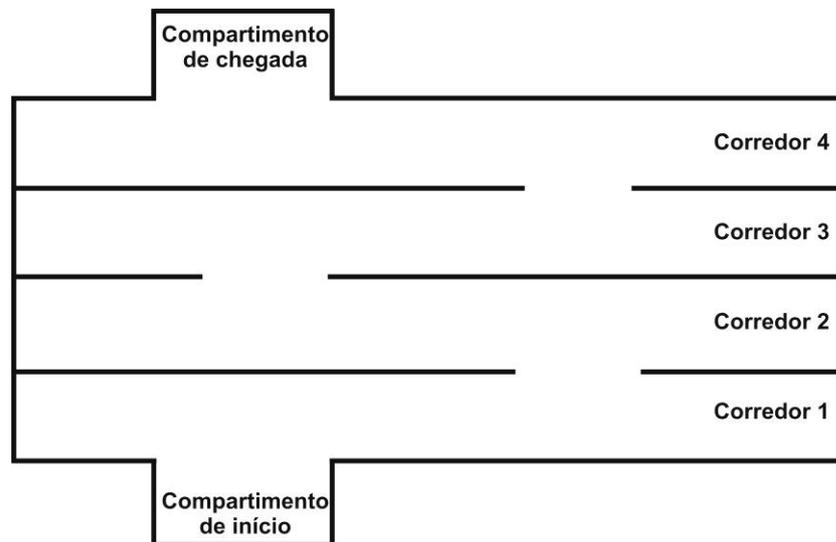
Entretanto, camundongos Swiss com déficits na aprendizagem, devido a estresse oxidativo mediado por radiação, obtiveram melhora na aprendizagem quando tratados com 0,1 mg/Kg de melatonina (MANDA et al., 2007). Por possuir propriedades antioxidantes (TAN et al., 1993), a melatonina pode ter agido de forma indireta na melhora da aprendizagem.

Pelo fato de estudos demonstrarem que o sistema circadiano e o hormônio melatonina atuam sobre as funções cognitivas e ambos estão diretamente relacionados à iluminação ambiental, uma forma de se estudar tal influência é a partir de manipulações no ciclo claro/escuro e na intensidade luminosa durante testes experimentais.

2.3 TESTES COMPORTAMENTAIS

2.3.1 Teste no labirinto Lashley III

O labirinto Lashley III foi descrito primeiramente pelo psicólogo americano Karl Lashley (LASHLEY, 1963). Este labirinto é constituído por quatro corredores, interpostos entre dois compartimentos, um de início e outro de chegada. Cada corredor apresenta uma porta que os interligam (LASHLEY, 1963), como ilustrado no Esquema 3.



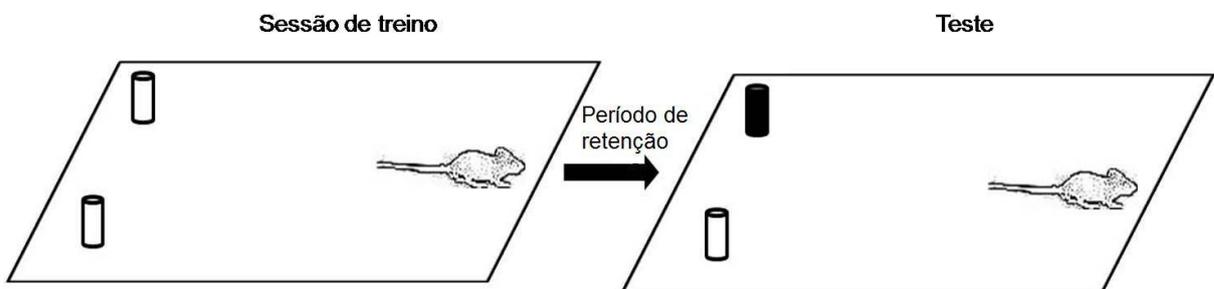
Esquema 3 - Labirinto Lashley III.

O objetivo do teste é que o animal saia do compartimento de início e atinja o compartimento de chegada passando pelos corredores. No entanto, este labirinto contém fundos cegos que os animais têm que aprender a evitar e escolhas (virar à direita ou à esquerda), na qual o animal tem que aprender a fazer a escolha certa para poder resolver o labirinto em sucessivos ensaios (ROSEN et al., 1995). É por meio do número de erros cometidos ao longo da experimentação que este teste comportamental avalia a aprendizagem dos animais.

2.3.2 Teste de Reconhecimento de Objetos (TRO)

Este teste é baseado na tendência de ratos e camundongos explorarem mais objetos novos que objetos já familiarizados (BERLYNE, 1950), o que permite o estudo da memória nestes animais.

O protocolo para a realização do teste foi elaborado por Bevins e Besheer (2006) e consiste de duas fases. Na primeira, o animal avaliado é colocado em um ambiente distinto ao da gaiola, na presença de dois objetos iguais para familiarizar-se com eles, chamada de sessão de treino. Após essa sessão, o animal é retornado a sua gaiola para o período de retenção das informações, que varia de acordo com o tipo de memória que se deseja estudar. Em seguida, fase de teste, o animal é recolocado ao ambiente junto a dois objetos: um já familiarizado (antigo) e um novo (Esquema 4), registrando-se o tempo que o animal explora cada objeto. O reconhecimento é distinguido pelo animal passar mais tempo explorando o objeto novo.



Esquema 4 - Teste de Reconhecimento de Objetos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram avaliados 57 camundongos machos Swiss adultos (idade média de 90 dias), com peso médio de 45 g, fornecidos pelo Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora (CBR/UFJF). Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Neurofisiologia e Endocrinofisiologia da UFJF e alojados em grupos de oito a dez animais em gaiolas de polipropileno com dimensões de 41 x 34 x 16 cm, forradas com maravalha.

A temperatura média foi de $20,51 \pm 2,48$ °C e umidade média de $68,31 \pm 6,53$ %, registrados com termohigrômetro digital (ICEL manaus HT-7100) durante todo o experimento. O valor de umidade registrado foi maior do que o considerado ideal (55 ± 10 %) pela Fundação Oswaldo Cruz (PAIVA; MAFFILI; SANTOS, 2005), no entanto, todos os camundongos passaram por esta condição, eliminando, assim, a possível influência dessa variável entre os tratamentos.

O biotério é equipado com exaustores de ar que possibilitou a ventilação adequada em seu interior, impedindo o acúmulo de amônia derivada da ação de bactérias urease positivas sobre as excretas (POLITI; PIETRO; SALGADO, 2008).

A fim de garantir o máximo bem-estar dos animais e evitar influências, antes dos testes, os camundongos foram manuseados somente durante a limpeza das gaiolas, realizada duas vezes por semana sempre pelo mesmo pesquisador e no mesmo horário. Houve cuidado de tentar evitar ruídos durante os procedimentos e os animais permaneceram em ambientação ao biotério por sete dias (BOEHM et al., 1998), com água e ração à vontade e sob ciclo claro-escuro de 12:12 h (luzes acesas às 7:00 h).

Após toda a experimentação, os animais foram eutanasiados pelo método de aprofundamento da anestesia (300 mg/Kg de Quetamina + 30 mg/Kg de Xilazina) via intraperitonal (CLOSE et al., 1997). Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal da UFJF (protocolo número 043/2009, Anexo 1) e estão de acordo com os princípios indicados no Guia

para o cuidado e uso de animais de laboratório (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1996).

3.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Após o período de ambientação ao biotério, os camundongos foram divididos em três grupos de, respectivamente, 17, 20, 20 animais. Cada grupo recebeu uma nova condição de claro/escuro no biotério, exceto o grupo controle que permaneceu a mesma. Esta condição foi mantida durante todo o experimento e são eles:

- Grupo Controle (C): mantido em ciclo claro-escuro de 12:12 h;
- Grupo Luz (L): submetido à claro constante (aproximadamente 25 lux);
- Grupo Escuro (E): mantido em escuro constante.

Quatro dias depois foram iniciados os testes comportamentais, conduzidos em uma sala adjacente ao biotério. A escolha por iniciar os testes depois de quatro dias foi fundamentada no trabalho de Martinez, Garcia e Morato (2005), porém não há consenso na literatura sobre o tempo de acomodação que os animais devem ser mantidos, antes de iniciar testes, quando ocorrem manipulações do ciclo claro/escuro.

Cada grupo foi subdividido em dois subgrupos, conforme a intensidade luminosa no momento dos testes, sendo um testado a 500 lux e o outro a 0 lux (medidos no centro dos aparatos). Deste procedimento resultaram seis tratamentos de, respectivamente, 9, 8, 10, 10, 10, 10 animais: C500; C0; L500; L0; E500 e E0. A letra de cada tratamento indica a condição de claro/escuro no biotério e o número representa a intensidade luminosa no momento do teste.

A iluminação de 500 lux foi selecionada baseando-se na intensidade luminosa das salas do laboratório, que variou entre 400 e 600 lux. Como os testes comportamentais são conduzidos nestas salas, optou-se pelo uso da média dessa iluminação. Foram utilizadas lâmpadas fluorescentes para obter a iluminação de 500 lux e manter a fase clara no biotério.

Para a condição de escuro (0 lux), tanto no biotério quanto na sala do teste, as luzes foram apagadas e foram usados panos e plásticos pretos para cerrar as

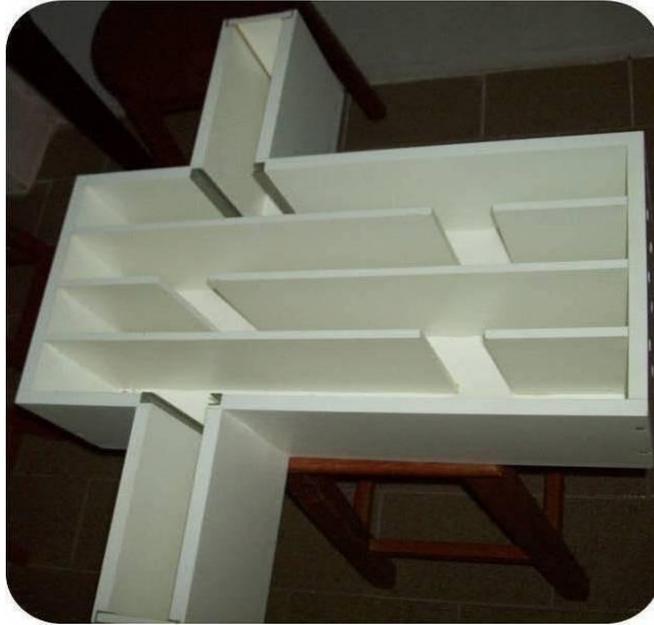
entradas de luz em frestas e janelas. Todas as medidas de iluminação foram registradas com luxímetro digital (Minipa MLM-1010).

Nos testes realizados a 0 lux, uma lâmpada vermelha foi utilizada para as observações. Embora, tenha ocorrido variação de 1 lux na intensidade luminosa, a luz vermelha não é visível à camundongos, pois estes possuem visão dicromática, ou seja, não possuem células da retina (cones) responsáveis pela percepção da cor vermelha (CONWAY, 2007; JACOBS et al., 2007). Por isso, este tipo de lâmpada é utilizada para se fazer observações do comportamento desses animais no escuro sem que ocorram interferências (POTHUIZEN et al., 2010).

Os animais de cada tratamento foram testados no labirinto Lashley III, para análise da aprendizagem. Em seguida, houve pausa de dois dias, na qual os camundongos ficaram mantidos no biotério sob o ciclo claro/escuro de cada tratamento. Posteriormente, os animais foram submetidos ao Teste de Reconhecimento de Objetos, para avaliação da memória de trabalho. Os testes comportamentais foram gravados utilizando uma filmadora digital e realizados sempre no mesmo horário, entre as 19:00 e 00:00 h, uma vez que camundongos possuem período de atividade noturno.

3.2.1 Teste no labirinto Lashley III

O labirinto Lashley III utilizado neste trabalho é uma versão do labirinto de Karl Lashley, em escala para camundongos (MATZEL et al., 2003). O labirinto, confeccionado em fibra de média densidade (MDF), é constituído por quatro corredores, interpostos entre dois compartimentos, um de início e outro de chegada. Cada corredor apresenta dimensões de 58 x 6 x 16 cm e possuem uma porta com 6 cm de largura (Fotografia 1).



Fotografia 1 - Labirinto Lashley III.

O teste de aprendizagem consistiu em submeter cada camundongo a um ensaio por dia no labirinto, durante cinco dias consecutivos, sempre no mesmo horário. Para os tratamentos C500, L500 e E500 o teste ocorreu sob iluminação de 500 lux e para C0, L0 e E0 o teste ocorreu a 0 lux.

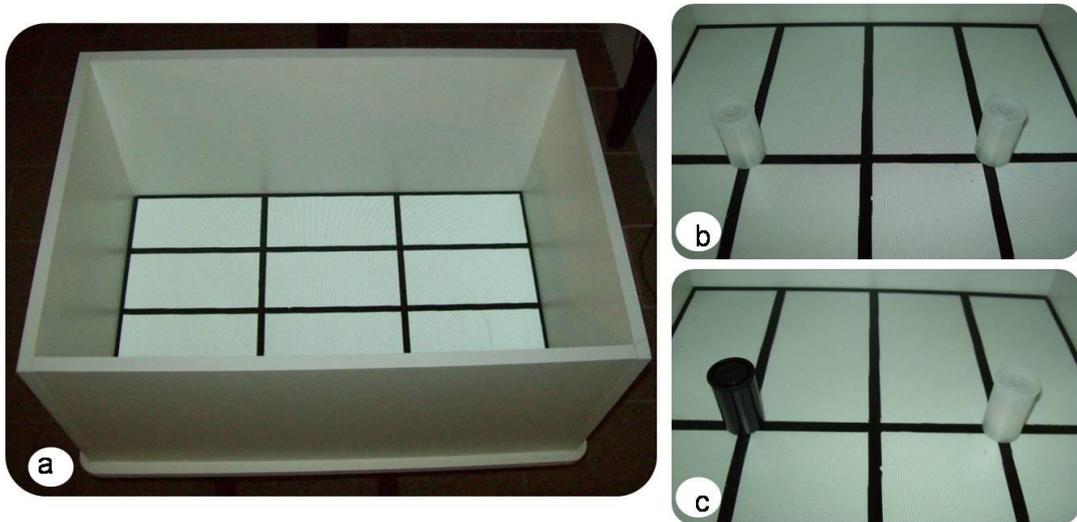
Durante os ensaios, cada animal foi colocado no compartimento de início do labirinto, sempre com a cabeça de frente para a porta. Em seguida, o animal pôde percorrer livremente o aparato até atingir o compartimento de chegada. O tempo de percurso foi registrado com um cronômetro digital, sendo arbitrado um limite máximo de cinco minutos. Se após este tempo o camundongo não alcançou o compartimento de chegada, o animal foi guiado, manualmente, até este compartimento.

Após cada ensaio, os camundongos foram removidos do labirinto, recolocados em suas gaiolas e retornados ao ciclo claro/escuro no biotério. Nesse momento, o labirinto foi limpo com álcool isopropílico 70%, a fim de eliminar odores deixados pelos animais, que poderiam influenciar no comportamento.

A aprendizagem dos animais foi avaliada pelo número de erros cometidos em cada ensaio. Os erros foram considerados quando o camundongo virou para o lado oposto ao percurso até o compartimento de chegada ou não entrou pela porta, ambos resultando em um “beco sem saída”, e só foram contados quando o animal estava indo em direção ao compartimento de chegada (LASHLEY, 1963).

3.2.2 Teste de Reconhecimento de Objetos (TRO)

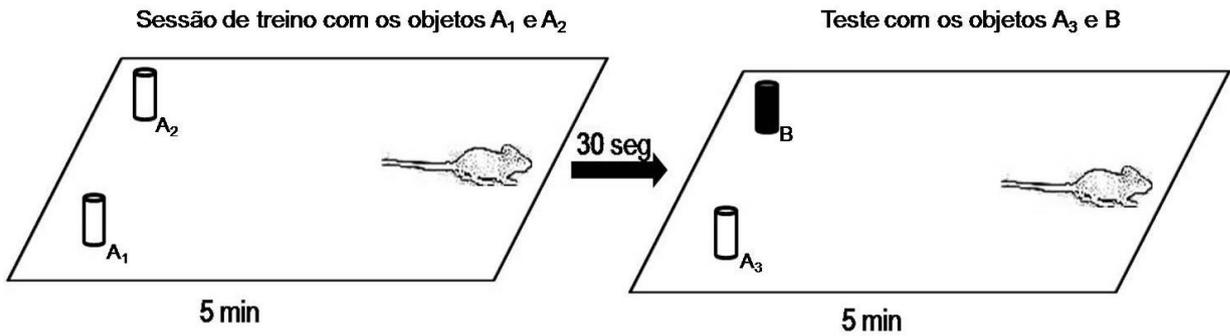
Para a realização do TRO foi utilizado o protocolo proposto por Bevins e Besheer (2006). O teste foi realizado em uma arena de MDF, com base retangular de 60 x 40 cm, piso coberto com vidro antiderrapante, cercada por paredes com 30 cm de altura. Os objetos utilizados foram quatro cilindros de plástico com medidas de 3 cm de diâmetro e 5 cm de altura, sendo três brancos idênticos ($A_1 = A_2 = A_3$) e um preto (B) (Fotografia 2).



Fotografia 2 - (a) Arena. (b) Cilindros brancos. (c) Cilindros branco e preto.

Os animais foram colocados na arena durante um período de cinco minutos para habituação ao ambiente. Após 24 horas, foi realizada a sessão de treino do TRO, onde cada camundongo foi colocado na arena com a cabeça de frente para a parede, na presença dos cilindros brancos A_1 e A_2 para familiarizar-se com eles durante cinco minutos. Em seguida, o animal foi retirado da arena e mantido em uma gaiola por 30 segundos, na sala de teste, para retenção das informações a respeito dos objetos pela memória de trabalho (IZQUIERDO, 2002).

Posteriormente, ocorreu a fase de teste, na qual o animal foi retornado à arena, novamente com a cabeça de frente para a parede, no entanto, com os cilindros branco A_3 (igual aos cilindros A_1 e A_2 , já explorados na sessão de treino) e preto B (novo) durante cinco minutos, para avaliação da memória de trabalho, como ilustrado no Esquema 5.



Esquema 5 - Teste de Reconhecimento de Objetos com os objetos brancos A₁, A₂ e A₃, e o objeto preto B.

O tempo que o animal explorou os objetos A₃ (T_A) e B (T_B) foi registrado com cronômetro digital e calculado o índice de discriminação, dado por $T_B/(T_A+T_B)$ (BEVINS; BESHEER, 2006). O reconhecimento foi distinguido pelo animal passar mais tempo explorando o objeto novo (B), indicado pelo valor do índice de discriminação maior que 0,5. O comportamento de explorar foi considerado quando o animal cheirou ou tocou o objeto com o focinho ou com as patas.

Da forma como foi feita para o teste no labirinto Lashley III, todos os procedimentos descritos, a habituação e o TRO, foram realizados sob iluminação de 500 lux para os tratamentos C500, L500 e E500, e sob 0 lux para os tratamentos C0, L0 e E0. Após a habituação e o TRO os animais foram retornados ao ciclo claro/escuro no biotério.

O objeto A₃ foi utilizado para evitar que o animal utilize pistas olfatórias para o reconhecimento. Entre os testes, a arena e os objetos foram limpos com álcool isopropílico 70%.

3.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para avaliar o aprendizado do percurso no labirinto Lashley III ao longo de cinco dias, o número de erros por dia foi submetido à análise de variância com dados repetidos (r-ANOVA) para cada um dos seis tratamentos. Adicionalmente, foi feito teste t pareado, para verificar se o número de erros diminuiu significativamente entre o primeiro dia, sem nenhum ensaio no aparato, e o quinto dia de teste, com quatro ensaios anteriores.

Na análise do efeito de diferentes condições de claro/escuro no biotério, o número de erros do quinto dia foi submetido à análise de variância (ANOVA) entre os tratamentos C500, L500 e E500 e, em seguida, entre os tratamentos C0, L0, e E0. Para o efeito da intensidade luminosa durante o teste no labirinto fez-se teste t entre os tratamentos C500 e C0. Em todas as análises o nível de significância adotado foi de 5%.

Para avaliar a memória de trabalho, os valores do índice de discriminação foram submetidos à análise descritiva, para verificar se esse índice foi maior que 0,5, ou seja, se o animal recordou do objeto (BEVINS; BESHEER, 2006).

Todas as análises foram feitas com o software PSPP[®] em plataforma Linux[®].

4 RESULTADOS

4.1 LABIRINTO LASHLEY III

Houve redução significativa dos erros ao longo dos cinco dias de teste para os tratamentos C500, C0, L500, L0 e E500, porém, para o tratamento E0 esta redução ao longo do teste não foi estatisticamente significativa. Adicionalmente, o número médio de erros cometidos por todos os tratamentos no quinto dia foi significativamente menor comparado ao primeiro dia de ensaio, indicando que houve aprendizagem (Tabela 1, Gráfico 1).

Tabela 1 - Resultados da análise de variância com dados repetidos (r-ANOVA) e teste t pareado realizados para os tratamentos C500, C0, L500, L0, E500 e E0 no labirinto Lashley III. * $p < 0,05$. n = número de indivíduos.

Tratamentos	Labirinto Lashley III	
	Análises estatísticas	
	r-ANOVA	Teste t pareado
C500 (n=8)	$F_{(4,28)}=5,50; p=0,002^*$	$t_{(7)}=3,86; p=0,006^*$
C0 (n=9)	$F_{(4,32)}=3,46; p=0,019^*$	$t_{(8)}=3,01; p=0,017^*$
L500 (n=10)	$F_{(4,36)}=5,27; p=0,002^*$	$t_{(9)}=2,99; p=0,015^*$
L0 (n=10)	$F_{(4,36)}=5,85; p=0,01^*$	$t_{(9)}=3,81; p=0,004^*$
E500 (n=10)	$F_{(4,36)}=6,77; p<0,001^*$	$t_{(9)}=4,53; p=0,001^*$
E0 (n=10)	$F_{(4,36)}=1,87; p=0,137$	$t_{(9)}=3,76; p=0,004^*$

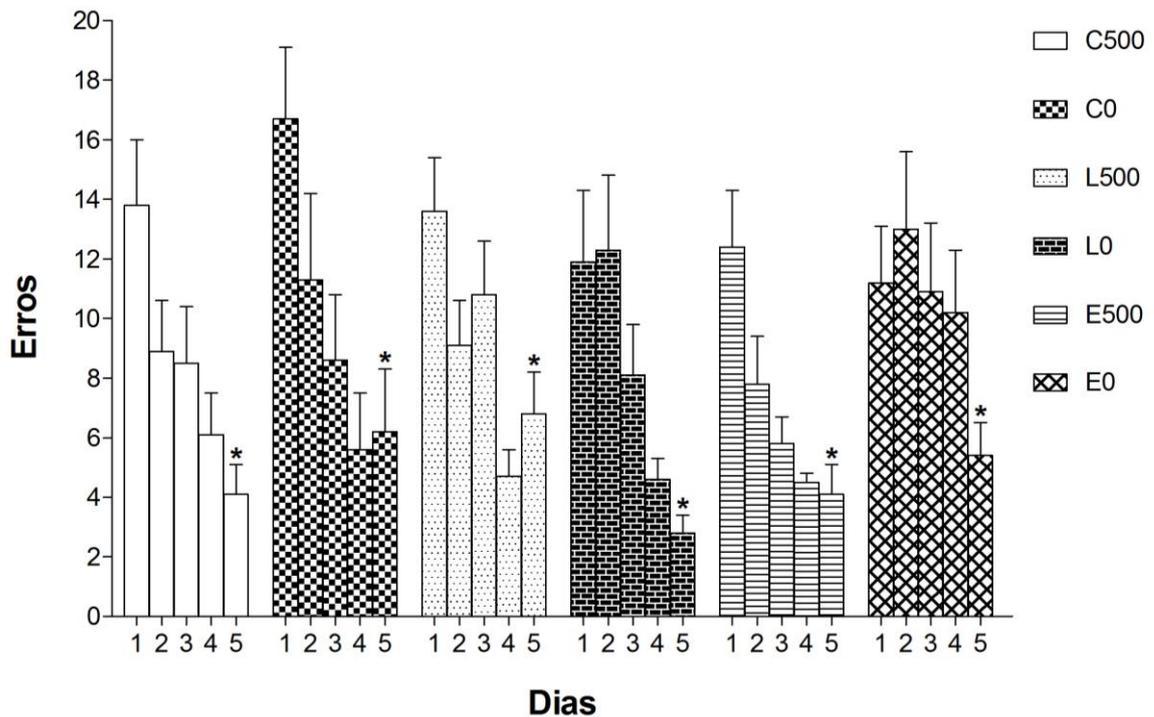


Gráfico 1 - Média e erro padrão do número de erros cometidos pelos animais dos tratamentos C500, C0, L500, L0, E500 e E0, submetidos ao labirinto Lashley III, durante cinco dias. * $p < 0,05$ entre o dia 5 e o dia 1.

Com relação ao efeito de diferentes condições de claro/escuro no biotério, não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos C500, L500 e E500 ($F_{(2,25)}=1,87$; $p=0,176$) (Gráfico 2) e nem entre os tratamentos C0, L0 e E0 ($F_{(2,26)}=1,80$; $p=0,185$) (Gráfico 3).

Do mesmo modo, não houve diferença significativa entre os tratamentos C500 e C0 ($t_{(15)}=-0,89$; $p=0,39$) na avaliação da intensidade luminosa durante o teste.

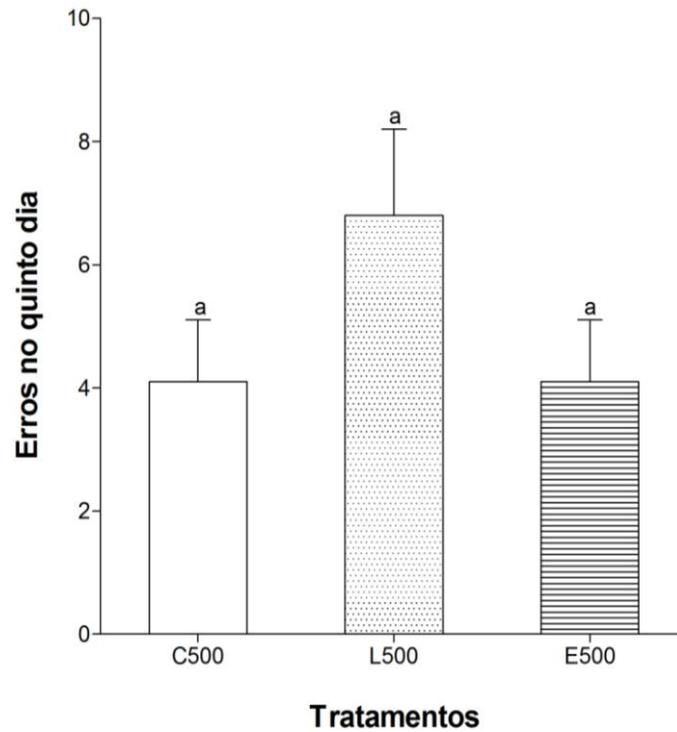


Gráfico 2 - Média e erro padrão do número de erros cometidos no quinto dia pelos animais dos tratamentos C500, L500 e E500 no labirinto Lashley III. A letra (a) indica que não houve diferença significativa entre os tratamentos.

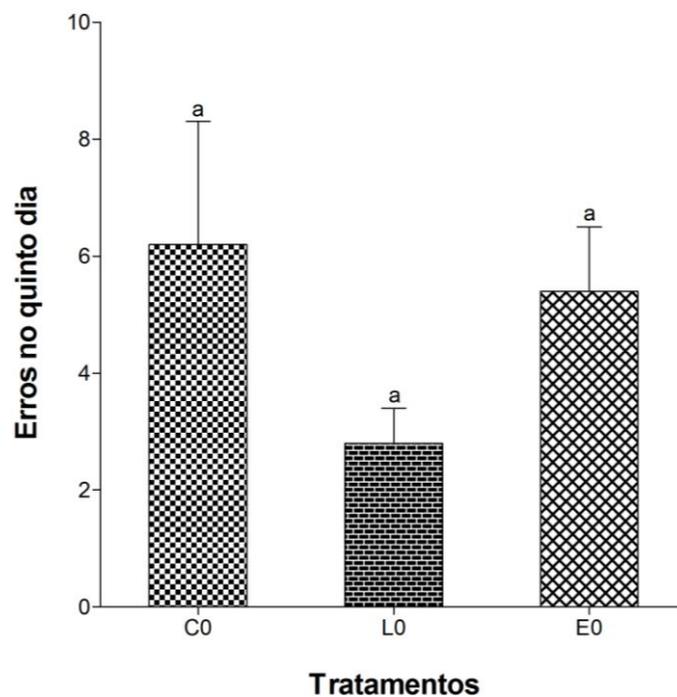


Gráfico 3 - Média e erro padrão do número de erros cometidos no quinto dia pelos animais dos tratamentos C0, L0 e E0 no labirinto Lashley III. A letra (a) indica que não houve diferença significativa entre os tratamentos.

4.2 TESTE DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS

Somente o tratamento E0 não obteve índice de discriminação acima de 0,5, evidenciando que os animais deste tratamento não reconheceram o objeto antigo. O contrário pôde-se observar para os demais tratamentos que obtiveram índice de discriminação maior que 0,5 (Tabela 2).

Tabela 2 - Média e erro padrão dos índices de discriminação dos tratamentos C500, C0, L500, L0, E500, E0 no Teste de Reconhecimento de Objetos. n = número de indivíduos.

Tratamentos	Teste de Reconhecimento de Objetos	
	Análise descritiva	
	Média ± erro padrão	
C500 (n=8)	0,67 ± 0,04	
C0 (n=9)	0,57 ± 0,05	
L500 (n=10)	0,60 ± 0,04	
L0 (n=10)	0,64 ± 0,04	
E500 (n=10)	0,57 ± 0,04	
E0 (n=10)	0,50 ± 0,04	

5 DISCUSSÃO

Os animais de todos os tratamentos foram aprendendo o percurso do labirinto Lashley III, porém, a aprendizagem dos animais do tratamento E0, mantidos em escuro constante no biotério e testados a 0 lux, foi mais lenta em relação aos demais. Isso foi demonstrado pelo número elevado de erros cometidos até o quarto dia de teste e somente no quinto, e último, dia que houve redução significativa desses erros.

Não houve diferença significativa entre as condições de claro/escuro no biotério e entre o teste realizado sob iluminação de 500 e 0 lux, quando os tratamentos foram comparados. Isto indica que o déficit observado na aprendizagem é, exclusivamente, devido aos animais permanecerem em escuro contínuo durante toda a experimentação, ou seja, a combinação de escuro constante no biotério e o teste realizado no escuro (0 lux).

Com relação à memória de trabalho, somente os animais do tratamento E0, tiveram a memória de trabalho prejudicada. Quando estes camundongos foram colocados na presença do objeto antigo e do novo, exploraram ambos igualmente (média do índice de discriminação = 0,50), indicando que não conseguiram reconhecer o objeto antigo.

Como ocorreu para a aprendizagem, o escuro contínuo durante toda a experimentação foi o que prejudicou a memória de trabalho, uma vez que não houve diferença entre as condições de claro/escuro no biotério, pois os animais dos tratamentos C500, L500 e E500 reconheceram o objeto. Ao mesmo tempo, não houve diferença entre a intensidade luminosa durante o teste, visto que os animais dos tratamentos C500 e C0 também reconheceram o objeto.

As alterações na condição claro/escuro feitas neste estudo não mostraram efeitos nas funções cognitivas quando analisadas isoladamente. Como em condição constante de iluminação os ritmos circadianos continuam ocorrendo (MARQUES; MENNA-BARRETO, 1997), pode ser que este método não tenha registrado variações significativas do desempenho dos animais nos testes de aprendizado e memória, porque foram realizados sempre no mesmo horário, para todos os tratamentos. Como demonstrado por Duque Neto e outros (2008), ratos Wistar mantidos em ciclo normal de 12:12 h claro/escuro, ciclo alterado de 11:11 h

claro/escuro e em escuro constante não apresentaram diferenças de desempenho no TRO. Ao contrário do que foi verificado por Chaudhury e Colwell (2002), que realizaram testes na fase clara (chamada de dia subjetivo) e na fase escura (noite subjetiva), verificando que camundongos C3H e C-57/6J aprendem melhor na fase clara.

Da mesma forma, avaliada isoladamente, a intensidade luminosa durante os testes comportamentais não mostrou efeito significativo, como verificado por Bert e outros (2002) na memória e aprendizagem de ratos Fischer 344 e Wistar submetidos ao labirinto aquático de Morris sob diferentes iluminações. Isso pode ter ocorrido, provavelmente, devido a curta duração da exposição dos animais a esta condição, sendo que no teste no labirinto Lashley III os animais ficaram expostos durante o máximo de cinco minutos e no TRO a exposição foi de 10 minutos e 30 segundos à intensidade luminosa de 500 e 0 lux.

Somente os animais do tratamento E0 tiveram a aprendizagem e memória de trabalho prejudicada. A combinação do escuro constante no biotério e os testes realizados à 0 lux, ou seja, escuro contínuo durante toda a experimentação, foi o que prejudicou as funções cognitivas. Sob esta condição, os animais possivelmente, possuem concentrações de melatonina maiores em relação aos outros, como verificado por Talaei, Sheibani e Salami (2010) em ratos Wistar.

Este hormônio inibe a potenciação de longa duração (LTP) no hipocampo (CAO et al., 2009; COLLINS; DAVIES, 1997; TALAEI; SHEIBANI; SALAMI, 2010; WANG et al., 2005) e no córtex (SOTO-MOYANO et al., 2006) de roedores. Dessa forma, é plausível sugerir que este hormônio pode ter prejudicado a aprendizagem dos animais por meio da inibição da LTP, uma vez que o labirinto Lashley III, além de ser um teste essencialmente de aprendizagem, requer algum tipo de memória de longa duração, a fim de otimizar o desempenho dos animais (ARENDASH et al., 1995) e esse tipo de memória envolve a LTP (MARTIN; GRIMWOOD; MORRIS, 2000).

Outra ação da melatonina é que ela causa o aumento da concentração do ácido γ -amino butírico (GABA) do hipotálamo, cerebelo e córtex de ratos (ROSENSTEIN; CARDINALI, 1986). O GABA é o principal neurotransmissor inibitório do cérebro, que inibe todos os processos envolvidos na formação ou evocação dos diversos tipos de memória por uma ação sináptica direta sobre os receptores denominados GABA_A (IZQUIERDO, 2002). Este conjunto de sistema

inibidor GABAérgico está presente no hipocampo, córtex pré-frontal e em outras regiões do cérebro (IZQUIERDO, 2002).

Assim sendo, é possível que tenha ocorrido aumento da concentração de GABA no córtex pré-frontal dos camundongos do tratamento E0, mediado pelo hormônio melatonina. Com isso, provavelmente, houve inibição da atividade elétrica dos neurônios dessa região prejudicando a memória de trabalho desses animais, o que explicaria o déficit no reconhecimento do objeto.

O neurotransmissor serotonina também poderia ter agido nas funções cognitivas. Como os animais mantidos em escuro contínuo, provavelmente, possuem concentrações maiores de melatonina, logo, possuem níveis menores de serotonina, visto que na glândula pineal ela é convertida em melatonina durante o escuro (ARENDR, 1998; MARKUS; BARBOSA JÚNIOR; FERREIRA, 2003). O contrário pode ser considerado para os demais tratamentos, na qual, possivelmente, possuem níveis maiores de serotonina.

A serotonina tem um papel importante na modulação de diferentes funções fisiológicas e em comportamentos, como locomoção, aprendizagem, memória, alimentação e agressão (BUHOT; MARTIN; SEGU, 2000; GASPAR; CASES; MAROTEAUX, 2003). A redução da serotonina prejudica a memória de trabalho (BASS JUNIOR; MEANS; MC MILLEN, 1992; PORTER; LUNN; O' BRIEN, 2003) e a administração de certos tipos de receptores de serotonina evitou perda de memória e facilitou a aprendizagem em situações de alta demanda cognitiva (BUHOT; MARTIN; SEGU, 2000). Sendo assim, os déficits observados na aprendizagem e memória de trabalho dos animais do tratamento E0 poderiam ser também devido à baixa concentração de serotonina nestes animais. O contrário, possivelmente, ocorreu para os animais dos demais tratamentos, com maiores concentrações de serotonina ajudando nos processos cognitivos.

Outro fator que poderia causar déficits das funções cognitivas seria o aumento do hormônio corticosterona causado por estresse, pois ele afeta negativamente os processos de aprendizagem e memória (HE et al., 2008). No entanto, o escuro constante altera a ritmicidade desse hormônio, mas sua amplitude permanece normal (FISCHMAN et al., 1988). Dessa forma, os prejuízos observados nas funções cognitivas dos animais mantidos em escuro contínuo, provavelmente, não deve ser por influência da corticosterona.

Pode-se concluir que escuro contínuo prejudica a aprendizagem e a memória de trabalho de camundongos Swiss, porém os mecanismos moleculares que causaram tal efeito são incertos. Dessa forma, é necessário que sejam feitos estudos mais aprofundados, com dosagem de substâncias, análise histoquímica, marcadores moleculares, atividade no hipocampo e no córtex pré-frontal em diferentes condições de iluminação.

Os efeitos no organismo causados pela iluminação devem ser sempre considerados em trabalhos envolvendo animais de laboratório e até animais de produção, como, por exemplo, aves, peixes e alguns mamíferos. Neste último, para se obter uma maior produtividade são utilizados vários regimes de iluminação, que devem se adequar a um programa que não comprometa as funções biológicas do indivíduo e que não afete o seu bem-estar.

Em humanos, alterações dos ritmos circadianos, como o *jet lag*, têm sido tratados com o hormônio melatonina (PAUL et al., 2010, 2011). O *jet lag* é causado pela brusca mudança de fusos horários durante o voo, com isso, o relógio circadiano do corpo é incapaz de se adaptar a uma mudança tão rápida (PAUL et al., 2011) e a melatonina pode ajustar os ritmos circadianos com avanço ou atraso de fase (LEWY et al., 1998; REVELL; EASTMAN, 2005). No entanto, como já mencionado, a melatonina afeta os circuitos neuronais envolvidos na aprendizagem e memória. Logo, ressalta-se a importância dos estudos envolvendo este hormônio e seus efeitos no organismo.

REFERÊNCIAS

ARENDASH, Gary W. et al. Improved learning and memory in aged rats with chronic administration of the nicotinic receptor agonist GTS-21. **Brain Research**, v. 674, p. 252–259, 1995.

ARENDDT, Josephine. Melatonin and the pineal gland: influence on mammalian seasonal and circadian physiology. **Reviews of Reproduction**, v. 3, p. 13–22, 1998.

ARENDDT, Josephine; SKENE, Debra Jean. Melatonin as a chronobiotic. **Sleep Medicine Reviews**, v. 9, p. 25–39, feb. 2005.

BARNES, Carol A. et al. Circadian rhythm of synaptic excitability in rat and monkey central nervous system. **Science**, v. 197, n. 4298, p. 91–92, 1977.

BASS JUNIOR, E. Woodley; MEANS, Larry W.; MC MILLEN, Brian A. Buspirone impairs performance of a three-choice working memory water escape task in rats. **Brain Research Bulletin**, v. 28, p. 455–461, 1992.

BERLYNE, D. E. Novelty and curiosity as determinants of exploratory behavior. **British Journal of Psychology**, v. 41, p. 68–80, 1950.

BERT, Bettina et al. Fischer 344 and Wistar rats differ in anxiety and habituation but not in water maze performance. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 78, p. 11–22, 2002.

BEVINS, Rick A.; BESHEER Joyce. Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study 'recognition memory'. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1306–1311, 2006.

BOEHM, Gary W. et al. Learning in year-old female autoimmune BXSB mice. **Physiology & Behavior**, v. 64, n. 1, p. 75–82, 1998.

BRIDGES, Robert S. et al. Prior parity reduces post-coital diurnal and nocturnal prolactin surges in rats. **Life Sciences**, v. 53, n. 5, p. 439–445, 1993.

BUHOT, Marie-Christine; MARTIN, Stéphanie; SEGU, Louis. Role of serotonin in memory impairment. **Annals of Medicine**, v. 32, n. 3, p. 210–221, 2000.

CAO, Xiu-Jing et al. Effects of chronic administration of melatonin on spatial learning ability and long-term potentiation in lead-exposed and control rats. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 22, p. 70–75, 2009.

CARDINALI, Daniel P. Melatonin: A mammalian pineal hormone. **Endocrine Reviews**, v. 2, p. 327–346, 1981.

CHAUDHURY, Dipesh; COLWELL, Christopher S. Circadian modulation of learning and memory in fear-conditioned Mice. **Behavioural Brain Research**, v. 133, p. 95–108, 2002.

CIPOLLA-NETO, José; AFECHE, Solange Castro. Glândula Pineal. In: AIRES, Margarida de Mello (Org.). **Fisiologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 980-989, il.

CLAUSTRAT, Bruno; BRUN, Jocelyne; CHAZOT, Guy. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. **Sleep Medicine Review**, v. 9, p. 11–24, 2005.

CLOSE, B. et al. Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 2. **Laboratory Animals**, v. 31, n. 1, p. 1–32, 1997.

COLLINS, Dawn R.; DAVIES, Stephen N. Melatonin blocks the induction of long-term potentiation in an N-methyl-D-aspartate independent manner. **Brain Research**, v. 767, p. 162–165, 1997.

CONWAY, Bevil R. Color vision: mice see hue too. **Current Biology**, v. 17, n. 12, p. R457–R460, jun. 2007.

DEVAN, Bryan D. et al. Circadian phase-shifted rats show normal acquisition but impaired long-term retention of place information in the water task. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 75, n. 1, p. 51–62, 2001.

DUQUE NETO, Sebastião Pacheco et al. Dissociation of the circadian rhythm of locomotor activity in a 22 h light–dark cycle impairs passive avoidance but not object recognition memory in rats. **Physiology & Behavior**, v. 94, p. 523–527, 2008.

FISCHMAN, Alan J. et al. Constant light and dark affect the circadian rhythm of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Neuroendocrinology**, v. 47, n. 4, p. 309–316, 1988.

FREITAS, Henrique Jorge de et al. Efeito de diferentes programas de iluminação para poedeiras semi-pesadas criadas em galpões abertos. **Biotemas**, v. 23, n. 2, p. 157–162, 2010.

GASPAR, Patrícia; CASES, Oliver; MAROTEAUX, Luc. The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 4, p. 1002–1012, 2003.

GERSTNER, Jason R; YIN, Jerry C. P. Circadian rhythms and memory formation. **Neuroscience**, v. 11, p. 577–588, 2010.

HE, Wen-Bin et al. Effects of glucocorticoids on age-related impairments of hippocampal structure and function in mice. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 28, p. 277–291, 2008.

HUGHES, Robert N. Neotic preferences in laboratory rodents: Issues, assessment and substrates. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 31, p. 441–464, 2007.

IZQUIERDO, Iván. **Memória**. Porto Alegre: Artmed, 2002.

JACOBS, Gerald H. et al. Photopigment engineered to express a human cone emergence of novel color vision in mice. **Science**, v. 315, p. 1723–1725, 2007.

KANDEL, Eric R.; SCHWARTZ, James H.; JESSEL, Thomas M. **Essentials of neural science and behaviour**. Nova Jersey: Appleton & Lange, 1995.

LASHLEY, Karl S. **Brain mechanisms and intelligence**: A quantitative study of injuries to the brain. New York: Dover Publications, 1963.

LEWY, Alfred J. et al. The human phase response curve (PRC) to melatonin is about 12 hours out of phase with the PRC to light. **Chronobiology International**, v. 15, p. 71–83, 1998.

LOUDON, Andrew S.; SEMIKHODSKII, Andrei G.; CROSTHWAITE, Susan K. A brief history of circadian time. **Trends in Genetics**, v. 16, n. 11, p. 477–481, 2000.

MAGANHIN, Carla C. et al. Efeitos da melatonina no sistema genital feminino: breve revisão. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 54, n. 3, p. 267–271, 2008. 268p., il.

MANDA, Kailash et al. Melatonin attenuates radiation-induced learning déficit and brain oxidative stress in mice. **Acta Neurobiologiae Experimentalis**, v. 67, p. 63–70, 2007.

MARKUS, Regina Pekelmann; BARBOSA JUNIOR, Eduardo José Mortani; FERREIRA, Zulma Silva. Ritmos biológicos: entendendo as horas, os dias e as estações do ano. **Einstein**, v.1, p. 143–148, 2003.

MARQUES, Nelson; MENNA-BARRETO, Luiz (Orgs). **Cronobiologia**: Princípios e Aplicações. 1. ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1997.

MARTIN, Stephen J.; GRIMWOOD, Paul D.; MORRIS, Richard G. M. Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. **Annual Reviews Neuroscience**, v. 23, p. 649–711, 2000.

MARTINEZ, Raquel; GARCIA, Andrea Milena Becerra; MORATO, Silvio. Papel da luminosidade do biotério no comportamento do rato no labirinto em cruz elevado. **Estudos de Psicologia**, v. 10, n. 2, p. 239–245, 2005.

MATZEL, Louis D. et al. Individual differences in the expression of a “general” learning ability in mice. **The Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 16, p. 6423–6433, 2003.

MOORE, Robert Y. Organization and function of a central nervous system circadian oscillator: The suprachiasmatic hypothalamic nucleus. **Fed Proc**, v. 42, n. 11, p. 2783–2789, 1983.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Guide for the care and use of laboratory animals**. Washington: National Academy Press, 1996.

PAIVA, Fabienne Petitinga de; MAFFILI, Vitor Valério; SANTOS, Ana Carla Sampaio (Orgs.). **Curso de manipulação de animais de laboratório**. Salvador: FIOCRUZ, 2005.

PAUL, Michael A. et al. Melatonin treatment for eastward and westward travel preparation. **Psychopharmacology**, v. 208, p. 377–387, 2010.

PAUL, Michel A. et al. Phase advance with separate and combined melatonin and light treatment. **Psychopharmacology**, v. 214, p. 515–523, 2011.

POLITI, Flavio Augusto Sanches; PIETRO, Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues; SALGADO, Hérica Regina Nunes. Caracterização de biotérios, legislação e padrões de biossegurança. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n.1, p. 17–28, 2008.

PORTER, R. J.; LUNN, B. S.; O' BRIEN, J. T. Effects of acute tryptophan depletion on cognitive function in Alzheimer's disease and in the healthy elderly. **Psychological Medicine**, v. 33, p. 41–49, 2003.

POTHUIZEN, Helen H. J. et al. Effects of selective granular retrosplenial cortex lesions on spatial working memory in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 208, p. 566–575, 2010.

REVELL, V. L.; EASTMAN, C. I. How to trick mother nature into letting you fly around or stay up all night. **Journal of Biological Rhythms**, v. 20, p. 353–365, 2005.

ROSEN, G. D. et al. Behavioral consequences of neonatal injury of the neocortex. **Brain Research**, v. 681, p. 177–189, 1995.

ROSENSTEIN, Ruth E.; CARDINALI, Daniel P. Melatonin increases in vivo GABA accumulation in rat hypothalamus, cerebellum, cerebral cortex and pineal gland. **Brain Research**, v. 398, n. 2, p. 403–6, 1986.

SILVA, Marcelo Carlos da. Funções cognitivas segundo Feuerstein. **Psicologia.com.pt - O Portal dos Psicólogos**. 2006. Disponível em: <<http://www.psicologia.com.pt/artigos/textos/A0275.pdf>>. Acesso em: 5 abr. 2011.

SOTO-MOYANO, Rubén et al. Melatonin administration impairs visuo-spatial performance and inhibits neocortical long-term potentiation in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 85, p. 408–414, 2006.

TALAEI, Sayyed Alireza; SHEIBANI, Vahid; SALAMI, Mahmoud. Light deprivation improves melatonin related suppression of hippocampal plasticity. **Hippocampus**, v. 20, p. 447–455, 2010.

TAMURA, Eduardo Koji. **Efeito da melatonina sobre a produção de óxido nítrico em células endoteliais em cultura**. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências - área de Fisiologia)–Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

TAN, Dun-Xian et al. Melatonin: A potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. **Endocrinology Journal**, v. 1, p. 57–60, 1993.

WANG, Louisa M. et al. Melatonin inhibits hippocampal long-term potentiation. **European Journal of Neuroscience**, v. 22, p. 2231–2237, 2005.

YOUNG, Michael W. Life's 24-hour clock: molecular control of circadian rhythms in animal cells. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 25, p. 601–606, 2000.

ZEITZER, Jamie. M. et al. Absence of detectable melatonin and preservation of cortisol and thyrotropin rhythms in tetraplegia. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 85, p. 2189–2196, 2000.

ZHDANOVA, Irina V. Melatonin as a hypnotic: pro. **Sleep Medicine Reviews Sleep Medicine Reviews**, v. 9, n. 1, p. 51–65, feb. 2005.

ZUCKER, Irving; BOSHES, Michael; DARK John. Suprachiasmatic nuclei influence circannual and circadian rhythms of ground squirrels. **American Journal of Physiology**, v. 244, p. 472–480, 1983.

ANEXO 1

Documento comprobatório de aprovação do protocolo nº 043/2009 pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da Pró-Reitoria de Pesquisa/UFJF.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PRO-REITORIA DE PESQUISA
Comissão de Ética na Experimentação Animal

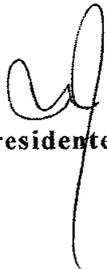
CERTIFICADO –

Certificamos que o Protocolo nº 043/2009 – CEEA sobre “Avaliação de funções cognitivas em camundongos suíços”, projeto de pesquisa sob a responsabilidade de Carlos Alberto Mourão Junior, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO de ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 02/03/2010.

C E R T I F I C A T E

We certify that the protocol nº 043/2009 - CEEA about “Avaliação de funções cognitivas em camundongos suíços” – Carlos Alberto Mourão Junior - is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH (CEEA) in 02/03/2010.

Juiz de Fora, 02 de Março de 2010



Presidente/CEEA

Secretário/CEEA