Análise comportamental de ratos privados de sonos sujeitos a estressores luminosos e sonoros

Lucas Santos Alves<sup>1</sup>,

Thalyne Galvão<sup>2</sup>,

Jeferson Rodrigo Silva Santos<sup>3</sup>,

Laryssa Nascimento Tavares<sup>4</sup>,

Aucelia Cristina Soares de Belchior<sup>5</sup>

#### Resumo

Entende-se por privação parcial de sono a diminuição nas horas de sono de qualquer indivíduo, mantendo-se por algum período, na privação total ocorre a ausência do sono, já na privação seletiva, alguma fase do sono foi abolida. O estresse tem sido definido como uma reação com componentes físicos e psicológicos, causada por alterações psicofisiológicas que ocorrem quando a pessoa se confronta com uma situação que a irrite. A resposta ao estresse é consequência da influência mútua entre as distinções da pessoa e as demandas do meio. Portanto, estímulos estressores também podem causar distúrbios no ciclo sono-vigilia promovido pelo núcleo supraquiasmático. O presente artigo investiga, as alterações comportamentais de ratos em privação parcial de sono, tendo como comportamento principal o estresse, acarretando outros comportamentos que são intensificados devido a privação de sono. Utilizando de princípios específicos, tendo como base principal a análise do comportamento, ou seja, a observação participante. Trata-se de um estudo experimental e observacional, realizado no Laboratório e Núcleo de Pesquisa Experimental das Faculdades Integradas de Patos – NUPE/FIP. Foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG tendo como protocolo de autorização Nº 122/2016. O número da amostra foi de 07 ratos Wistar, do sexo masculino, oriundos do Biotério das FIP, em sua primeira situação laboratorial (sem experiências ou vivências). Durante a análise, foi possível observar o destaque de comportamentos que persistiram a acontecer a partir da primeira semana de observação, sendo estressados com som, luz, escuro, entre outros estímulos estressores, além da agitação que já era bastante notável, mas, outros comportamentos também aconteciam, como a realização de limpeza constantemente, andar ou ficar parado diante do estímulo estressor que estava acontecendo. Observou-se, portanto, que as alterações nos comportamentos dos sujeitos foram bastante notáveis, após dois meses de observações semanais, os dados foram explícitos e comprovados e de acordo com os resultados alcançados, foi possível notar a presença de ansiedade pelos comportamentos excessivos de limpeza. Contudo, foi de grande importância, deixando a possibilidade de estudos maiores a partir desses resultados obtidos, para um entendimento mais aprofundado.

Palavras-chave: Comportamento Animal; Privação de Sono; Ratos

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Graduando no curso de Bacharelado em Fisioterapia pelas FIP; E-mail: lucasalvescr@hotmail.com

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> Graduanda no curso de Bacharelado em Psicologia pelas FIP; E-mail: thalynechagas@gmail.com

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> Graduado no curso de Bacharelado em Fisioterapia pelas FIP; E-mail: rodrygojeferson@gmail.com

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup> Acadêmica de Medicina pelas FIP; E-mail: laryssa.tavares@live.com

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup> Doutora em Bioquímica e Fisiologia pela UFPE e Professora do curso de Bacharelado em Fisioterapia das FIP; E-mail: crisbelchior@hotmail.com

### Abstract

It is understood by partial sleep deprivation to the decrease in the sleep hours of any individual, while maintaining for some period, in total deprivation occurs the absence of sleep, already in selective deprivation, some phase of sleep has been abolished. Stress has been defined as a reaction with physical and psychological components, caused by psychophysiological alterations occurring when the person confronts a situation that irritates her. The response to stress is a consequence of mutual influence between the distinctions of the person and the demands of the middle. Therefore, stressors stimuli can also cause disturbances in the sleep cycle-vigilia promoted by the nucleus suprachiasmatic nucleus. This article investigates, behavioural changes of mice in partial sleep deprivation, having as the main behaviour of stress, causing other behaviors that are intensified due to sleep deprivation. Using specific principles, as the main basis for the analysis of behaviour, i.e. the participant observation. This is an experimental and observational study conducted at the Laboratory and Experimental research nucleus of the Faculdades Integradas de Patos - NUPE/FIP. It was approved by the Committee on Animal Research Ethics of the Federal University of Campina Grande – UFCG having as a protocol of authorization No. 122/2016. The sample number was 07 rats wistar rats, male, originating from Biotério das FIP, in its first laboratory situation (without experiences or experience). During the analysis, it was possible to observe the highlight of behaviors that persisted from the first week of observation, being stressed with sound, light, dark, among other stressors stimuli, besides the agitation that was already quite remarkable, but, others Behaviors also happened, such as cleaning constantly, walking or standing in front of the stressor stimulus that was happening. It was noted, therefore, that the changes in the behaviors of the subjects were quite remarkable, after two months of weekly observations, the data was explicit and proven and according to the results achieved, it was possible to notice the presence of anxiety by the Excessive cleaning behaviour. However, it was of great importance, leaving the possibility of larger studies from these results obtained, for a more thorough understanding.

Keywords: Animal behaviour; Sleep deprivation; Rats

# Introdução

O sono é uma condição vital e bastante complexa qualificado por artifícios ativos e altamente preparados, que pode ser dividido em dois tipos e em estágios: sono NREM (Non-Rapid Eye Movements) e sono REM (Rapid Eye Movements). O sono NREM é subdivido em quatro estágios, 1 a 4, de acordo com a profundidade do sono e a presença de marcadores eletrofisiológicos específicos, sendo os estágios 3 e 4 também chamados de sono delta ou de ondas lentas (SWS- slowwave sleep). (ANTUNES, et. al, 2008).

A descoberta do sono tipo REM acabou a importância intuitiva de que o sono seria apenas um estado de afastamento do cérebro para um descanso vago. O sono é um processo detonado e conservado por mecanismos complexos. As falhas neste mecanismo trazem distúrbios ou doenças do sono (RODRIGUES, 1998).

A retirada parcial ou eliminação do sono em um organismo é avaliada como privação de sono. De acordo com a história, conhecimentos sobre a privação de sono iniciou-se em 1894 com as experiências de De Manacéine, onde foi corroborado que, filhotes e cães adultos, morriam após determinados dias de privação de sono (ANTUNES, et. al, 2008).

Entende-se por privação parcial de sono a diminuição nas horas de sono de qualquer indivíduo, mantendo-se por algum período, na privação total ocorre a ausência do sono, já na privação seletiva, alguma fase do sono foi abolida. Consequentemente, essas determinadas privações causam graves lesões no sistema nervoso central e podem acarretar estímulos estressores. (DETTONI, 2008).

O estresse tem sido definido como uma reação com componentes físicos e psicológicos, causada por alterações psicofisiológicas que ocorrem quando a pessoa se confronta com uma situação que a irrite, amedronte, excite ou confunda, ou mesmo que a faça imensamente feliz. Em animais, o estresse pode ser provocado por privação de sono, que por sua vez, ativa o eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal, contudo, é necessário compreender o que o estresse causa no sono e qual a sua definição diante dos estímulos.

O termo estresse significa a condição acontecida a partir da percepção dos estímulos que geram inquietação emocional e, ao alterarem a homeostase desfecham um método de adequação qualificado, entre outras alterações, pelo acréscimo de secreção de adrenalina causando várias manifestações sistemáticas, com distúrbios fisiológicos e psicológicos. O termo estressor, portanto, define o evento ou estímulo que provoca ou conduz ao estresse. (MARGIS, et. al, 2003).

A resposta ao estresse é consequência da influência mútua entre as distinções da pessoa e as demandas do meio, ou seja, as oposições entre o meio externo e interno e a percepção do sujeito quanto a sua habilidade de resposta. Esta resposta ao estressor abrange aspectos cognitivos, comportamentais e fisiológicos (MARGIS, et. al, 2003).

Portanto, estímulos estressores também podem causar distúrbios no ciclo sono-vigília promovido pelo núcleo supraquiasmático, também chamado de ciclo circadiano, isso ocorre por um mecanismo neuroquímico que envolve acionamento e inibição do tronco encefálico e do córtex cerebral e é seguido por distintas funções biológicas do organismo. Este possui duração de aproximadamente 25 horas em humanos. (SANTOS, et. al, 2014).

Sendo assim, para evidenciar esse estudo, foi utilizado dos princípios da análise do comportamento, que se origina de uma atitude behaviorista adotada por Skinner por pretextos mais históricos que simplesmente lógicos. Skinner parte da comprovação de que há ordem e regularidade no comportamento. Um vago senso de ordem vem da simples observação mais cautelosa da conduta humana. Estamos todos continuamente avaliando situações e adivinhando o que os outros farão nessas situações, e nos comportamos de acordo com nossas previsões (TODOROV, 1982).

O presente artigo investiga, as alterações comportamentais de ratos em privação parcial de sono, tendo como comportamento principal o estresse, acarretando outros comportamentos que são intensificados devido a privação de sono. Utilizando de princípios específicos, tendo como base principal a análise do comportamento, ou seja, a observação participante.

### Materiais e Métodos

Trata-se de um estudo experimental e observacional, realizado no Laboratório e Núcleo de Pesquisa Experimental das Faculdades Integradas de Patos – NUPE/FIP. Foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG tendo como protocolo de autorização Nº 122/2016. O número da amostra foi de 07 ratos Wistar, do sexo masculino, oriundos do Biotério das FIP, em sua primeira situação laboratorial (sem experiências ou vivências) com sistema auditivo acurado e muita sensibilidade visual à luz, onde não enxergam cores, porém percebem as diferenças nas intensidades luminosas. Estes são animais noturnos, ou seja, possuem seu relógio biológico pré-programados para estarem ativos durante o período noturno e em repouso, durante o dia.

Os ratos começaram os experimentos com aproximadamente 3 meses de idade. As observações foram realizadas com a manutenção dos ratos nas caixas de condicionamento operante de Skinner do modelo CS 2000, que se encaixam no protocolo de privação de sono, durante o período matutino das 07:30 – 11:30, três vezes por semana, por um período de dois meses. A sala utilizava temperatura e luz artificial, sendo que a temperatura padrão durante o experimento foi de 22°C. Os animais foram distribuídos em caixas individuais, onde cada caixa operante era conectada a um equipamento que continha um cronômetro e que permitia diversas alterações fossem produzidas automaticamente ou manualmente (com a utilização de um "controle") esta também possui um reservatório de água que é acionado da mesma forma.

Os estímulos estressores que os ratos foram submetidos tratavam-se do estímulo luminoso e sonoro. Em relação ao estressor luminoso, as caixas tinham uma lâmpada, na porção superior do quadrado, que era acionada a cada 15 minutos. A quantificação da luz foi realizada por um aparelho, o *Luxímetro Modelo: INS-309*, onde este verificou que a luminosidade produzida na caixa operante foi de 30 luxes e no ambiente, de forma geral, 60 luxes. Em relação ao estímulo sonoro, foi utilizado uma caixa de som *SAMSUNG* no centro da sala, com medida sonora de 80 db. A medição foi realizada por um aparelho *Decibelímetro Digital INS-824*. As músicas eram tocadas de forma aleatória durante todas as quatro horas de privação de sono parcial. Para as observações serem qualificadas, utilizou-se folhetos onde continham informações sobre o comportamento natural destes animais, como: Andar, limpeza, farejar, necessidades fisiológicas, retração. Os dados coletados foram postos no Microsoft Office Excel para a obtenção dos gráficos e tabelas.

### Resultados e Discussão

Foram analisados comportamentos predominantes em ratos diante da privação parcial de sono. As observações foram realizadas de duas a três vezes por semana, utilizando uma folha de registro, usando os princípios da análise do comportamento, como linha de base para observá-los.

Na 1ª Observação verificou-se que os sujeitos estavam bastante quietos, realizando comportamentos como: coçar, ficar parado, esquivar-se, fazer necessidades fisiológicas, limpeza, morder e farejar.

Na 2ª Observação, os sujeitos apresentaram os seguintes comportamentos: ficar parado, necessidades fisiológicas, limpeza, ergue-se, coçar, comer, farejar, esquiva, retração. Antes das 10 horas da manhã estavam bastante agitados, depois das 10 horas apresentaram comportamentos mais calmos.

A 3ª Observação iniciou-se com a predominação dos seguintes comportamentos: Andar, farejar, limpeza, comer, beber água, erguer-se. Logo perto da finalização da observação, predominaram os seguintes comportamentos: Ficar parado, necessidades fisiológicas, limpeza, esquiva.

Durante a 4ª Observação verificou-se bastante agitação, predominando os comportamentos de Andar e erguer-se. Após as 10 horas da manhã, os comportamentos de limpeza e retração foram mais intensos e perceptíveis.

Na 5ª Observação houve predomínio dos seguintes comportamentos: andar, farejar, limpeza, erguer-se, beber água.

Na 6ª Observação os comportamentos predominantes foram: Andar, retração para o canto da caixa, limpeza, ficar parado por um terminado período de tempo, sem expressar reações.

Durante a 7ª Observação os comportamentos predominantes foram: Farejar, erguer-se, andar, comer, limpeza, retração para o canto da caixa, ficar parado.

Na 8ª Observação predominaram os comportamentos de andar, erguer-se, de limpeza constante, retração e de ficar parado no canto da caixa.

Durante o 1ª Mês de observação, os resultados encontrados puderam ser organizados em gráfico, como se pode observar abaixo.

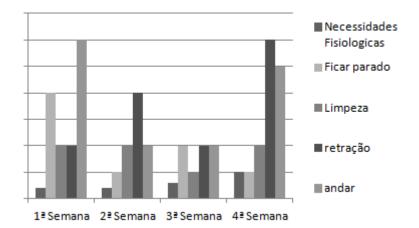


Gráfico 1. Primeiro mês de observação comportamental

Durante a análise, foi possível observar o destaque de comportamentos que persistiram em acontecer a partir da primeira semana de observação, sendo estressados com som, luz, escuro, entre outros estímulos estressores, além da agitação que já era bastante notável, porém, essa agitação persistia antes das dez horas da manhã, logo depois os sujeitos pareciam se "entregar" aos estímulos, consequentemente não realizavam respostas de "fuga", predominando o comportamento de retração, retraindo para o canto da caixa de Skinner, mas,

outros comportamentos também aconteciam, como a realização de limpeza constantemente, andar ou ficar parado diante do estímulo estressor que estava acontecendo.

No 2ª Mês de observação, pode-se construir o gráfico abaixo com os dados encontrados.

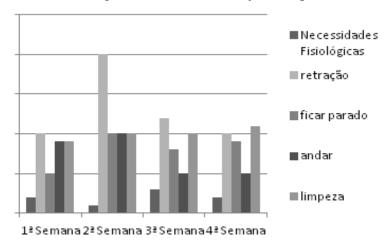


Gráfico 2. Segundo mês de observação comportamental.

Pode-se observar que comportamento de "limpeza" esteve progressivamente crescente no decorrer das semanas. A autolimpeza está diretamente ligada à ansiedade (MARRONI et al., 2007). Essas alterações comportamentais são resultantes de alterações da relação neurotransmissores e neuroreceptores, fato observado numa pesquisa realizada por Novati e colaboradores (2008), que teve o objetivo de estudar os efeitos da perda de sono em sistemas neurobiológicos e neuroendócrinos que foram implicados na fisiopatologia da depressão, particularmente o sistema serotonérgico e o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA).

Os pesquisadores utilizaram ratos adultos que foram expostos a um cronograma de privação crônica do sono parcial, o que lhes permitiu apenas 4 h de sono por dia num período de 7 dias. A restrição do sono foi obtida colocando os animais em tambores que giravam lentamente. Para examinar a regulação e reatividade do eixo HPA, foram coletadas amostras de sangue para medir respostas de adrenocorticotropina (ACTH) e corticosterona (CORT).

Após os testes, chegaram à conclusão de que a restrição crônica do sono pode levar a mudanças nos sistemas de receptores de neurotransmissores e na reatividade neuroendócrina de maneira similar à observada na depressão. Suportando, portanto, a hipótese de que o sono interrompido e restringido possa contribuir para a sintomatologia de distúrbios psiquiátricos.

Para que haja bem-estar dos animais, é necessário que haja homeostase, que significa que o animal está em harmonia com seu ambiente interno (temperatura, conteúdo hídrico etc.) e externo (som, temperatura ambiente etc.). Quando essa harmonia não pode ser mantida, pode ocorrer desconforto ou estresse, com possíveis alterações comportamentais e/ou doenças (BAUMANS, 2006; RIVERA, 2010).

São adaptáveis em ambientes com ruídos contínuos, mas os ruídos de longa duração e alta intensidade ou agudos são fatores estressores aos roedores, causando estresse, alterações metabólicas, redução da fertilidade, canibalismo e danos ao aparelho auditivo, afetando também a comunicação entre os animais (ANDERSEN et. al 2004; RIVERA, 2010).

A luz, dependendo da intensidade e constância sob os ratos pode afetar a fisiologia, a morfologia e o comportamento do animal. A exposição à luz por período excessivo torna-se um fator estressante pode afetar também o comportamento reprodutivo dos animais e a ingestão de alimentos (NEVES et. al., 2013).

Em um estudo realizado por Pedroso e colaboradores (2009), com o objetivo de avaliar as respostas comportamentais de ratos privados de sono durante 72 horas, onde os testes realizados foram: teste de Habituação em Campo Aberto (atividade motora) e Teste de Reconhecimento (resposta cognitiva). Os mesmos foram divididos em dois grupos: i) grupo controle (n=15), ii) ratos privados do sono paradoxal durante 72 horas (n=15).

Ao final do experimento pode-se observar que a privação do sono paradoxal durante 72 horas consecutivas apresentou os seguintes resultados: diminuição da atividade motora; a atividade exploratória dos ratos do grupo ii apresentou resposta significativa quando comparados com o grupo controle; nos ratos privados do sono resposta de habituação foi maior; a memória de longa duração foi afetada nos ratos do grupo ii; a frequência da autolimpeza foi mais frequente nos ratos privados do sono paradoxal. Corroborando com os resultados obtidos nessa pesquisa.

# **Considerações Finais**

Observou-se, portanto, que as alterações nos comportamentos dos sujeitos foram bastante notáveis, após dois meses de observações semanais, os dados foram explícitos e comprovados e de acordo com os resultados alcançados, foi possível notar a presença de

ansiedade pelos comportamentos excessivos de limpeza, e também a "entrega" aos estímulos após determinado horário (depois das 10 horas da manhã).

Indicando a presença significativa da alteração dos comportamentos e também nos sistemas receptores de neurotransmissores, pois o sono não é uma condição que ocorre de forma passiva, sendo gerado por regiões especificas do cérebro, afetando não só a parte física, mas também a psicológica.

Sempre respeitando os procedimentos éticos da pesquisa, esse estudo foi desenvolvido buscando engrandecer a literatura acerca deste assunto, compreendendo um pouco mais a respeito da privação de sono e estímulos estressores. Contudo, foi de grande importância, deixando a possibilidade de estudos maiores a partir desses resultados obtidos, para um entendimento mais aprofundado sobre o tema.

#### Referências

Andersen ML, D'Almeida V, Ko GM, Kawakami R, Martins PJF. **Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação.** São Paulo: UNIFESP — Universidade Federal de São Paulo; 2004. 166p.

ANTUNES, Hanna Karen Moreira et al. Privação de sono e exercício físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, 2008.

BAUMANS V. The laboratory mouse. In: Poole T. The UFAW handbook on the care and management of laboratory animals. 7th ed. British: Blackwell Science; 2006. v.1, p. 282-312. CARDOSO, Lucas. Transtornos do ciclo sono-vigília/circadiano-uma revisão de literatura. 2014.

DETTONI, Josilene Lopes. **Efeitos da privação parcial do sono no endotélio venoso e no controle autonômico em voluntários saudáveis**. 2008. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

MARGIS, Regina et al. Relação entre estressores, estresse e ansiedade. **Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul**, v. 25, n. 1, p. 65-74, 2003.

MARRONI, S.S.; NAKANO, F.N.; GATI, C.D.; OLIVEIRA, J.A.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; GARCIA-CAIRASCO, N. Neuroanatomical and cellular substrates of

hypergrooming induced by microinjection of oxytocin in central nucleus of amygdala, an experimental model of compulsive behavior. **Mol Psychiatry**. 2007 May 15.

MARTINS, Paulo José Forcina; MELLO, Marco Túlio de; TUFIK, Sergio. Exercício e sono. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 7, n. 1, p. 28-36, 2001.

NEVES, Silvânia M. P. Manual de cuidados e procedimentos com animais de laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP / Silvânia M. P. Neves [et al.]. -- São Paulo: FCF-IQ/USP, 2013.

NOVATI, Arianna et al. Physiological effects of sleeP restriction in rats. **University Of Groningen,** Heren, Holanda, v. 31, n. 11, p.1579-185, ago. 2008.

OLIVEIRA, Marília Capuço et al. Estresse pós-privação de sono: análises morfométricas do fígado. **ABCS Health Sciences**, v. 38, n. 2, 2013.

PEDROSO, Lenemar Nascimento et al. Alterações comportamentais de ratos privados de sono paradoxal (PSP). **X Salão de Iniciação Científica – Pucrs,** Porto Alegre, p.1823-1829, set. 2009.

RIVERA EAB. Bem-estar na experimentação animal. In: Feijó AGS, Braga LMGM, Pitrez PMC. Animais na pesquisa e no ensino: aspectos éticos e técnicos. Porto Alegre: EdiPUCRS; 2010. p. 74-88.

TODOROV, João Cláudio. Behaviorismo e análise experimental do comportamento. 1982.