

DANILO MASSAKI OSHIMA

**EFEITO DA ALTERAÇÃO DO CICLO LUMINOSO SOBRE A
MEMÓRIA EMOCIONAL NAS TAREFAS DE CONDICIONAMENTO
AO SOM E AO CONTEXTO**

Tese apresentada à Universidade Federal
de São Paulo - Escola Paulista de
Medicina, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências.

São Paulo
2006

Oshima, Danilo Massaki

EFEITO DA ALTERAÇÃO DO CICLO LUMINOSO SOBRE A MEMÓRIA EMOCIONAL NAS TAREFAS DE CONDICIONAMENTO AO SOM E AO CONTEXTO./Danilo Massaki Oshima -- São Paulo, 2006

x, 62f

Tese de Mestrado – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós Graduação em Psicobiologia.

Título em inglês: Disrupting circadian rhythms in rats induces retrograde amnesia for contextual fear conditioning, but not for tone fear conditioning.

1. Memória. 2. Ritmos Circadianos. 3. Hipocampo. 4. Alteração de Fase. 5. Condicionamento de Medo

DANILO MASSAKI OSHIMA

**EFEITO DA ALTERAÇÃO DO CICLO LUMINOSO SOBRE A
MEMÓRIA EMOCIONAL NAS TAREFAS DE CONDICIONAMENTO
AO SOM E AO CONTEXTO**

Tese apresentada à Universidade Federal
de São Paulo - Escola Paulista de
Medicina, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Gabriela Menezes de Oliveira

São Paulo
2006

Esta tese foi realizada no Departamento de Psicobiologia da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Associação Fundo de Incentivo à Psicofarmacologia (AFIP) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), com bolsa de Mestrado da Associação Fundo de Incentivo à Psicofarmacologia (AFIP).

*À minha família,
pelo amor, amizade e apoio em todos
os momentos da minha vida.*

*Aos meus amigos,
por iluminarem diferentes caminhos
na minha jornada.*

Estarão sempre comigo onde eu estiver!

AGRADECIMENTOS

Às pessoas da Psicobiologia e UNIFESP:

À Gabi, que além de ser uma ótima orientadora, sempre soube motivar seus alunos com suas idéias. Seu apoio e sabedoria foram fundamentais desde o início e em todos os momentos. Praticamente uma segunda mãe para todos os seus alunos.

À banca examinadora pelas correções e críticas construtivas ao meu trabalho.

À Tatiana Ferreira pela colaboração, dedicação e risadas. Uma amigona. Não é a toa que todos a adoram.

Ao FANTÁSTICO quarteto (Eduardo Schenberg, Paulinha Tiba, Sérgio Arthur e Tati Ferreira) pelas discussões científicas nos lugares mais inóspitos que poderia se imaginar e nas mais diversas condições. Pelas eternas tardes de leitura que espero que não se acabem.

Ao grupo memória (Gabi, Tati, Karin, Paulinha, Raquel, Larissa, Juliana, Nadine, Mariana, Eduardo, Sérgio, Chicão, Francisco, Alberto) por ter fornecido conhecimento, força, além das experiências e experimentos, dos congressos e simpósios, das muitas e muitas risadas.

Aos amigos do corredor dos pós-graduandos das salas 15, 16, 18, 19 e outros colegas que estão por aí, mas principalmente ao pessoal da sala 17 por ter tornado o dia a dia muito mais motivante e divertido.

Aos professores pelo conhecimento e sabedoria. Suas aulas foram muito importantes para meu aprendizado e amadurecimento.

Aos funcionários da secretaria por sempre estarem dispostos a me ajudar com as burocracias, principalmente a Nereide.

Aos funcionários da AFIP: Zé, Selma, Sebastião e João.

A todos funcionários do departamento que contribuíram direta e indiretamente para realização deste trabalho.

À professora Jeannine Aboulafia pela assessoria e conselhos motivantes que vem da época da graduação.

Aos amigos da Bio 34, com os quais aprendi e dei muitas risadas durante a graduação.

À FAPESP, CNPq e AFIP, pelo apoio financeiro.

Na vida pessoal

À minha mãe Eunice e meu pai Mitsuoki, exemplos de vida, dedicação, amor à vida, além de me darem todo suporte quando e onde precisei.

Às minhas lindas irmãs Aline e Nadia, que foram grandes exemplos durante meu desenvolvimento, por me ensinarem moral e pelo apoio sempre que precisei.

A minha amiga Arlinda, que ajudou a me criar. Um exemplo de vida pela sua simplicidade.

À família PAX, por seus eventos, atividades extracurriculares e sonhos conquistados. Ensinaram-me que o impossível é aquilo que você ainda não imaginou.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vi
RESUMO.....	x
1. INTRODUÇÃO	1
2 .OBJETIVO	8
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	9
4. RESULTADOS	21
5. DISCUSSÃO	29
6. CONCLUSÕES GERAIS.....	35
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA - análise de variância

CA - ciclo alterado

CC - condicionamento de medo ao contexto

CS - condicionamento de medo ao som

dB - decibéis

EC - estímulo condicionado

EI - estímulo incondicionado

e.p. - erro padrão

FIG - folheto intergeniculado

IEC - intervalo entre os choques

IES - intervalo entre os sons

mA - miliampere

NSQ - núcleo supraquiasmático

seg - segundo(s)

SSC - sistema de sincronização circadiano

TGH - trato genículo-hipotalâmico

TRH - trato retino-hipotalâmico

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema de sincronização do Núcleo Supraquiasmático pela luz (Figura modificada de <http://cda.morris.umn.edu/~meeklesr/scn.jpg>).

Figura 2 - Caixa de condicionamento utilizada no departamento.

Figura 3 - Câmara de teste utilizada no departamento.

Figura 4 – Escala de iluminação para os experimentos pré-treino e pós-treino para os grupos C.A. dos respectivos experimentos e controle. Para cada grupo experimental foi realizado um grupo controle (que pode ser visualizado na primeira linha do esquema).

Figura 5 – Escala de iluminação para o Experimento A. Grupo controle vs grupo C.A. e horário de treino e teste.

Figura 6 – Escala de iluminação para o Experimento B. Grupo controle vs grupo C.A. e horário de treino e teste.

Figura 7 – Escala de iluminação para o Experimento C. Grupo controle vs grupo C.A. e horário de treino e teste.

Figura 8 – Escala de iluminação para o Experimento D. Grupo controle vs grupo C.A. e horário de treino e teste.

Figura 9 – Protocolo utilizado para o condicionamento de medo ao contexto.

Figura 10 – Protocolo utilizado para o condicionamento de medo ao som.

Figura 11 - Efeito do avanço do teste e da fase clara do ciclo claro-escuro antes do treino sob a tarefa de condicionamento contextual de medo (teste realizado 2 horas após as luzes serem acesas). O gráfico mostra a média do tempo de congelamento total por minuto + e.p. no dia do teste para o grupo Controle e grupo ciclo alterado (C.A.). n=18 por grupo.

Figura 12 - Efeito do avanço do teste e da fase clara do ciclo claro-escuro antes do treino sob a tarefa de condicionamento de medo ao som (teste realizado 2 horas após as luzes serem acesas). O gráfico mostra a média do tempo de congelamento total por minuto + e.p. no dia do teste antes (pré-som) e após (pós-som) a apresentação do som. Grupo Controle e grupo ciclo alterado (C.A.), n=18 por grupo.

Figura 13 – Efeito do avanço da fase clara do ciclo claro-escuro antes do treino sob a tarefa de condicionamento contextual de medo, com teste realizado 8 horas após as luzes serem acesas. O gráfico mostra a média do tempo de congelamento total por minuto + e.p. no dia do teste para o grupo Controle e grupo ciclo alterado (C.A.). n=16 por grupo.

Figura 14 - Efeito do avanço da fase clara do ciclo claro-escuro antes do treino sob a tarefa de condicionamento de medo ao som, com teste realizado 8 horas após as luzes serem acesas. O gráfico mostra a média do tempo de congelamento total por minuto + e.p. no dia do teste antes (pré-som) e após (pós-som) a apresentação do som. Grupo Controle e grupo ciclo alterado (C.A.), n=18 por grupo.

Figura 15 - Efeito do avanço do teste e da fase clara do ciclo claro-escuro antes do teste sob a tarefa de condicionamento contextual de medo, com teste realizado 2 horas após as luzes serem acesas. O gráfico mostra a média do tempo de congelamento total por minuto + e.p. no dia do teste para o grupo Controle e grupo ciclo alterado (C.A.). * $p \leq 0,05$ teste t de Student.

Figura 16 - Efeito do avanço do teste e da fase clara do ciclo claro-escuro antes do teste sob a tarefa de condicionamento de medo ao som, com teste realizado 2 horas após as luzes serem acesas. O gráfico mostra a média do tempo de congelamento total por minuto + e.p. no dia do teste antes (pré-som) e após (pós-

som) a apresentação do som. Grupo Controle e ciclo alterado (C.A.), n=18 por grupo.

Figura 17 - Efeito do avanço da fase clara do ciclo claro-escuro antes do teste sob a tarefa de condicionamento contextual de medo, com teste realizado 8 horas após as luzes serem acesas. O gráfico mostra a média do tempo de congelamento total por minuto + e.p. no dia do teste para o grupo Controle e ciclo alterado (C.A.).
* $p \leq 0,05$ teste t de Student.

Figura 18 - Efeito do avanço da fase clara do ciclo claro-escuro antes do teste sob a tarefa de condicionamento de medo ao som, com teste realizado 8 horas após as luzes serem acesas. Média do tempo de congelamento total por minuto + e.p. no dia do teste antes (pré-som) e após (pós-som) a apresentação do som. Grupo Controle e ciclo alterado (C.A.), n=18 por grupo.

RESUMO

Alterações do ritmo claro/escuro sofrido por trabalhadores de turno, viajantes transcontinentais ("jet lag") entre outras situações comuns no dia a dia moderno podem causar diversos transtornos fisiológicos e cognitivos. A dessincronização entre os ritmos biológicos internos e os marcadores temporais externos (zeitgebers) pode gerar inúmeros problemas, entre eles o déficit de memória. Todavia, até hoje, ainda não se conhecem as características desse tipo de prejuízo com relação aos processos mnemônicos. Sabe-se que a memória é um fenômeno complexo e seu processamento envolve múltiplas vias cerebrais, sendo o hipocampo estrutura central em muitos destes processos. O objetivo do presente trabalho foi verificar os tipos de memória afetados pela alteração de ritmo circadiano, através do avanço de fase do ciclo claro/escuro em animais de laboratório. Para investigar esta hipótese, diferentes grupos de animais passaram por quatro protocolos de alteração de ritmo seguidos de tarefas para avaliar a memória em suas diferentes fases: manipulação pré-treino para verificar se a aquisição é prejudicada e manipulação pós-treino para verificar se a consolidação ou a evocação das memórias adquiridas foi prejudicada. As manipulações de fase luminosa consistiram em adiantar a fase em seis horas pré-treino; no dia do treino, sendo mantida no dia do teste; e pós-treino sendo realizada no dia do teste. Para avaliar a memória, os animais foram submetidos a 2 testes de memória emocional: o condicionamento de medo ao contexto(CC) e ao som(CS), tarefas que envolvem diferentes vias, sendo que somente o contexto requer o hipocampo. Os intervalos de tempo entre treino e teste foram de 24 e 18 horas para verificar se a mudança na escala luminosa seria um fator essencial ou se a defasagem nos horários entre treino e teste alteraria o desempenho dos animais. Como conclusão, vimos que a alteração pré-treino não teve efeito para os dois protocolos de iluminação no CC e no CS. Com isso podemos observar que a alteração pós-treino teve efeito apenas para o CC nos dois horários do teste aplicado.

1. INTRODUÇÃO

A grande maioria dos organismos vivos apresenta um ritmo biológico, seja ele fisiológico ou comportamental. Em mamíferos, esse ritmo tem duas importantes variáveis que estão intrinsecamente relacionadas. Uma é o sistema de sincronização circadiano (do latim, *circa* = a cerca de; *diano* = um dia) -SSC- próprio do organismo, cujo principal marcapasso no sistema nervoso central é o núcleo supraquiasmático, uma estrutura bilateral com cerca de 10.000 a 16.000 neurônios, localizados no hipotálamo, adjacente ao terceiro ventrículo, acima do quiasma óptico ⁽¹⁻³⁾. Esse núcleo possui uma atividade eletrofisiológica com ritmicidade circadiana (ou seja, próximo de 24 horas) ⁽²⁾. O SSC se relaciona com os *zeitgebers* (termo alemão que define as pistas ambientais). Entre os exemplos de *zeitgebers* temos o ciclo claro-escuro como principal sincronizador dos ritmos internos com o meio ambiente. Os ciclos de claro e escuro estariam sinalizando o sistema nervoso o momento de sono/vigília antecipando alguns comportamentos e alterando a fisiologia necessária para um melhor aproveitamento energético, além da manutenção do organismo ⁽⁴⁾. Em roedores, a sincronização fótica do núcleo supraquiasmático ⁽⁵⁾, ou seja, a sinalização do ciclo claro-escuro para o sistema nervoso central, se dá da seguinte maneira: a luz, ao incidir na retina, região fotossensível do olho, é transformada em sinais eletroquímicos e estes sinais são enviados ao núcleo supraquiasmático (NSQ) via trato retino-hipotalâmico (TRH), através de conexões glutamatérgicas ⁽⁶⁾ e indiretamente através do folheto intergeniculado (FIG), através do trato genículo-hipotalâmico (TGH) ⁽⁷⁾ (Figura 1).

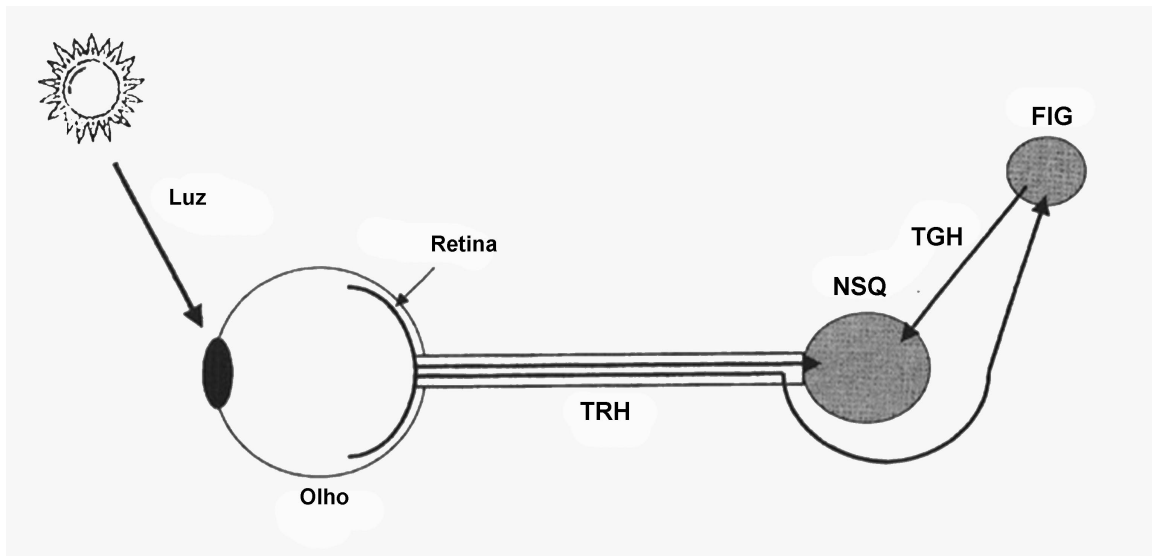


Figura 1 - Esquema de sincronização do Núcleo Supraquiasmático pela luz (Figura modificada de <http://cda.morris.umn.edu/~meeklesr/scn.jpg>).

Os estímulos gerados pela luz que chegam ao núcleo supraquiasmático induzem a expressão de *c-fos* (um gene de expressão imediata que indica atividade neuronal) ⁽⁸⁾ e alteram a atividade eletrofisiológica desta estrutura ⁽⁹⁾, indicando uma relação deste *zeitgeber* com tal estrutura anatômica.

Outros *zeitgebers* também podem sincronizar o SSC através de pistas socio-ambientais, mantendo sua ritmicidade de aproximadamente 24 horas ⁽¹⁰⁻¹³⁾.

A ritmicidade circadiana é uma característica que pode ser observada também nos processos de aprendizado e memória ⁽¹⁴⁻¹⁷⁾.

Um dos primeiros trabalhos mostrando a relação entre esses fenômenos mostrou que se uma solução de glicose for apresentada a uma colônia de abelhas

em um momento particular do dia, elas aprendem rapidamente a voltar no lugar e no momento onde foram alimentadas em antecipação da recompensa^(18,19). Este tipo de associação momento-lugar é chamado de estampa temporal (*time stamping*) e pode ser visto em diversas espécies incluído pássaros, peixes e mamíferos⁽²⁰⁻²⁴⁾.

Existem outros trabalhos que mostram a relação do SSC com o aprendizado. Esses estudos indicam que animais podem exibir o fenômeno de estampagem temporal, mostrando que os mesmos possuem picos de performance em intervalos circadianos, além de mostrarem desempenhos diferentes dependendo da fase circadiana, ou seja, o momento no qual a tarefa foi aplicada. Existem diversas tarefas utilizadas para avaliar a memória em animais que podem apresentar este perfil. Entre elas podemos destacar a esquiva passiva⁽²⁵⁾, esquiva ativa^(26, 27), condicionamento ao som e ao contexto^(15, 17), tarefas apetitivas⁽²⁸⁾, no labirinto com recompensa⁽²⁹⁾ e no labirinto aquático de Morris⁽¹⁶⁾.

Além disso, existem algumas evidências fisiológicas que podem relacionar os fenômenos de aprendizagem e memória com o SSC. Lesões realizadas no núcleo supraquiasmático eliminam a ritmicidade de 24 horas no desempenho da tarefa de esquiva passiva⁽³⁰⁾. A quebra da ritmicidade através da alteração de fase do ciclo claro-escuro interfere com o desempenho da ritmicidade circadiana nas tarefas de esquiva passiva⁽³¹⁾, esquiva ativa^(32, 33) e no labirinto aquático de Morris⁽³⁴⁾. Esse mesmo tipo de procedimento não afeta a tarefa de discriminação social⁽³⁵⁾, uma tarefa não aversiva.

Assim como em animais, em humanos, a quebra desse ritmo pela alteração de fase do ciclo claro-escuro é um dos fatores do fenômeno conhecido

como “jet lag”, que causa diversos déficits fisiológicos, como problemas gastrointestinais ⁽³⁶⁾, fadiga e distúrbios de sono ⁽³⁷⁾. Pode causar também problemas cognitivos como déficit de memória em humanos ⁽³⁸⁾ e em animais de laboratório ⁽³¹⁻³⁴⁾.

O “jet lag” é um fenômeno que ocorre quando se realizam viagens transcontinentais, onde se percorre muitos fusos, principalmente quando o sentido da viagem é de oeste para leste. Longas viagens implicam em uma grande defasagem de horário, e, portanto, uma grande alteração na escala luminosa ⁽³⁹⁾.

Alterações de ritmos, além de interferirem com a cognição, interferem também com a secreção de diversos hormônios que possuem ritmicidade circadiana como a melatonina e o cortisol ⁽⁴⁰⁾, hormônios que parecem estar relacionados com a modulação dos processos mnemônicos ⁽⁴¹⁻⁴⁵⁾.

A memória é um fenômeno complexo. Em seres humanos, pode-se classificá-la em declarativa ou de procedimento. Podemos chamar a memória declarativa de hipocampo-dependente, pois é o tipo de memória afetada após a lesão desta estrutura. Já a memória de procedimento é considerada hipocampo-independente, pois não é afetada por lesão no hipocampo ⁽⁴⁶⁻⁴⁸⁾.

Em animais, a lesão de hipocampo afeta seletivamente o desempenho de animais em algumas tarefas utilizadas para avaliar aprendizado e memória ^(46,47,49). Estas tarefas podem ser denominadas hipocampo-dependentes. Existem tarefas que não são afetadas por esta lesão ^(50, 51, 46, 49). Na tentativa de observar se a quebra do ritmo circadiano através da alteração de ciclo claro-escuro influenciaria especificamente um dos tipos de memória, Devan e colaboradores (2001) verificaram o efeito desta quebra na tarefa espacial no labirinto aquático de

Morris. Tal teste é sensível à lesão no hipocampo e a alteração no ritmo circadiano prejudicou o desempenho dos animais na tarefa. O resultado sugere que a alteração do ritmo interfere com a consolidação ou evocação de tarefas hipocampo-dependentes. Apesar de existir a possibilidade de executar no mesmo labirinto aquático uma tarefa hipocampo independente, isto não foi feito pelos autores. Ficam abertas duas questões: (1) esta alteração interfere também no desempenho dos animais em tarefas independentes do hipocampo? (2) Outras tarefas hipocampo dependentes também são afetadas pela alteração do ritmo circadiano?

Muitos são os testes comportamentais utilizados em animais de laboratório para avaliar as memórias hipocampo dependente e independente. Um exemplo é o condicionamento de medo. O condicionamento de medo é um tipo de tarefa baseada no condicionamento pavloviano, um tipo de aprendizagem associativa onde é realizada uma associação entre dois estímulos. No caso de Pavlov, que realizou seu trabalho com cães, um estímulo incondicionado -EI (no caso um alimento)- era pareado com um estímulo condicionado - EC (um sino). Após diversos pareamentos, o EC, quando apresentado por si só, adquiria respostas emocionais, no caso a salivação do animal (para uma revisão, consultar 52). No condicionamento de medo a um estímulo discreto, um EC, como uma luz ou um som, é pareado com um EI aversivo, como um choque. Devido a sua relação temporal com o EI, o EC, antes um estímulo neutro, adquire propriedades aversivas, gerando assim, respostas de medo quando apresentado por si só. Como resultado, o animal passa a desenvolver respostas autonômicas tais como taquicardia e elevação da pressão arterial, acompanhadas de respostas

comportamentais características de medo como, por exemplo, a resposta de congelamento (“freezing”) frente à apresentação do EC. Essas respostas não são observadas após a apresentação de um estímulo neutro que não tenha sido pareado previamente com o EI. Deste modo estas respostas podem ser interpretadas como aprendidas ^(53- 55). Podem-se também eliciar as respostas de medo colocando o animal no ambiente onde um estímulo aversivo tenha sido experimentado anteriormente. Tais respostas podem ser consideradas como condicionadas ao contexto no qual o animal recebeu o choque ^(53; 54; 50; 51).

A base neural do condicionamento de medo ao som e ao contexto tem sido objeto de muitos estudos. Tem-se observado que lesões no hipocampo, antes do treino ou até 24 horas após, prejudicam o condicionamento ao contexto, porém não interferem no condicionamento ao som ^(50; 51). Logo, o condicionamento ao som é tido como hipocampo-independente ao passo que o condicionamento ao contexto é tido como uma tarefa hipocampo-dependente.

Além da divisão da memória nos seus diferentes substratos neurais, é possível também manipular a memória em suas diferentes fases.

Tendo como referência o tempo, é possível dividir a memória, de uma maneira simplificada, em três fases: 1- Aquisição (ou treino), onde novas informações seriam adquiridas; 2- Consolidação, que seria o passo onde essa nova informação seria armazenada nos circuitos neurais; 3- Evocação, onde essa informação seria recordada.

Tendo esses eventos em vista, é possível manipular a memória em suas diferentes fases. Manipulações pré-treino poderiam afetar a aquisição e por conseqüência, os passos seguintes. Manipulações pós-treino poderiam afetar a

consolidação e a evocação. Manipulações pré-teste estariam afetando somente a fase de evocação ⁽⁵⁶⁻⁵⁸⁾.

A utilização de animais de animais de laboratório, como ratos, permite um maior controle das condições ambientais e um maior controle das variáveis que poderiam interferir com a sincronização dos ritmos como, por exemplo, as condições de luminosidade, bem como outros fatores sócio-ambientais que poderiam influir na sincronização dos animais. Além disso, as bases neurais dos sistemas múltiplos de memória estão mais bem definidas em animais do que em humanos.

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral:

Os estudos existentes acerca dos efeitos deletérios da alteração de fase de ciclo claro-escuro sobre a memória, não investigam se este efeito seria geral, ou se afetaria seletivamente a memória hipocampo-dependente ou a hipocampo-independente. Portanto, o principal objetivo foi verificar o tipo de memória afetada pela alteração de fase do ritmo circadiano através do sistema hipocampo-dependente e hipocampo-independente.

Objetivos Específicos:

Verificar o prejuízo de aprendizado e memória produzido pela alteração de ciclo claro-escuro nas diferentes fases da memória: pré-treino, para verificar se esta alteração interfere com a aquisição das tarefas utilizadas, e pós-treino para verificar se esta mesma alteração causaria um prejuízo na consolidação e/ou evocação das tarefas aprendidas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Animais: Foram utilizados ratos Wistar machos com 3 meses de idade e peso de 250 a 300 gramas, provenientes do biotério do Departamento de Psicobiologia da Universidade Federal de São Paulo. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$, sob um regime de ciclo claro-escuro de 12 horas, com início às 07:00 até o dia da experimentação). Alimentação e água foram providenciadas *ad libitum*. Este trabalho foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da UNIFESP, protocolo número 1553.

Aparelhos:

Para o treino das tarefas de condicionamento de medo (CC), foi utilizada uma caixa de condicionamento (Figura 2), medindo 30x21x30 cm, onde os animais receberam o choque. A caixa tem paredes feitas de acrílico preto com quadrados brancos na face interna (como padrões visuais), e seu teto é formado por uma tampa de acrílico transparente, o que permite a visualização dos animais. A base da caixa acrílica é formada por barras metálicas condutoras de corrente elétrica dispostas paralelamente (cada barra medindo 0,4 cm de diâmetro e distantes 1,2 cm uma da outra) e conectadas a um gerador de choque elétrico (AVS – Projetos Especiais). Para o treino de condicionamento de medo ao som (CS), foi utilizado também um gerador de som que produzia um som de 80 dB (AVS – Projetos Especiais) que podia ser apresentado em contigüidade temporal com o choque.

Para o teste dessa tarefa (CS), foi utilizado o mesmo gerador que produzia o som utilizado no treino, com os mesmos parâmetros, e uma câmara de teste de acrílico cilíndrica, branca, medindo 35 cm de diâmetro por 60 cm de altura e uma tampa transparente com orifícios circulares (Figura 3).



Figura 2 - Caixa de condicionamento utilizada no departamento (CC e CS).

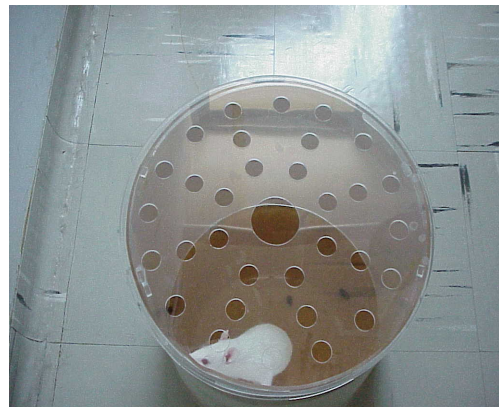


Figura 3 - Câmara de teste utilizada no departamento (CS).

Ciclo Claro-Escuro

Para o controle do ciclo claro-escuro foi utilizado um timer em uma sala vedada às condições luminosas ambientais. Os animais controles e os experimentais foram mantidos em salas diferentes, mas eram submetidos ao mesmo tipo de iluminação variando apenas o momento do dia em que a luz se acendia e apagava. Desta forma, em cada experimento, para cada tarefa comportamental realizada foram utilizados dois grupos de animais: Grupo Ciclo Alterado (C.A.) e Grupo Controle. Foram realizadas alterações de fase de ciclo claro-escuro antes ou após o treino, com um adiantamento de 6 horas na fase clara (C.A. - luzes das 01:00-13:00; controles - luzes das 07:00-19:00). No experimento pré-treino, a alteração foi realizada no dia do treino e foi mantida até o dia do teste; no experimento pós-treino a alteração foi realizada no dia do teste (adaptado de ⁽³¹⁾). Os animais foram treinados em horário fixo (09:00-12:00) e testados em dois horários: 03:00-06:00 (duas horas após o início da luz, como nos animais controles) ou das 09:00-12:00 (horário igual ao dos animais controle). O esquema pode ser visualizado na Figura 4, que está detalhada experimento por experimento em seguida.

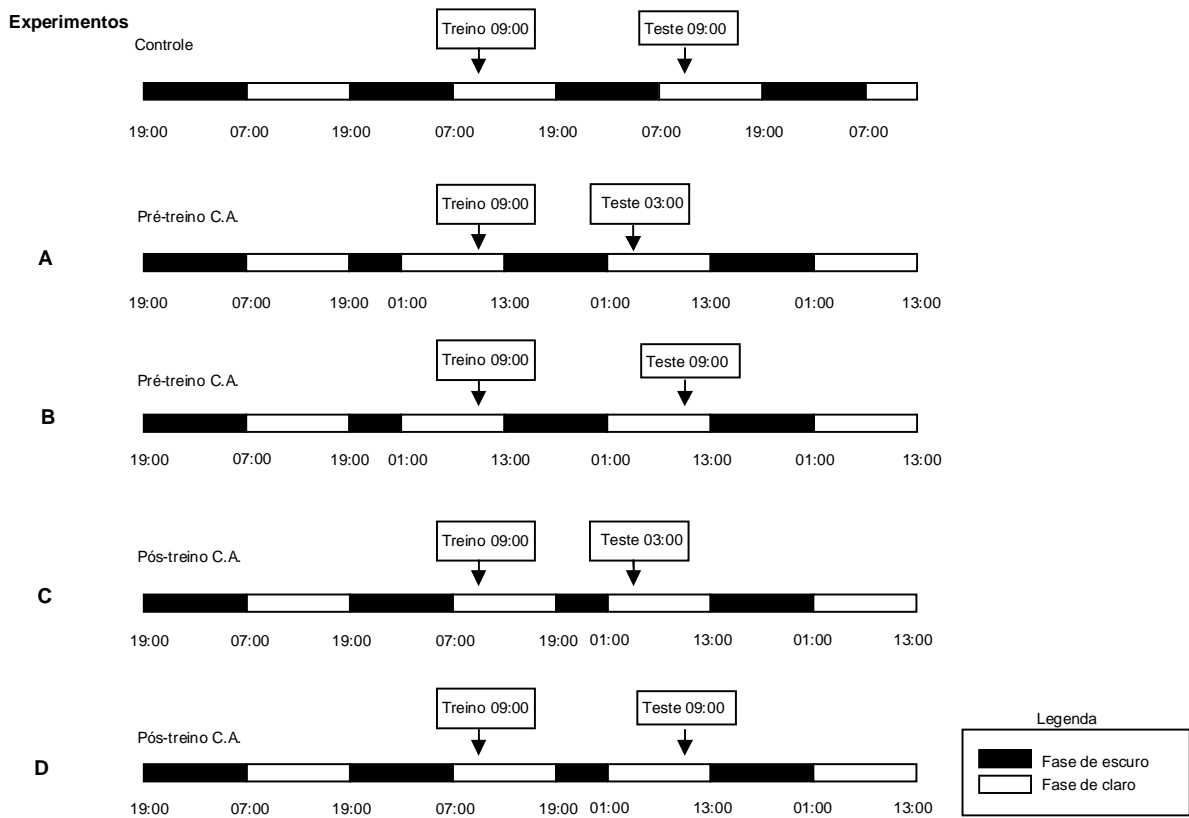


Figura 4 – Escala de iluminação para os experimentos pré-treino e pós-treino para os grupos C.A. dos respectivos experimentos e controle. Para cada grupo experimental foi realizado um grupo controle (que pode ser visualizado na primeira linha do esquema).

Experimento A - Avanço do teste e da fase clara do ciclo claro-escuro antes do treino

No experimento A, foi realizada uma alteração de fase do ciclo claro-escuro com o adiamento da fase clara em seis horas no dia do treino. As luzes, que antes se acendiam às 07:00 e se apagavam às 19:00, foram acesas à 01:00 e se apagaram às 13:00 horas. Este novo horário se estendeu até o dia do teste. Para os animais controle, as luzes se acenderam às 07:00 e se apagaram às 19:00. Os animais com o ciclo alterado foram treinados das 09:00 às 12:00 e testados das 03:00 às 06:00 (duas horas após as luzes serem acesas, assim como nos animais controle), enquanto que os animais controle foram treinados das 09:00 às 12:00 e testados 24 horas depois (Figura 5).

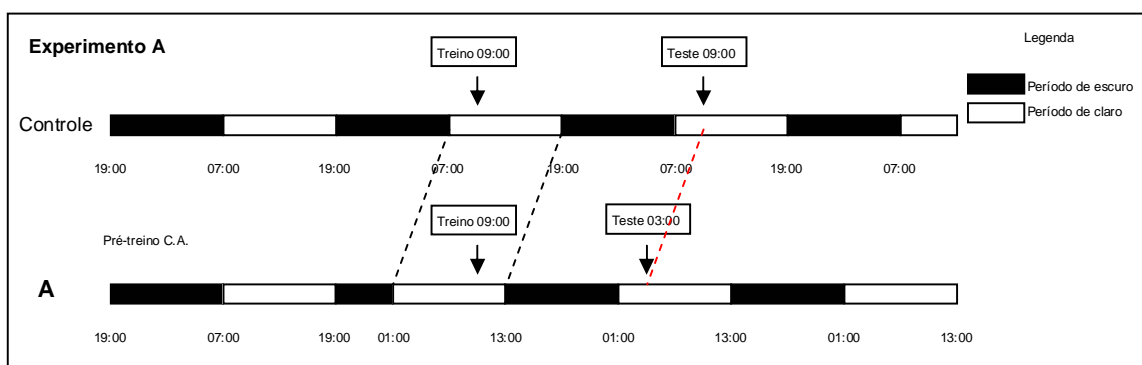


Figura 5 – Escala de iluminação para o Experimento A. Grupo controle vs grupo C.A. e horário de treino e teste.

Experimento B - *Avanço da fase clara do ciclo claro-escuro antes do treino*

No experimento B, foi realizada uma alteração de fase do ciclo claro-escuro, com o adiantamento da fase clara em seis horas no dia do treino. As luzes, que antes se acendiam às 07:00 e se apagavam às 19:00, foram acesas à 01:00 e se apagaram às 13:00. Este novo horário se manteve até o dia do teste. Para os animais controle, as luzes se acenderam às 07:00 e se apagaram às 19:00. Os animais com o ciclo alterado foram treinados das 09:00 às 12:00 e testados das 09:00 às 12:00 (vinte quatro horas após o treino). Os animais controle foram treinados das 09:00 às 12:00 e testados 24 horas depois (Figura 6).

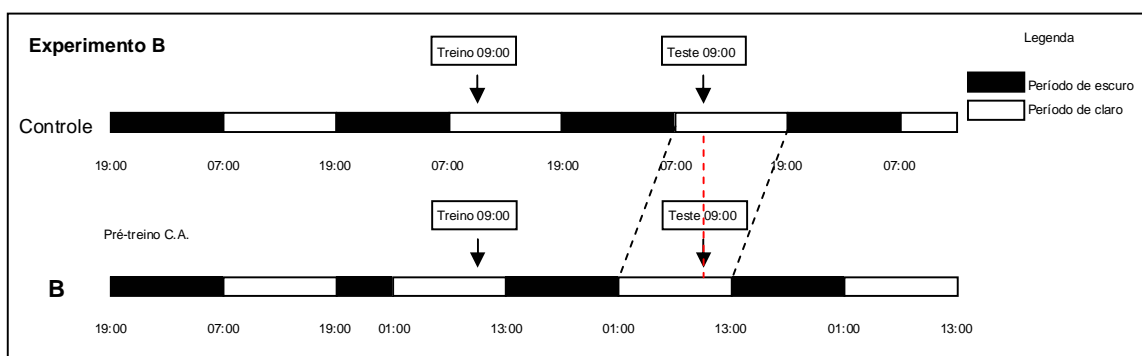


Figura 6 – Escala de iluminação para o Experimento B. Grupo controle vs grupo C.A. e horário de treino e teste.

Experimento C - Avanço do teste e da fase clara do ciclo claro-escuro antes do teste

No experimento C, foi realizada uma alteração de fase do ciclo claro-escuro, com um adiamento da fase clara em seis horas, no dia do teste. As luzes, que antes se acendiam às 07:00 e se apagavam às 19:00 até o dia do treino, foram acesas à 01:00 e se apagaram às 13:00 horas no dia do teste. Para os animais controle, as luzes se acenderam às 07:00 e se apagaram às 19:00. Os animais com o ciclo alterado foram treinados das 09:00 às 12:00 e testados das 03:00 às 06:00 (duas horas após as luzes serem acesas, assim como nos animais controle), enquanto que os animais controle foram treinados das 09:00 às 12:00 e testados 24 horas depois (Figura 7).

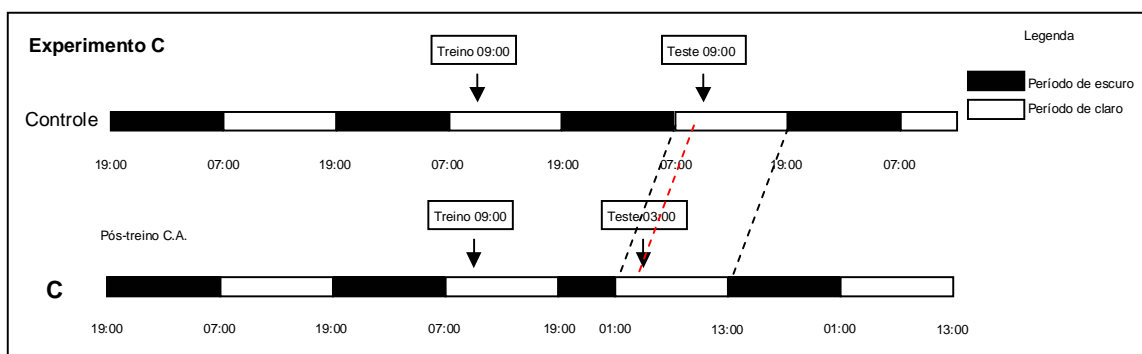


Figura 7 – Escala de iluminação para o Experimento C. Grupo controle vs grupo C.A. e horário de treino e teste.

Experimento D - *Avanço da fase clara do ciclo claro-escuro antes do teste*

No experimento D, foi realizada uma alteração de fase do ciclo claro-escuro, com o adiantamento da fase clara em seis horas, no dia do teste. As luzes, que antes se acendiam às 07:00 e se apagavam às 19:00 até o dia do treino, foram acesas à 01:00 e se apagaram às 13:00 horas no dia do teste. Os animais com o ciclo alterado foram treinados das 09:00 às 12:00 e testados das 09:00 às 12:00 (vinte quatro horas após o treino). Os animais controle foram treinados das 09:00 às 12:00 e testados 24 horas depois (Figura 8).

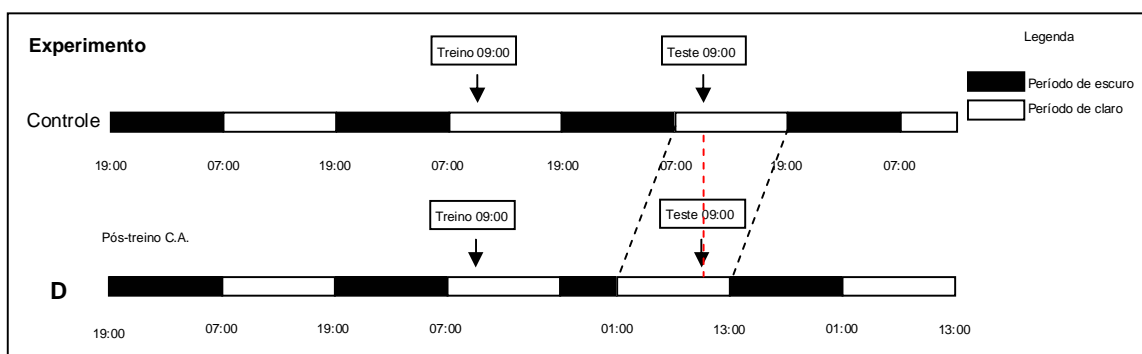


Figura 8 – Escala de iluminação para o Experimento D. Grupo controle vs grupo C.A. e horário de treino e teste.

2.3. Procedimentos Comportamentais

Os animais C.A. e controle foram submetidos às tarefas de condicionamento de medo ao som e condicionamento de medo ao contexto. Para cada teste comportamental, diferentes grupos de animais foram utilizados.

2.3.1. Condicionamento de Medo ao Contexto

No dia 1 (**Treino**), os animais foram colocados individualmente na caixa de condicionamento, onde permaneceram por 5 minutos. Ao final do segundo minuto, cada animal recebeu 5 choques nas patas (0,6mA/1seg), com intervalos de 30 segundos entre cada choque (IEC). Um minuto após o último choque, o animal foi retirado do aparelho, retornando para a gaiola moradia. O choque nas patas foi o EI e o ambiente (contexto), o EC.

No dia 2 (**Teste**), os animais foram colocados no mesmo ambiente do dia do treino e permaneceram por 5 minutos. O tempo de congelamento definido como uma completa imobilidade do animal, com ausência de movimento de vibrissas e de farejamentos ⁽⁵⁴⁾ foi medido minuto a minuto através de um cronômetro. A média do tempo de congelamento por minuto foi utilizada como medida de condicionamento (Figura 9).

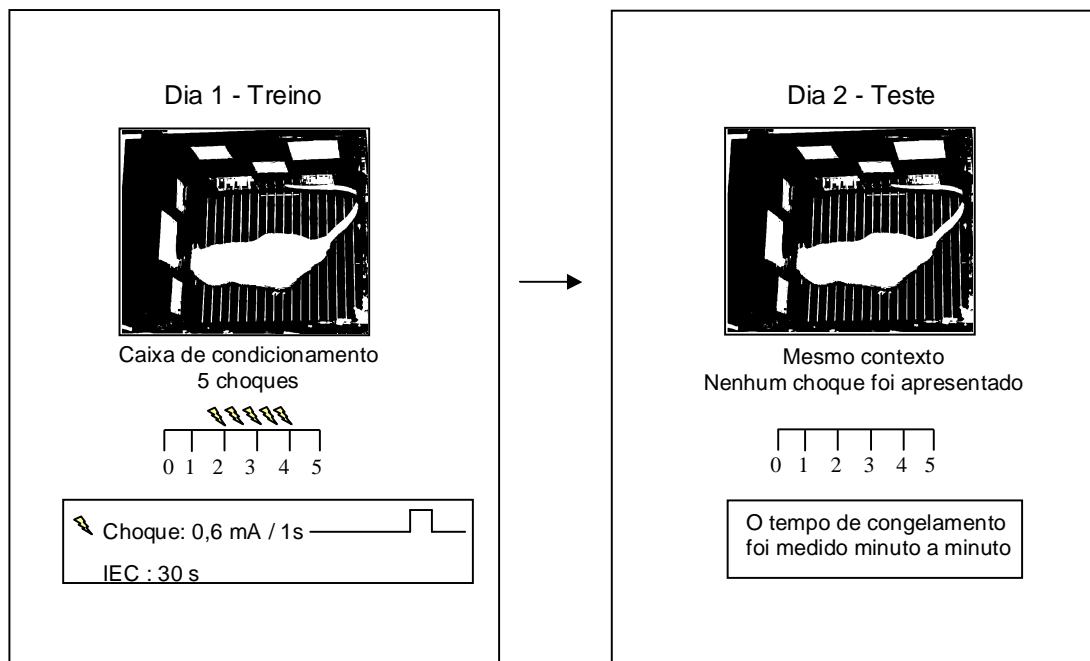


Figura 9 – Protocolo utilizado para o condicionamento de medo ao contexto.

2.3.2. Condicionamento de Medo ao Som

No primeiro dia (**Treino**), animais controles e C.A. foram colocados individualmente por 5 minutos na caixa de condicionamento. A partir do terceiro minuto, cada animal recebeu 5 pareamentos som-choque (80dB/5seg; 0,6mA/1seg, no último segundo do som). O intervalo entre cada choque (IEC) foi de 30 segundos. Um minuto após o último pareamento, cada animal foi retirado do aparelho e colocado de volta à gaiola moradia.

No dia 2 (**Teste**), 24 horas após o treino, cada animal foi colocado na câmara de teste (novo contexto) onde permaneceu por 6 minutos. Durante o quarto e quinto minutos de permanência na câmara, apenas o estímulo condicionado (som), com os mesmos parâmetros do dia do treino, foi apresentado 5 vezes ao

animal, em intervalos de 25 segundos (IES). O tempo de congelamento foi medido minuto a minuto com um cronômetro, e a média do tempo de congelamento antes do som e pós-som foi utilizada como medida de condicionamento. Treino e teste no CS foram realizados em salas diferentes (Figura 10).

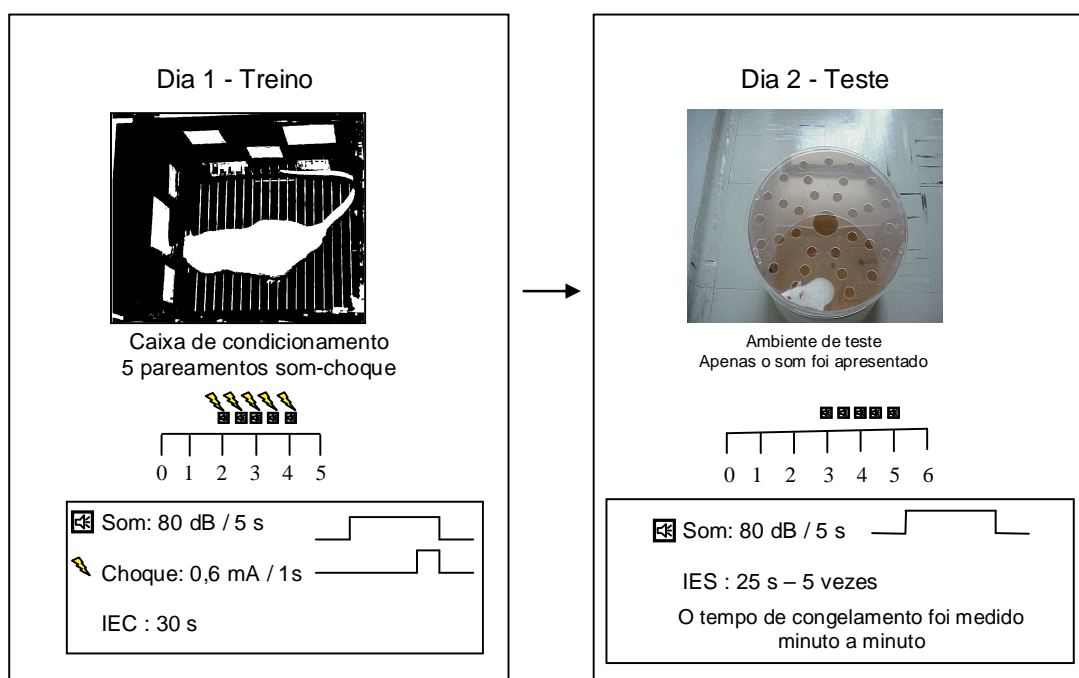


Figura 10 – Protocolo utilizado para o condicionamento de medo ao som.

2.3.3 Análise Estatística

A análise dos dados do CC foi realizada através da média do tempo total de congelamento pelo teste t de Student.

Para a análise dos dados do CS utilizou-se a ANOVA de duas vias com medidas repetidas: antes do som e após o som.

Foi considerado $p \leq 0,05$ como nível de significância.

4. RESULTADOS

Experimento A

Condicionamento de Medo ao Contexto

A estatística realizada com o teste t mostrou que os grupos C.A. e controle não diferem ($t=1,63$; $df=33$; $p=0,11$), como pode ser visto na Figura 11.

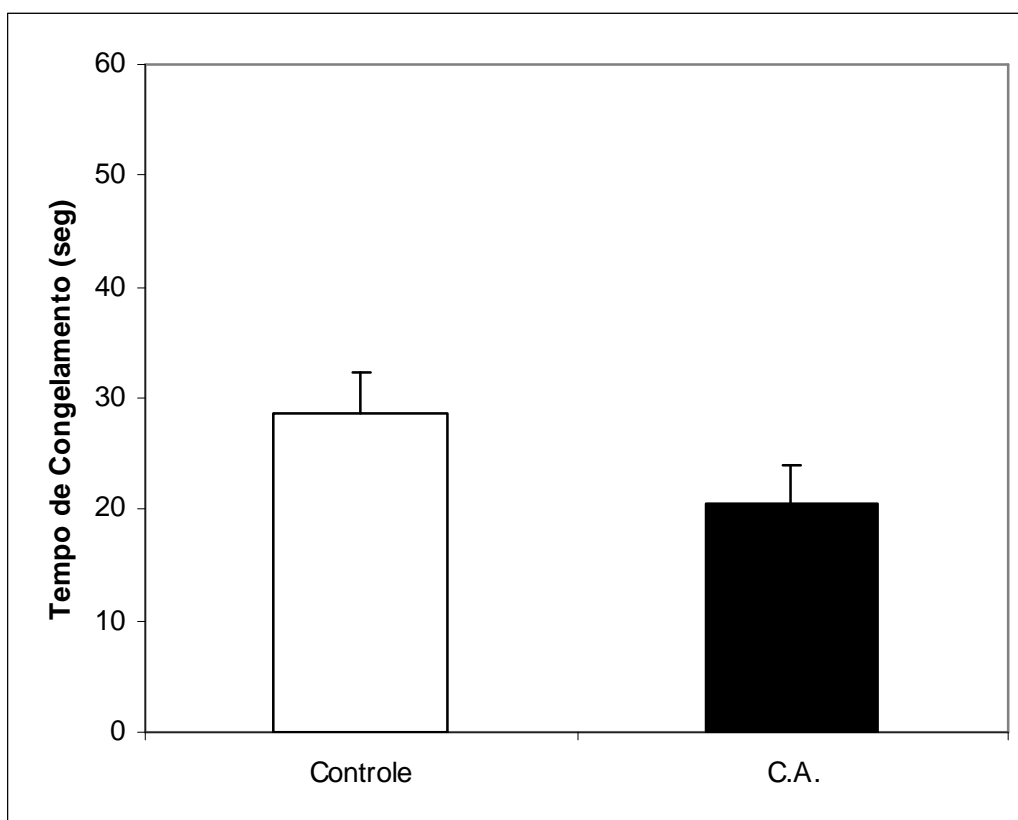


Figura 11 - Efeito do avanço do teste e da fase clara do ciclo claro-escuro antes do treino sob a tarefa de condicionamento contextual de medo (teste realizado 2 horas após as luzes serem acesas). O gráfico mostra a média do tempo de congelamento total por minuto + e.p. no dia do teste para o grupo Controle e grupo ciclo alterado (C.A.). $n=18$ por grupo.

Condicionamento de Medo ao Som

A ANOVA de duas vias mostrou que os grupos C.A. e controle não apresentam diferenças estatisticamente significativas ($F_{(1,30)} = 0,81$; $p = 0,37$). Apenas o efeito minuto ($F_{(1,30)} = 772,92$; $p < 0,0001$) foi significativo. A interação ($F_{(1,30)} = 0,10$; $p < 0,75$) também não foi significativa. Como pode ser visto na Figura 12, animais CA e controles não são diferentes nem antes, nem após o som.

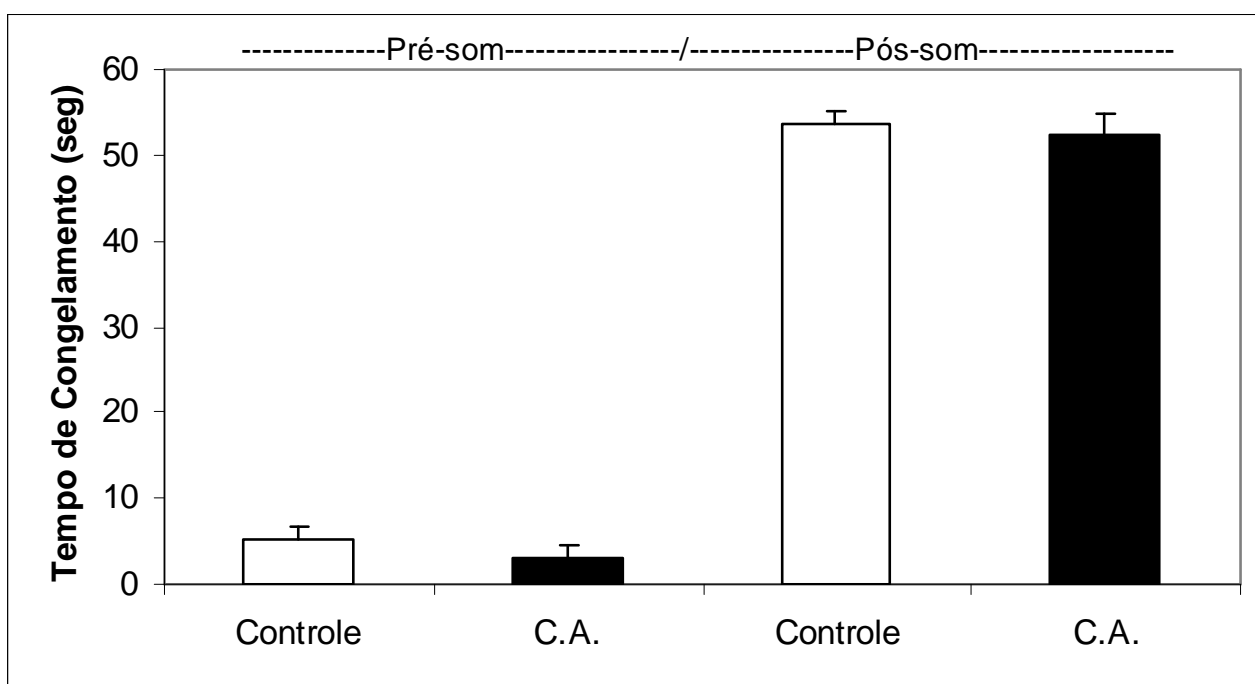


Figura 12 - Efeito do avanço do teste e da fase clara do ciclo claro-escuro antes do treino sob a tarefa de condicionamento de medo ao som (teste realizado 2 horas após as luzes serem acesas). O gráfico mostra a média do tempo de congelamento total por minuto + e.p. no dia do teste antes (pré-som) e após (pós-som) a apresentação do som. Grupo Controle e grupo ciclo alterado (C.A.), $n = 18$ por grupo.

Experimento B

Condicionamento de Medo ao Contexto

Os grupos C.A. e controle não diferem segundo o teste t ($t=0,48$; $df=30$; $p=0,63$). A Figura 13 mostra a média dos tempos de congelamento dos grupos experimentais (alteração pré-treino) e controle.

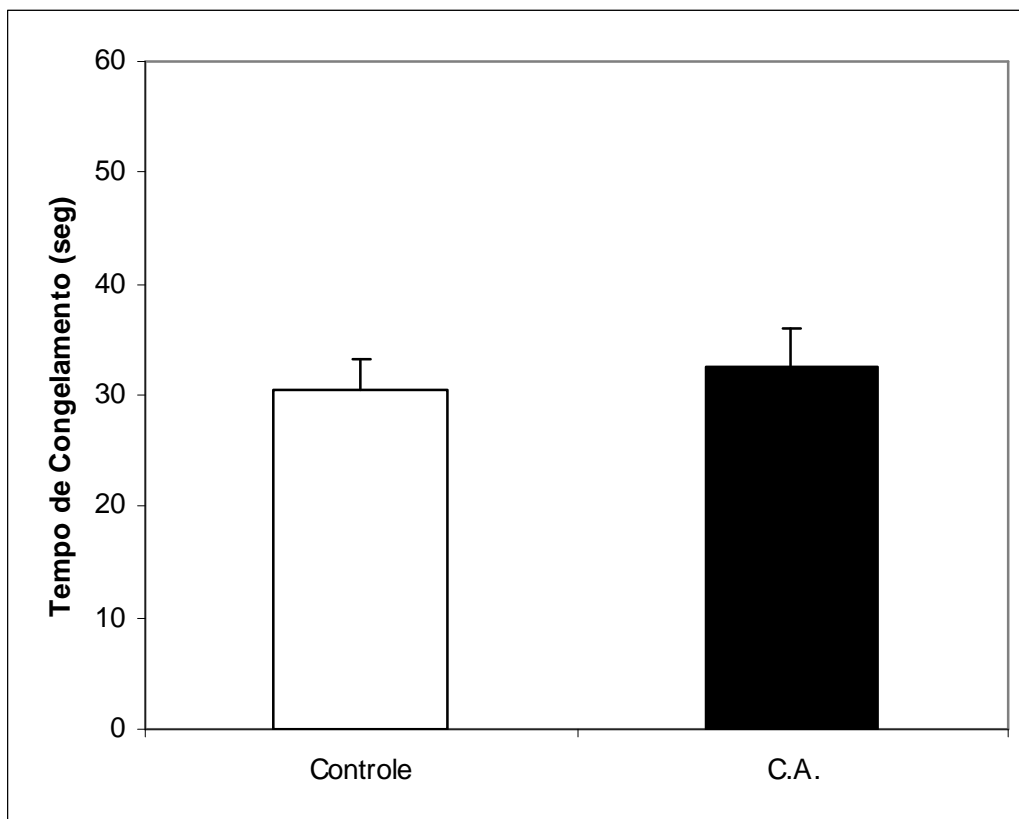


Figura 13 – Efeito do avanço da fase clara do ciclo claro-escuro antes do treino sob a tarefa de condicionamento contextual de medo, com teste realizado 8 horas após as luzes serem acesas. O gráfico mostra a média do tempo de congelamento total por minuto + e.p. no dia do teste para o grupo Controle e grupo ciclo alterado (C.A.). $n=16$ por grupo.

Condicionamento de Medo ao Som

A ANOVA de duas vias mostrou que os grupos C.A. e controle não apresentam diferenças estatisticamente significativas ($F_{(1,34)} = 1,08$; $p = 0,30$). Apenas o efeito minuto ($F_{(1,34)} = 490,37$; $p < 0,0001$) foi significativo. A interação ($F_{(1,34)} = 0,01$; $p < 0,90$) também não foi significativa. Como pode ser visto na Figura 14, animais C.A. e controles não são diferentes nem antes, nem após o som.

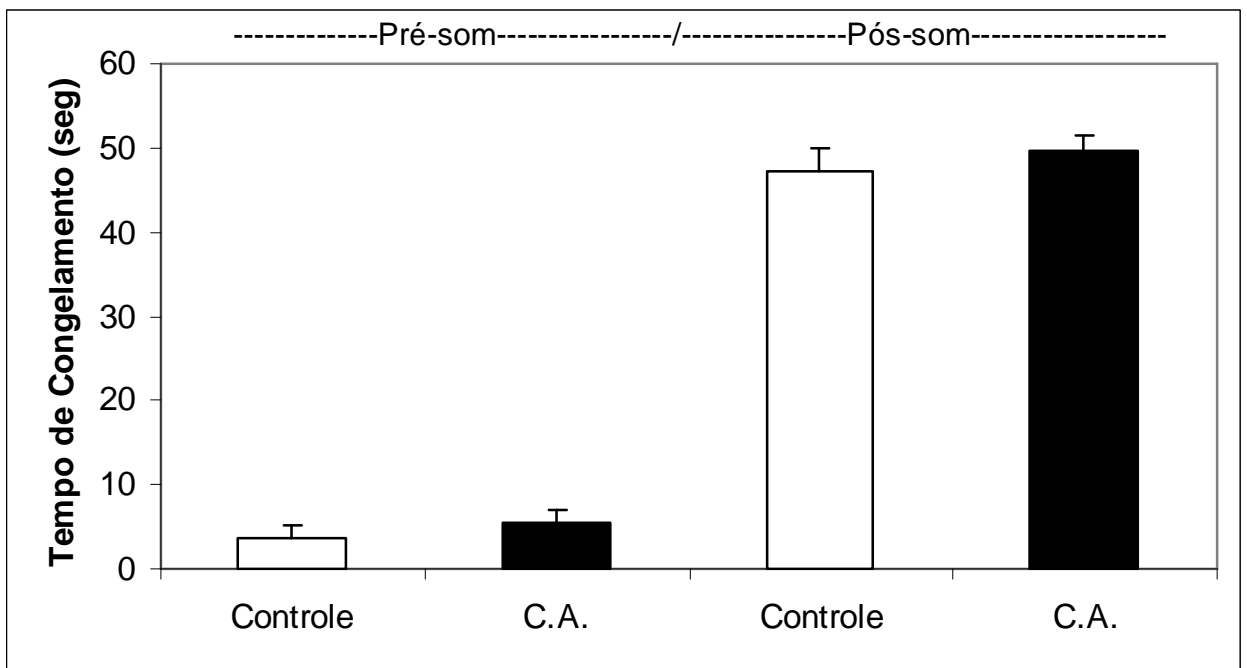


Figura 14 - Efeito do avanço da fase clara do ciclo claro-escuro antes do treino sob a tarefa de condicionamento de medo ao som, com teste realizado 8 horas após as luzes serem acesas. O gráfico mostra a média do tempo de congelamento total por minuto + e.p. no dia do teste antes (pré-som) e após (pós-som) a apresentação do som. Grupo Controle e grupo ciclo alterado (C.A.), $n = 18$ por grupo.

Experimento C

Condicionamento de Medo ao Contexto

A estatística realizada com o teste t mostrou que os grupos experimentais e controle diferem ($t=2,13$; $df=34$; $p<0,05$). As médias podem ser visualizadas na Figura 15.

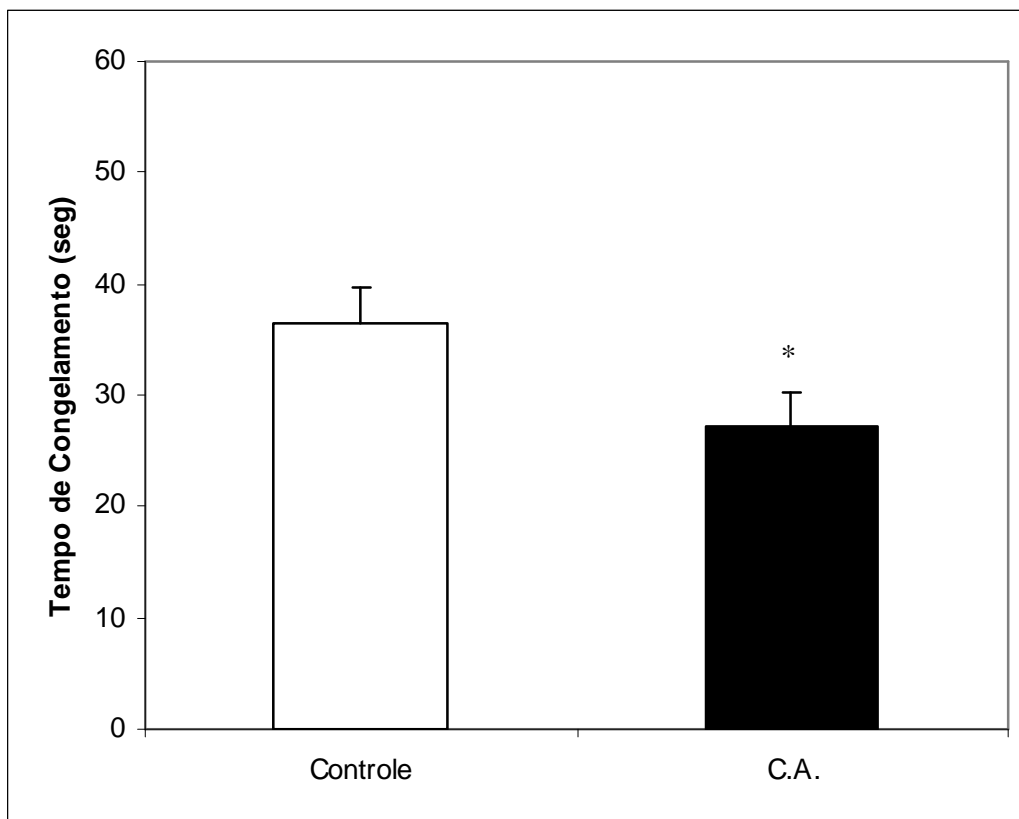


Figura 15 - Efeito do avanço do teste e da fase clara do ciclo claro-escuro antes do teste sob a tarefa de condicionamento contextual de medo, com teste realizado 2 horas após as luzes serem acesas. O gráfico mostra a média do tempo de congelamento total por minuto + e.p. no dia do teste para o grupo Controle e grupo ciclo alterado (C.A.). * $p\leq 0,05$ teste t de Student.

Condicionamento de Medo ao Som

A ANOVA de duas vias mostrou que os grupos C.A. e controle não apresentam diferenças estatisticamente significativas ($F_{(1,30)} = 0,14$; $p = 0,70$). Apenas o efeito minuto ($F_{(1,30)} = 412,60$; $p < 0,0001$) foi significativo. A interação ($F_{(1,30)} = 0,006$; $p < 0,95$) também não foi significativa. Como pode ser visto na figura 16, animais CA e controles não são diferentes nem antes, nem após o som.

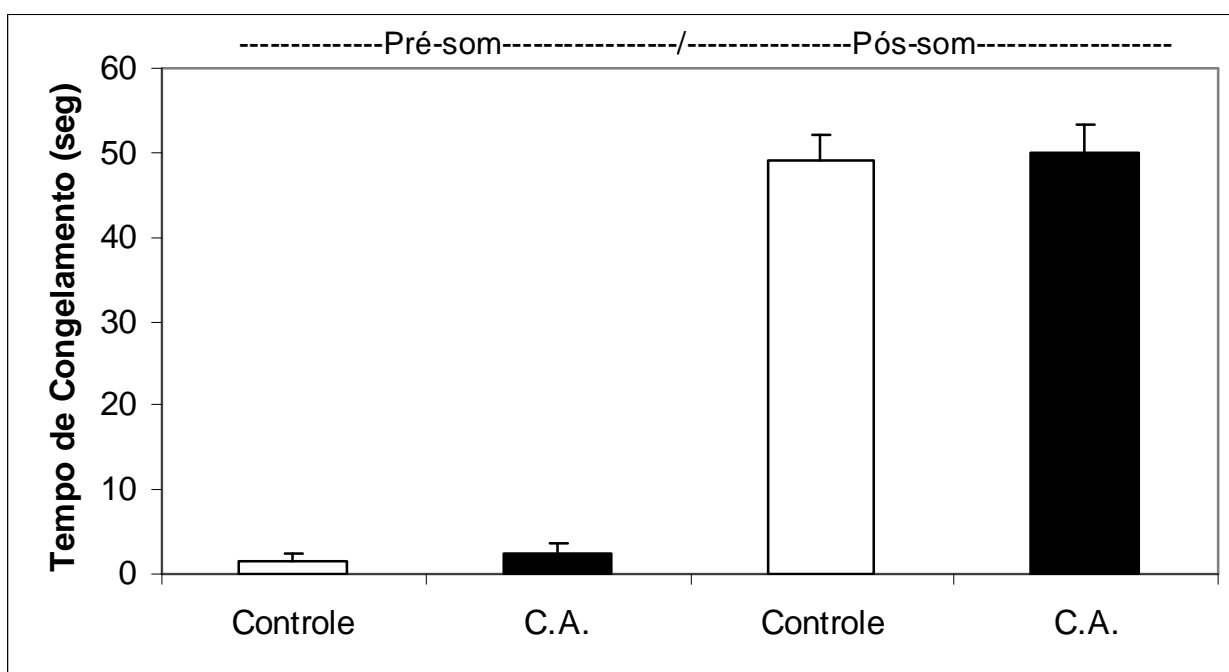


Figura 16 - Efeito do avanço do teste e da fase clara do ciclo claro-escuro antes do teste sob a tarefa de condicionamento de medo ao som, com teste realizado 2 horas após as luzes serem acesas. O gráfico mostra a média do tempo de congelamento total por minuto + e.p. no dia do teste antes (pré-som) e após (pós-som) a apresentação do som. Grupo Controle e ciclo alterado (C.A.), $n=18$ por grupo.

Experimento D

Condicionamento de Medo ao Contexto

Os animais C.A. e controle diferem segundo a estatística realizada com o teste t ($t=3,30$; $df=34$; $p<0,01$). Os gráficos estão descritos na Figura 17.

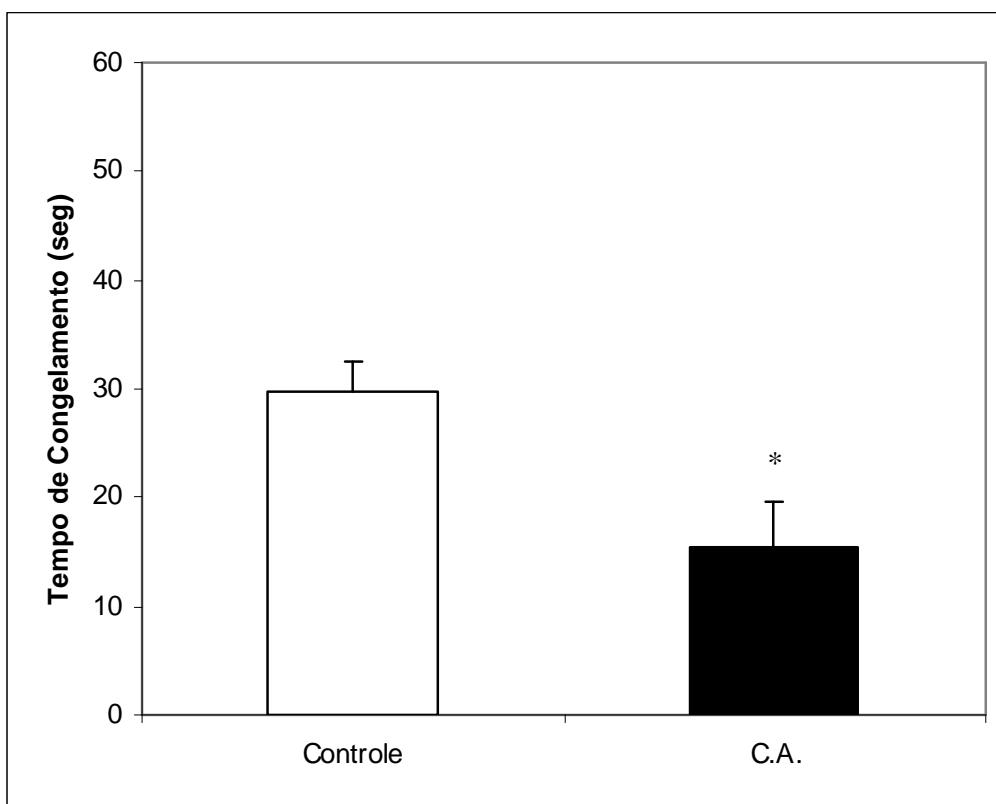


Figura 17 - Efeito do avanço da fase clara do ciclo claro-escuro antes do teste sob a tarefa de condicionamento contextual de medo, com teste realizado 8 horas após as luzes serem acesas. O gráfico mostra a média do tempo de congelamento total por minuto + e.p. no dia do teste para o grupo Controle e ciclo alterado (C.A.).

* $p\leq 0,05$ teste t de Student.

Condicionamento de Medo ao Som

A ANOVA de duas vias mostrou que os grupos C.A. e controle não apresentam diferenças estatisticamente significativas ($F_{(1,34)} = 2,02$; $p = 0,16$). Apenas o efeito minuto ($F_{(1,34)} = 1762,52$; $p < 0,0001$) foi significativo. A interação ($F_{(1,34)} = 2,46$; $p < 0,13$) também não foi significativa. Como pode ser visto na figura 18, animais C.A. e controles não são diferentes nem antes, nem após o som.

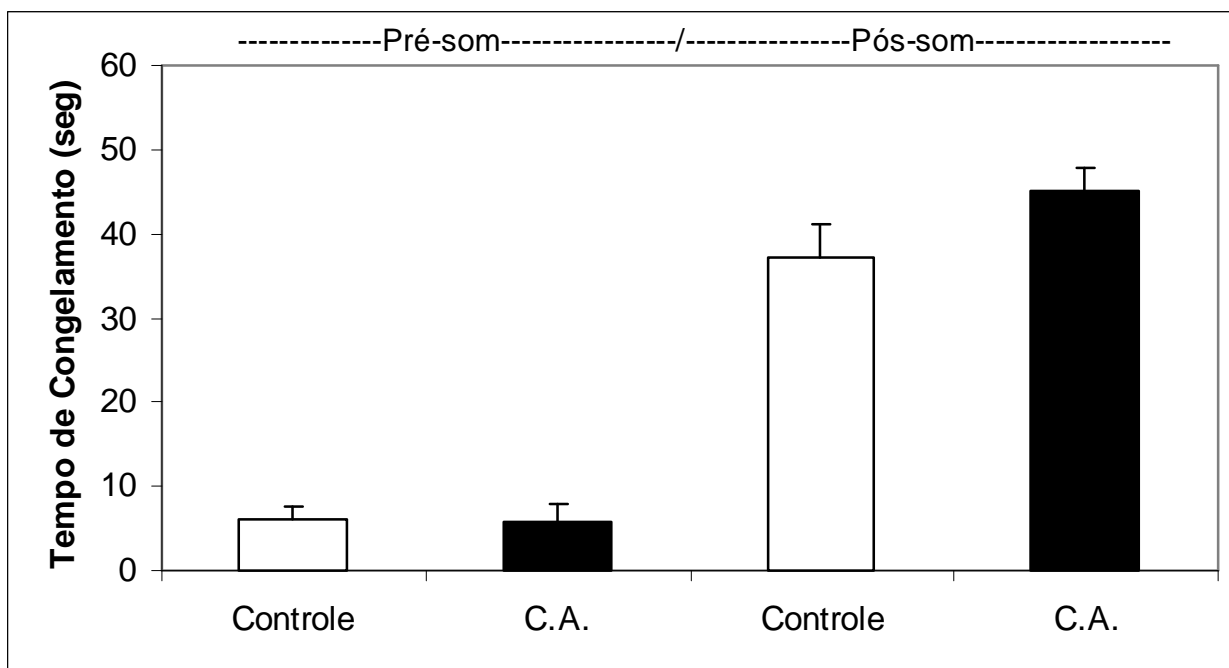


Figura 18 - Efeito do avanço da fase clara do ciclo claro-escuro antes do teste sob a tarefa de condicionamento de medo ao som, com teste realizado 8 horas após as luzes serem acesas. Média do tempo de congelamento total por minuto + e.p. no dia do teste antes (pré-som) e após (pós-som) a apresentação do som. Grupo Controle e ciclo alterado (C.A.), $n=18$ por grupo.

5. DISCUSSÃO

Os resultados apresentados no presente trabalho mostraram que a alteração de fase luminosa realizada após o treino é capaz de provocar prejuízo no desempenho dos animais no teste de condicionamento contextual de medo, mas não no condicionamento de medo ao som.

A tarefa de condicionamento contextual de medo guarda muitas semelhanças com o condicionamento ao som, pois nestas tarefas o estímulo incondicionado é o choque e a resposta comportamental avaliada é o congelamento.

O prejuízo observado não foi devido a alterações motoras ou motivacionais, pois se este fosse o caso, os mesmos resultados seriam observados para o condicionamento de medo ao som. As manipulações que provocam prejuízo seletivo no condicionamento contextual de medo, como as obtidas no presente estudo, são aquelas que interferem com o funcionamento da função hipocampal^(50; 51). Estes dados confirmaram e estenderam os obtidos por Devan⁽³⁴⁾ e Fekete⁽³¹⁾. Devan et al.⁽³⁴⁾ verificaram que a alteração de fase do ciclo claro-escuro, quando realizada cronicamente (durante o treino, até o dia do teste, pois a aquisição desta tarefa necessita de um treino mais extensivo), prejudica o desempenho dos animais no dia do teste numa tarefa dependente do hipocampo: a versão espacial do labirinto aquático de Morris. Avanço de fase realizado logo após o treino também prejudica a esQUIVA INIBITÓRIA⁽³¹⁾. Nossos dados mostraram que outra tarefa sensível à lesão de hipocampo além da esQUIVA INIBITÓRIA e da versão espacial do labirinto de Morris pode ser também afetada pelo adiantamento de fase

do ciclo claro-escuro. Devido ao fato de Devan não ter avaliado a versão não espacial naquele labirinto, seus dados não permitiam avaliar se o prejuízo observado também ocorreria em tarefas hipocampo-independentes. Nossos dados estenderam achados prévios ⁽³⁴⁾ ao demonstrar que a alteração de ciclo claro-escuro, quando realizada pré-treino, não interfere com a aquisição de algumas tarefas utilizadas para avaliar a memória. Estes dados sugerem que estas últimas tarefas podem ser resistentes à manipulação do ciclo, entretanto, ainda não é possível fazer uma generalização para outras tarefas, uma vez que apenas uma tarefa hipocampo-independente foi utilizada. Além disso, não houve qualquer prejuízo quando avanço de fase foi realizado antes do treino. Tanto Devan ⁽³⁴⁾ como Fekete ⁽³¹⁾ realizaram também avanço de fase pré-treino, sendo que o segundo não achou prejuízo e o primeiro sim. Nossos dados estão de acordo com o primeiro, mas o conflito observado faz supor que o prejuízo pode ou não ocorrer, dependendo da tarefa utilizada.

Manipulações realizadas após o treino podem interferir com a evocação ou com a consolidação ^(59,60). Entretanto, nos experimentos C e D (aqueles nos quais o prejuízo foi observado), os animais foram treinados das 09:00 às 12:00 de um dia, e o avanço de fase só foi realizado 13 horas depois do último animal treinado, ou seja, as luzes se acenderam à 01:00 hora da madrugada ao invés das 07:00 horas da manhã. Experimentos prévios para determinar o tempo de consolidação da memória em tarefas de medo indicaram que esse processo duraria de alguns minutos até, no máximo, 6 horas ⁽⁶¹⁾. Além disso, outro trabalho realizado por Fekete ⁽⁶²⁾ mostrou que o prejuízo obtido na esQUIVA inibitória pela alteração de fase do ciclo claro-escuro pode ser revertido farmacologicamente 1 hora antes do

teste. Logo, é improvável que o prejuízo tenha ocorrido na consolidação da tarefa. Neste sentido, Fekete et al., treinaram animais na tarefa de esquiva e após 5 dias fizeram a alteração da fase claro-escuro, e testaram 24 após a mudança de fase. Os animais com a fase alterada apresentaram prejuízo na resposta de esquiva, indicando que essas alterações não afetaram o período de consolidação da tarefa. Como no presente experimento, a alteração de fase foi realizada antes do teste, é possível que sua influência tenha se dado sobre a evocação da memória da tarefa ou sobre o desempenho comportamental, isto é, sobre o comportamento de congelamento dos animais. Esta última hipótese pode ser descartada pelo fato de que no condicionamento de medo ao som a mesma resposta comportamental é utilizada para se avaliar a retenção da tarefa e nenhum prejuízo é observado. Supõe-se, portanto, que as alterações fisiológicas provocadas pela alteração de ciclo interfiram com a evocação do condicionamento contextual de medo e não sobre a aquisição ou consolidação do mesmo.

Nos Experimentos em que o avanço de fase foi realizado antes do treino (A e B) nenhum prejuízo foi observado. Isto mostra que os efeitos do avanço de fase sobre a evocação não duram mais que 24 horas. Outra possível explicação para a diferença entre os efeitos do avanço de fase realizado pré ou pós-treino baseia-se no fato de que os animais do Experimento A e B (avanço de fase pré-treino) foram treinados e testados sob a mesma condição, no caso um novo ciclo claro-escuro (ou as conseqüências fisiológicas desta alteração sobre o sistema nervoso central). Neste caso pode ter ocorrido o fenômeno de aprendizagem estado-dependente (um tipo de aprendizagem onde o animal só recorda o aprendido quando está com o mesmo estado fisiológico do dia do treino ⁽⁶³⁾), pois apenas os animais do grupo

pós-treino foram treinados e testados sob condições diferentes, sendo treinados em um estado e testados em outro. De qualquer forma, apenas a tarefa hipocampo dependente foi sensível a esta manipulação.

A memória para as tarefas aversivas, tanto no CC como no CS, em camundongos, apresenta ritmicidade circadiana, apresentando picos de desempenho em intervalos regulares de 24 horas, e que, além disso, os animais possuem ainda melhor desempenho em fase clara ⁽¹⁷⁾. Como consequência, quando o intervalo entre o treino e o teste for diferente de 24 horas, os animais podem apresentar um desempenho menor do que aquele observado quando o intervalo for de 24 horas. Como no Experimento C, controles e experimentais diferem em relação ao intervalo entre o treino e o teste (24 horas para os animais controles e 18 horas para os animais do grupo C.A.), levantou-se a possibilidade do prejuízo observado neste Experimento estar relacionado com a ritmicidade circadiana na evocação da tarefa e não ao avanço de fase *per se*. O Experimento D mostrou que o fato do intervalo entre o treino e o teste ser de 18 horas não provocou prejuízo na tarefa. Apesar do desempenho nesta tarefa ser sensível, pelo menos em camundongos, a alterações circadianas, este fator não parece ter interferido no resultado do presente trabalho. Também se pode descartar a possibilidade de que o prejuízo observado ter sido decorrente do fato dos animais controles diferirem dos experimentais no período entre o acender das luzes e o momento do teste. Esta possibilidade levantada pelo Experimento 2 foi testada no Experimento 3 no qual o intervalo entre o acender das luzes e o teste foi igual para controles e experimentais. Desta forma, o avanço de fase do ciclo claro-escuro *per se* parece ser o principal fator que interfere com a função hipocampal. Mais

estudos serão necessários para se verificar as causas fisiológicas deste prejuízo. Entretanto, existem indícios de uma relação funcional entre o hipocampo e o núcleo supraquiasmático, o principal marcapasso central circadiano e uma das estruturas relacionadas com a sincronização fótica via retina (para revisão, consulte 64). O hipocampo e o sistema límbico possuem conexões diretas e indiretas do núcleo supraquiasmático ⁽⁶⁵⁾. Essas conexões poderiam influenciar a modulação da evocação das memórias hipocampo-dependentes. Sabe-se que lesão do núcleo supraquiasmático gera alteração nos ritmos endógenos (1) e que estimulações elétricas no hipocampo que geram epilepsia, são também capazes de alterar o ritmo circadiano em ratos, mostrando a íntima relação entre o SSC e o hipocampo ⁽⁶⁶⁾.

A alteração dos ritmos luminosos é uma situação presente no cotidiano dos seres humanos. Esta alteração pode ser presenciada na rotina de trabalhadores de turno temporários e em viajantes transcontinentais, fenômeno conhecido como “jet-lag”. Um estudo de neuroimagem realizado com aeromoças, pessoas que estão constantemente alterando a fase do seu ciclo claro-escuro, mostrou que o jet-lag crônico pode causar atrofia do lobo temporal, região onde se localiza o hipocampo. Estas aeromoças possuíam déficits cognitivos ao realizar tarefas para avaliar a memória ^(38,67).

A alteração dos ritmos influencia a secreção de alguns hormônios que possuem expressão circadiana ⁽⁴⁰⁾. Entre eles podemos destacar a melatonina e o cortisol que possuem um papel importante nos processos mnemônicos, principalmente influenciando o processamento da memória no hipocampo ^(68, 45, 69, 70). Esta dessincronização poderia estar influenciando negativamente a evocação

da memória para o condicionamento de medo ao contexto, mas não para o condicionamento de medo ao som, impedindo a expressão circadiana das memórias que dependem do hipocampo. Porém, mais experimentos seriam necessários para testar esta hipótese, já que nenhum destes hormônios foi dosado neste experimento.

Em resumo, estes resultados sugerem que a dessincronização entre sistema temporal endógeno com as novas pistas externas (no caso, um novo ciclo claro-escuro) pode gerar problemas na evocação das tarefas que dependem do hipocampo.

6. CONCLUSÕES GERAIS

1. O avanço de fase do ciclo claro-escuro interfere apenas na tarefa de condicionamento de medo ao contexto, uma tarefa hipocampo-dependente.
2. O avanço de fase do ciclo claro-escuro interfere apenas com a evocação ou consolidação da tarefa de condicionamento de medo ao contexto, ou seja, interfere apenas quando é realizado pós-treino.
3. Não foi constatada nenhuma alteração para o condicionamento de medo ao som, nem pré, nem pós-treino.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ralph MR, Foster RG, Davis FC, Menaker M. Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science* 1990;247(4945):975-8.
2. Reppert SM, Weaver DR. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 2002;418(6901):935-41.
3. Buijs RM, van Eden CG, Goncharuk VD, Kalsbeek A. The biological clock tunes the organs of the body: timing by hormones and the autonomic nervous system. *J Endocrinol* 2003;177(1):17-26.
4. Turek, F. W. and Zee, P. C. Regulation of sleep and circadian rhythms. In: F. W. Turek and P. C. Zee (Eds) *Lung Biology in Health and Disease*, Vol.133. M.Dekker, NewYork, 1999:1–24.
5. Rea MA. Photic entrainment of circadian rhythms in rodents. *Chronobiol Int*1998;15(5):395-423.
6. Moore RY, Lenn NJ. A retinohypothalamic projection in the rat. *J Comp Neurol* 1972;146(1):1-14.

7. Daan S, Pittendrigh CS. A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents: II. The variability of phase response curves. *J Comp Physiol [A]* 1976;106:253-266.
8. Masana MI, Benloucif S, Dubocovich ML. Light-induced c-fos mRNA expression in the suprachiasmatic nucleus and the retina of C3H/HeN mice. *Brain Res Mol Brain Res* 1996;42(2):193-201.
9. Nakamura TJ, Fujimura K, Ebihara S, Shinohara K. Light response of the neuronal firing activity in the suprachiasmatic nucleus of mice. *Neurosci Lett* 2004;371(2-3):244-8.
10. Hiroshige T, Honma K, Watanabe K. Possible zeitgebers for external entrainment of the circadian rhythm of plasma corticosterone in blind infantile rats. *J Physiol* 1982;325:507-19.
11. Hastings MH, Duffield GE, Smith EJ, Maywood ES, Ebling FJ. Entrainment of the circadian system of mammals by nonphotic cues. *Chronobiol Int* 1998;15(5):425-45.

12. Mistlberger RE, Skene DJ. Social influences on mammalian circadian rhythms: animal and human studies. *Biol Rev Camb Philos Soc* 2004;79(3):533-56.
13. Mistlberger RE, Skene DJ. Nonphotic entrainment in humans? *J Biol Rhythms* 2005;20(4):339-52.
14. Daan S. Learning and circadian behavior. *J Biol Rhythms* 2000;15(4):296-9.
15. Valentinuzzi VS, KD, Hotzvitaterna M, Ferrari EAM, Takahashi JS, Turek FW. Effect of circadian phase on context and cued fear conditioning in C57BL/6J mice. *Anim Learn Behav* 2001;29(2):133-142.
16. Valentinuzzi VS, Menna-Barreto L, Xavier GF. Effect of circadian phase on performance of rats in the Morris water maze task. *J Biol Rhythms* 2004;19(4):312-24.
17. Chaudhury D, Colwell CS. Circadian modulation of learning and memory in fear-conditioned mice. *Behav Brain Res* 2002;133(1):95-108.
18. Beling I. Uber das Zeitgedachtnis der Bienen. *Zeitschrift fur vergleichende. Physiologie* 1929;9:259-338.

19. Moore D, Siegfried D, Wilson R, Rankin MA. The influence of time of day on the foraging behavior of the honeybee, *Apis mellifera*. *J Biol Rhythms* 1989;4(3):305-25.
20. Biebach H, Falk H, Krebs JR. The effect of constant light and phase shifts on a learned time-place association in garden warblers (*Sylvia borin*): hourglass or circadian clock? *J Biol Rhythms* 1991;6(4):353-65.
21. Reeb SG, Lague M. Daily food-anticipatory activity in golden shiners. A test of endogenous timing mechanisms. *Physiol Behav* 2000;70(1-2):35-43.
22. Carr JA, Wilkie DM. Rats use an ordinal timer in a daily time-place learning task. *J Exp Psychol Anim Behav Process* 1997;23(2):232-47.
23. Monk TH, Buysse DJ, Reynolds CF, 3rd, Berga SL, Jarrett DB, Begley AE, et al. Circadian rhythms in human performance and mood under constant conditions. *J Sleep Res* 1997;6(1):9-18.
24. Monk TH, Weitzman ED, Fookson JE, Moline ML. Circadian rhythms in human performance efficiency under free-running conditions. *Chronobiologia* 1984;11(4):343-54.

25. Holloway FA, Wansley R. Multiphasic retention deficits at periodic intervals after passive-avoidance learning. *Science* 1973;180(82):208-10.
26. Davies JA, Navaratnam V, Redfern PH. A 24-hour rhythm in passive-avoidance behaviour in rats. *Psychopharmacologia* 1973;32(2):211-4.
27. Holloway FA, Wansley RA. Multiple retention deficits at periodic intervals after active and passive avoidance learning. *Behav Biol* 1973;9(1):1-14.
28. Wansley RA, Holloway FA. Multiple retention deficits following one-trial appetitive training. *Behav Biol* 1975;14(2):135-49.
29. Hoffmann HJ BD. Circadian differences in maze performance of C57BL/6 mice. *Behav Processes* 1992;27:77-84.
30. Stephan FK, Kovacevic NS. Multiple retention deficit in passive avoidance in rats is eliminated by suprachiasmatic lesions. *Behav Biol* 1978;22(4):456-62.
31. Fekete M, van Ree JM, Niesink RJ, de Wied D. Disrupting circadian rhythms in rats induces retrograde amnesia. *Physiol Behav* 1985;34(6):883-7.

32. Davies JA, Navaratnam V, Redfern PH. The effect of phase-shift on the passive avoidance response in rats and the modifying action of chlordiazepoxide. *Br J Pharmacol* 1974;51(3):447-51.
33. Tapp WN, Holloway FA. Phase shifting circadian rhythms produces retrograde amnesia. *Science* 1981;211(4486):1056-8.
34. Devan BD, Goad EH, Petri HL, Antoniadis EA, Hong NS, Ko CH, et al. Circadian phase-shifted rats show normal acquisition but impaired long-term retention of place information in the water task. *Neurobiol Learn Mem* 2001;75(1):51-62.
35. Reijmers LG, Leus IE, Burbach JP, Spruijt BM, van Ree JM. Social memory in the rat: circadian variation and effect of circadian rhythm disruption. *Physiol Behav* 2001;72(3):305-9.
36. Winget CM, DeRoshia CW, Markley CL, Holley DC. A review of human physiological and performance changes associated with desynchronization of biological rhythms. *Aviat Space Environ Med* 1984;55(12):1085-96.
37. Wright JE, Vogel JA, Sampson JB, Knapik JJ, Patton JF, Daniels WL. Effects of travel across time zones (jet-lag) on exercise capacity and performance. *Aviat Space Environ Med* 1983;54(2):132-7.

38. Cho K, Ennaceur A, Cole JC, Suh CK. Chronic jet lag produces cognitive deficits. *J Neurosci* 2000;20(6):RC66.
39. D'Alonzo GE, Krachman SL. Circadian rhythm sleep disorders. *J Am Osteopath Assoc* 2000;100(8 Suppl):S15-21.
40. Goichot B, Weibel L, Chapotot F, Gronfier C, Piquard F, Brandenberger G. Effect of the shift of the sleep-wake cycle on three robust endocrine markers of the circadian clock. *Am J Physiol* 1998;275(2 Pt 1):E243-8.
41. Larson J, Jessen RE, Uz T, Arslan AD, Kurtuncu M, Imbesi M, et al. Impaired hippocampal long-term potentiation in melatonin MT2 receptor-deficient mice. *Neurosci Lett* 2006;393(1):23-6.
42. Argyriou A, Prast H, Philippu A. Melatonin facilitates short-term memory. *Eur J Pharmacol* 1998;349(2-3):159-62.
43. Hoschl C, Hajek T. Hippocampal damage mediated by corticosteroids--a neuropsychiatric research challenge. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2001;251 Suppl 2:II81-8.
44. Kim JJ, Diamond DM. The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. *Nat Rev Neurosci* 2002;3(6):453-62.

45. El-Sherif Y, Tesoriero J, Hogan MV, Wieraszko A. Melatonin regulates neuronal plasticity in the hippocampus. *J Neurosci Res* 2003;72(4):454-60.
46. Thompson RF, Kim JJ. Memory systems in the brain and localization of a memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(24):13438-44.
47. Squire LR. Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. *Neurobiol Learn Mem* 2004;82(3):171-7.
48. Oliveira MG, Bueno OFA. Neuropsicologia da memória humana. *Psicologia USP, São Paulo*, v. 4, n. 1/2, p. 117-138, 1993.
49. Oliveira MG, Bueno OF, Pomarico AC, Gugliano EB. Strategies used by hippocampal- and caudate-putamen-lesioned rats in a learning task. *Neurobiol Learn Mem* 1997;68(1):32-41.
50. Kim JJ, Fanselow MS. Modality-specific retrograde amnesia of fear. *Science* 1992;256(5057):675-7.
51. Phillips RG, LeDoux JE. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav Neurosci* 1992;106(2):274-85.

52. Batuev AS, Sokolova LV. From physiological theory to psychological facts (celebrating the 100th anniversary of I. P. Pavlov's Madrid speech). *Neurosci Behav Physiol* 2004;34(7):711-20.
53. Blanchard DC, Blanchard RJ. Innate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions. *J Comp Physiol Psychol* 1972;81(2):281-90.
54. Bouton ME, Bolles RC. Conditioned fear assessed by freezing and by suppression of three different baselines. *Animal learning and behavior* 1980;8:429-434.
55. LeDoux JE. Emotional memory systems in the brain. *Behav Brain Res* 1993;58(1-2):69-79.
56. Izquierdo I, Medina JH. Role of the amygdala, hippocampus and entorhinal cortex in memory consolidation and expression. *Braz J Med Biol Res* 1993;26(6):573-89.
57. McGaugh JL. Time-dependent processes in memory storage. *Science* 1966;153(742):1351-8.

58. Izquierdo I. Different forms of post-training memory processing. *Behav Neural Biol* 1989;51(2):171-202.
59. Izquierdo I, Medina JH. Correlation between the pharmacology of long-term potentiation and the pharmacology of memory. *Neurobiol Learn Mem* 1995;63(1):19-32.
60. Izquierdo I, Medina JH. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem* 1997;68(3):285-316.
61. Igaz LM, Vianna MR, Medina JH, Izquierdo I. Two time periods of hippocampal mRNA synthesis are required for memory consolidation of fear-motivated learning. *J Neurosci* 2002;22(15):6781-9.
62. Fekete M, Van Ree JM, De Wied D. The ACTH-(4-9) analog ORG 2766 and desglycinamide9-(Arg8)-vasopressin reverse the retrograde amnesia induced by disrupting circadian rhythms in rats. *Peptides* 1986;7(4):563-8.
63. Overton DA. State-Dependent or "Dissociated" Learning Produced with Pentobarbital. *J Comp Physiol Psychol* 1964;57:3-12.

64. van Esseveldt KE, Lehman MN, Boer GJ. The suprachiasmatic nucleus and the circadian time-keeping system revisited. *Brain Res Brain Res Rev* 2000;33(1):34-77.
65. Watts AG, Swanson LW, Sanchez-Watts G. Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus: I. Studies using anterograde transport of Phaseolus vulgaris leucoagglutinin in the rat. *J Comp Neurol* 1987;258(2):204-29.
66. Quigg M. Circadian rhythms: interactions with seizures and epilepsy. *Epilepsy Res* 2000;42(1):43-55.
67. Cho K. Chronic 'jet lag' produces temporal lobe atrophy and spatial cognitive deficits. *Nat Neurosci* 2001;4(6):567-8.
68. Feng Z, Cheng Y, Zhang JT. Long-term effects of melatonin or 17 beta-estradiol on improving spatial memory performance in cognitively impaired, ovariectomized adult rats. *J Pineal Res* 2004;37(3):198-206.
69. Maheu FS, Collicutt P, Kornik R, Moszkowski R, Lupien SJ. The perfect time to be stressed: a differential modulation of human memory by stress applied in the morning or in the afternoon. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2005;29(8):1281-8.

70. Lupien SJ, Wilkinson CW, Briere S, Ng Ying Kin NM, Meaney MJ, Nair NP. Acute modulation of aged human memory by pharmacological manipulation of glucocorticoids. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87(8):3798-807.

ABSTRACT

Circadian rhythms are an important feature in physiology & behavior. It is known that disrupting circadian rhythms by phase-shifting illumination cycle can impair memory tasks in rats, such as passive avoidance behavior and the spatial version of the Morris water maze (both hippocampal-dependent tasks). The purpose of the present study was to verify if the phase-shifting produces deficits for hippocampal-dependent and independent tasks, pre-training or post-training. Different groups of male Wistar rats were trained on contextual fear conditioning (CFC) or tone fear conditioning (TFC) and tested 24 or 18 hours later [zeitgeber time-(hours from light onset)-ZT-8 and 2 respectively]. There were 2 types of phase-shifting illumination cycles, the pre-training (experimental group: lights on 01:00 -13:00, control group: lights on 07:00 - 19:00, n = 18, for each group, in the training day), and post-training (experimental group: lights on 01:00 - 13:00, control group: lights on 07:00 - 19:00, n = 18, for each group, the day after training).

Post-training phase-shifting impaired selectively contextual fear conditioning in both testing times (ZT 2 and 8). None of the tasks were affected by the pre-training manipulation. The result suggests that phase-shifting illumination cycle produces retrograde amnesia only for the hippocampal-dependent tasks.