

Efeitos do Estresse Crônico Moderado sobre o Desempenho de Ratos *Wistar* em Tarefas de Aprendizagem

Vitor Pansarim
Andréia Schmidt

RESUMO

As pesquisas sobre o efeito do estresse crônico moderado (CMS) sobre a aprendizagem de não humanos apresentam resultados contraditórios. Este estudo investigou os efeitos do CMS sobre o desempenho de ratos em duas tarefas de aprendizagem: uma discriminação visual simultânea e uma aprendizagem espacial em labirinto aquático. Oito ratos *Wistar* machos foram divididos em grupo experimental (GE, exposto ao CMS) e grupo controle (GC). Após exposição do GE ao protocolo de CMS por três semanas, ambos os grupos passaram por uma tarefa de discriminação visual e pela tarefa de aprendizagem espacial no labirinto aquático de Morris (MWM), além de testes de preferência por solução de sacarose. O GE continuou sendo exposto ao CMS durante a tarefa de discriminação visual. Os resultados sugerem que o CMS pode ter reduzido o ganho de peso e dificultado a aprendizagem de discriminação visual do GE, sem alterações na preferência por sacarose e no MWM. De acordo com os resultados do presente estudo e da literatura em geral, os efeitos do CMS sobre a aprendizagem podem depender de sua duração e da complexidade da tarefa.

Palavras-chave: estresse crônico moderado, discriminação visual, labirinto aquático, ratos, aprendizagem.

ABSTRACT

Effects of Chronic Mild Stress on Performance of *Wistar* Rats in Learning Tasks

Researches on the effect of chronic mild stress (CMS) on non-human learning present contradictory results. This study investigated the effects of CMS on rats' performance in two learning tasks: a simultaneous visual discrimination and a spatial learning task in a water maze. Eight *Wistar* rats were divided into experimental group (GE, exposed to CMS) and control group (GC). After the GE group had been submitted to the CMS protocol for three weeks, both groups were exposed to a visual discrimination task and spatial learning task in the Morris Water Maze (MWM), in addition to preference tests for a sucrose solution. GE continued to be exposed to CMS for visual discrimination task. Results suggested that CMS may reduce weight gain and make the visual discrimination learning more difficult for the GE, without changes on the sucrose preference and MWM. According to the results of the present study and the literature in general, the effects of CMS on learning may depend on the duration and complexity of the task.

Keywords: chronic mild stress, visual discrimination, water maze, rats, learning.

O modelo de estresse crônico moderado (*Chronic Mild Stress* – CMS) foi descrito por Willner, Towell, Sampson, Sophokleous e Muscat (1987) e consiste na exposição de organismos a uma série de estressores de intensidade moderada que se alternam ao longo dos dias pelo período de algumas semanas. Esses pesquisadores observaram que a exposição aos estressores por três semanas teve como consequência a diminuição na preferência por soluções doces (solução de 1% de sacarose), em comparação à água, o que foi relacionado com a anedonia (perda de preferência por estímulos normalmente reforçadores), uma das características centrais da chamada depressão. Em função disso, o CMS tem sido referido como um modelo animal para estudo da depressão.

Sobre os Autores

V.P.
orcid.org/0000-0001-7312-6251
Universidade de São Paulo
(USP) - Ribeirão Preto, SP
vitorpansa@gmail.com

A.S.
orcid.org/0000-0002-8836-6618
Universidade de São Paulo
(USP) - Ribeirão Preto, SP
aschmidt@ffclrp.usp.br

Direitos Autorais

Este é um artigo de acesso aberto e pode ser reproduzido livremente, distribuído, transmitido ou modificado, por qualquer pessoa desde que usado sem fins comerciais. O trabalho é disponibilizado sob a licença Creative Commons CC-BY-NC.



Embora muitos estudos sobre CMS realizem apenas testes de preferência por solução adocicada como medida dos efeitos da exposição ao protocolo de CMS, os efeitos do CMS também têm sido estudados em relação a outras medidas, como o desempenho em tarefas de aprendizagem. Bessa et al. (2009) observaram que ratos expostos ao CMS por seis semanas tiveram um desempenho pior do que o do grupo controle em uma tarefa de aprendizagem espacial reversa no labirinto aquático de Morris (*Morris Water Maze* – MWM). Da mesma forma, Bian et al. (2012) observaram que camundongos expostos ao CMS por 40 dias tiveram um pior desempenho no MWM que o grupo controle. Riaz et al. (2015), por sua vez, observaram que ratos expostos ao CMS por 35 dias apresentaram um desempenho pior do que o dos animais controle em uma tarefa de aprendizagem espacial no labirinto radial, mesmo sem queda na preferência por solução de 3% de sacarose. Outros estudos, por outro lado, observaram que o CMS pode melhorar a aprendizagem espacial. Gouirand e Matuszewich (2005), por exemplo, observaram que a exposição ao CMS, por dez dias, melhorou o desempenho de ratos no MWM em relação ao grupo controle, também sem a ocorrência de queda na preferência por solução de 2% de sacarose.

Os efeitos do CMS sobre o desempenho de ratos no MWM podem ainda variar em função de diferentes fatores. Em um estudo de revisão, Conrad (2010) descreve que o CMS pode provocar diferentes efeitos no desempenho de ratos no MWM a depender da severidade dos estressores e da duração do período de exposição ao protocolo de CMS. Uma possibilidade seria a de que quanto mais severos os estressores do protocolo de CMS e maior for a sua duração, o efeito tenderia a ser negativo (piora no desempenho), enquanto que diante de estressores menos severos e de duração menor, o efeito tenderia a ser positivo (melhora no desempenho).

Um número menor de estudos tem investigado os efeitos do CMS em tarefas que envolvem aprendizagem discriminativa. Rocha (2013), por exemplo, observou que ratos expostos a um protocolo de CMS com duração de seis semanas tiveram um atraso na aprendizagem de uma tarefa de discriminação simples, necessitando, em média, do dobro de sessões para atingir o critério de aprendizagem em relação a ratos que não foram expostos ao protocolo de CMS. Em outro experimento, Fonseca Jr., Castelli e Oliveira (2015) não encontraram nenhum efeito de um protocolo de CMS com duração de 43 dias sobre o desempenho de ratos em uma tarefa de aprendizagem de discriminação sucessiva envolvendo estímulos luminosos. Não foi encontrada queda na preferência por solução de sacarose em ambos os estudos.

Verifica-se, portanto, que não há consenso da literatura sobre os efeitos do CMS sobre a aprendizagem, mostrando que o estresse pode produzir tanto efeitos positivos como negativos. É importante levar em consideração, porém, que os estudos aqui relatados utilizaram variados tipos de tarefas (tarefas de aprendizagem espacial e aprendizagem discriminativa), que exigiam diferentes tipos de desempenho dos sujeitos. O MWM, por exemplo, envolve a fuga de um ambiente aversivo (a água), enquanto tarefas discriminativas, por sua vez, envolvem um número maior de sessões de treino, com diferentes graus de dificuldade, a depender do tipo de S+ e S- envolvidos. Além disso, essas tarefas envolvem reforçadores positivos primários (água ou alimento). Todas essas variáveis podem ter interferência no desempenho dos animais, para além dos estressores em si, favorecendo ou obscurecendo os efeitos de protocolos de CMS.

O objetivo desta pesquisa foi investigar o efeito da exposição crônica de ratos *Wistar* a estressores moderados e imprevisíveis sobre o seu desempenho em uma tarefa de discriminação de estímulos visuais e em uma tarefa de aprendizagem espacial no MWM. Além disso, também teve como objetivo verificar se o protocolo de CMS produziria o efeito de anedonia.

MÉTODO

SUJEITOS

Foram utilizados dez ratos *Wistar* (*Rattus norvegicus*) machos, mantidos individualmente em gaiolas de polipropileno (41 x 34 cm), em biotérios climatizados (de 20° C a 24° C), 12h de ciclo claro/escuro (luzes acesas das 6h às 18h), exaustão de 4200m³/h e umidade relativa do ar controlada (mínima 45% e máxima 55%).

Os animais foram recepcionados do Biotério Central da USP-Ribeirão Preto com 60 dias de idade e foram divididos aleatoriamente em grupo experimental (GE) e grupo controle (GC) (cinco ratos em cada) e alojados em biotérios distintos. Os animais tinham livre acesso à água e alimentação (ração comercial comum para roedores). Os sujeitos eram experimentalmente ingênuos quando iniciaram o experimento (80 dias de idade) e passaram a ser privados de água e comida por 23 horas antes dos testes semanais de preferência por solução de sacarose. Os sujeitos do GE foram expostos ao protocolo de estresse crônico moderado, o qual incluía períodos de privação de água e comida. As sessões de aprendizagem e os testes de preferência por sacarose ocorreram no período da tarde, dentro do ciclo claro dos animais.

Com o início da tarefa de discriminação visual, ao atingirem 105 dias de idade, os sujeitos passaram por um procedimento semanal de restrição de água, com disponibilidade de 30 ml após as sessões de discriminação. O peso dos animais foi monitorado e mantido em uma faixa de 85% de seu peso *ad libitum* por meio da diminuição ou do aumento da disponibilidade de água diariamente, sendo 15 ml o valor diário mínimo.

Dois sujeitos não completaram o experimento e foram excluídos da análise de dados: um deles não aprendeu a resposta necessária para a realização da tarefa de discriminação na sessão de treino ao bebedouro (descrita na seção de procedimentos) e o outro apresentou labirintite. Dessa forma, a amostra analisada é composta por oito

sujeitos, quatro de cada grupo. O presente estudo foi realizado de acordo com as resoluções brasileiras de ética em experimentação com animais, sendo aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP (protocolo nº 16.5.680.59.6).

EQUIPAMENTOS E ESTÍMULOS

Foram utilizadas duas caixas de condicionamento operante (setor central medindo 32,6 x 34,5 x 21 cm), produzidas pela *Insight Equipamentos Científicos Ltda.*, Ribeirão Preto, Brasil. A descrição detalhada da caixa pode ser verificada em Souza e Schmidt (2014) e visualizada na Figura 1.

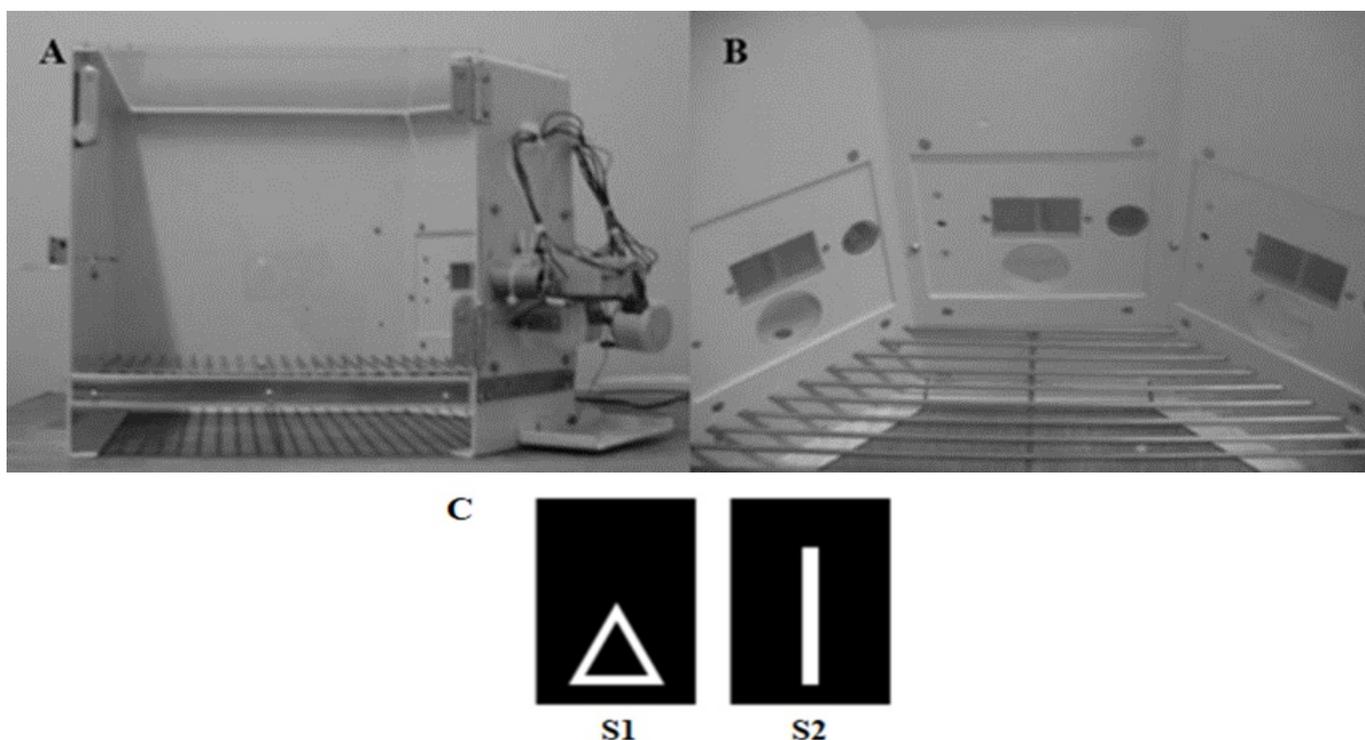


Figura 1. Caixa operante, desenvolvida por Luiz M. de Oliveira e produzida pela Insight Equipamentos Científicos Ltda. A parte externa é apresentada em A e a parte interna em B, contendo três painéis com duas janelas cada e três túneis com acesso ao bebedouro na parte inferior de cada painel, onde o animal poderia focinhar. Em C, os estímulos visuais utilizados na tarefa de discriminação visual (S1 – Triângulo; S2 – Linha).

A resposta operante mensurada na caixa era a de focinhar, que poderia ser emitida em três diferentes túneis circulares com 3 cm de diâmetro e 5 cm de profundidade, localizados na parte inferior de cada painel, 2,2 cm acima do piso. Cada túnel tinha um sensor fotoelétrico de movimento que registrava respostas de focinhar. Um bebedouro (orifício com 0,7 cm de diâmetro) estava localizado em cada túnel a 0,3 cm de profundidade da abertura. Uma pequena concha

metálica coletava uma gota de água de um reservatório externo quando o bebedouro era ativado. Quando o bebedouro era desativado, a concha metálica retornava ao reservatório. A apresentação dos estímulos visuais, os sensores e os bebedouros era controlados por um microcomputador e uma interface *Intercom2000* (*Insight Equipamentos Científicos Ltda.*) de 64 canais de entrada e 64 canais de saída. A programação dos experimentos e o

registro dos dados eram realizados por meio de um software de controle elaborado em *Visual Basic*.

Foram utilizados dois estímulos visuais nas sessões de discriminação visual simultânea, os quais eram projetados nas janelas de cada painel, acima dos túneis. Os estímulos eram feitos em lâminas plásticas com fundo preto (2 x 3 cm). No centro dos cartões havia uma figura geométrica branca translúcida (S1 e S2 da Figura 1). A figura geométrica era iluminada (50 a 125 lux) quando uma lâmpada LED acendia automaticamente na janela onde o estímulo com a figura estava inserido. Em cada painel, os estímulos S1 e S2 eram colocados nas janelas, sendo posicionados na mesma janela para os três painéis, mas apenas um era acionado a cada tentativa. Os painéis eram compostos por uma tela acrílica transparente.

As sessões experimentais de aprendizagem espacial foram conduzidas no labirinto aquático de Morris (MWM – Morris, 1981), que consiste em um tanque circular de fibra de vidro, com 150 cm de diâmetro e 40 cm de altura, com uma plataforma quadrada de aço inoxidável, com dimensões de 15 x 15 cm de largura e 28,5 cm de altura. O tanque foi

preenchido com água (temperatura de 25° C) até que o nível ultrapassasse 2 cm da altura da plataforma. O fundo do tanque era pintado de preto, o que impedia a visualização da plataforma, que era também pintada de preto. Sobre o tanque havia uma câmera de vídeo que registrou o desempenho dos animais durante as sessões. O tanque foi dividido em quatro quadrantes imaginários para o experimento.

Protocolo de estressores

O protocolo teve duração de três semanas e foi composto por períodos de privação de água e comida, alojamento compartilhado (cinco ratos na mesma caixa viveiro), inclinação da gaiola (30°), gaiola úmida (100 ml de água na maravalha das gaiolas), diminuição da temperatura (mínimo de 10° C), objeto estranho na gaiola (garrafa de vidro vazia com a qual os animais não tinham contato prévio), luz contínua e bebedouro sem água. Os estressores se alternavam ao longo do dia, de tal forma que havia sempre ao menos um dos estressores em vigor. A Tabela 1 descreve detalhadamente a distribuição e a duração dos estressores do protocolo de CMS.

Tabela 1. *Distribuição e Duração dos Estressores ao Longo do Dia e das Semanas do Protocolo de CMS.*

Horário	Domingo	Segunda	Terça	Quarta	Quinta	Sexta	Sábado
00:00 até 06:00	1	1	2 + 5	1 + 4 + 8	1 + 2	4 + 6	5
06:00	1	1	2 + 5	1 + 8	1 + 2	6	5
07:00	1	1	2 + 5	1 + 8	1 + 2	6	5
08:00	1	1 + 9	2 + 5	1 + 8	1 + 2	6	5
09:00	1	5	2 + 5	1 + 8	1 + 2	3	5
10:00	1	5	2 + 3	1 + 8	1 + 2	3	5
11:00	1	5	2 + 3	1 + 8	1 + 2	3	5
12:00	1	5	2 + 3	8	2	3	5
13:00	1	5	2 + 3	1 + 2	2	3	1
14:00	1	5	2 + 3	1 + 2	2	3	1
15:00	1	5	2 + 3	1 + 2	2	3	1
16:00	1	2 + 5	2 + 3	1 + 2	6	5	1
16:30*	1	2 + 5 + 7	2 + 3	1 + 2	6	5 + 7	1
17:00	1	2 + 5	1 + 8	1 + 2	6	5	1
18:00 até 00:00	1	2 + 5	1 + 4 + 8	1 + 2	4 + 6	5	1

Nota. 1, privação de água; 2, privação de comida; 3, gaiola inclinada; 4, luz contínua; 5, gaiola compartilhada; 6, gaiola suja; 7, diminuição de temperatura; 8, objeto estranho; 9, bebedouro sem água.

O protocolo de CMS foi alterado na fase de discriminação visual, do qual foi retirada a privação de água e a privação de comida (exceto antes dos testes de preferência a cada duas semanas nessa fase), uma vez que os animais já estavam passando por um procedimento de restrição hídrica. O novo protocolo teve duração de 8 semanas, totalizando 11 semanas de CMS, sendo encerrado antes do teste de aprendizagem espacial no MWM.

PROCEDIMENTOS

O experimento teve início para ambos os grupos com a linha de base de preferência por solução de sacarose, na qual dois bebedouros foram acoplados às gaiolas-viveiros por 48h, sendo que um deles continha água e o outro uma solução de 1% de sacarose. A medida de linha de base foi tomada uma única vez (exposição dos animais aos dois bebedouros por 48 horas consecutivas). A posição dos bebedouros com água

e com solução de sacarose foi contrabalanceada entre os sujeitos. O peso dos bebedouros foi medido no início e no fim do procedimento.

Após 24h do fim da linha de base de preferência por solução de sacarose, os sujeitos do grupo experimental foram expostos ao primeiro protocolo de CMS por três semanas. Os sujeitos do grupo controle passaram as mesmas três semanas sem serem expostos ao CMS, alojados sob as mesmas condições anteriores. Nesse período, ambos os grupos passaram por testes semanais de preferência por solução de sacarose semanais, nos quais os bebedouros com água e com solução de 1% de sacarose eram acoplados nas gaiolas dos sujeitos por 1h. A posição dos bebedouros com água e com solução de sacarose foi contrabalanceada entre os sujeitos e mudava de posição de teste para teste. Antes dos testes de preferência por solução de sacarose, os sujeitos eram privados de água e comida por 23h.

Com o término das primeiras três semanas de CMS, os sujeitos do grupo controle e experimental passaram pelo procedimento de discriminação visual simultânea e por testes de preferência por solução de sacarose a cada duas semanas. Os sujeitos do grupo experimental continuaram sendo expostos, durante essa fase, a um segundo protocolo de CMS, com os mesmos estressores utilizados no primeiro protocolo, exceto a privação de água e a privação de comida (ocorrendo, apenas, antes dos testes de preferência a cada duas semanas por 23h).

Para o procedimento de discriminação visual, os sujeitos passaram, inicialmente, por uma sessão de treino da resposta de focinhar com 99 tentativas. A cada tentativa, apenas um túnel, selecionado aleatoriamente, acionava o bebedouro automaticamente com a resposta de focinhar, disponibilizando 3s de acesso à água. Os três túneis tinham a mesma probabilidade de ativar o bebedouro em cada tentativa, de modo que os sujeitos tiveram que distribuir a resposta de focinhar entre os túneis ao longo das tentativas. A tentativa era encerrada quando o bebedouro era acionado automaticamente pela resposta de focinhar no túnel correto, sendo seguida de um intervalo entre tentativas (IET) de 10s, durante os quais nenhuma consequência era apresentada à resposta de focinhar em qualquer túnel. Nenhuma janela era iluminada nas tentativas de treino, de modo que não havia nenhum estímulo visual associado ao túnel correto. A primeira resposta de focinhar foi reforçada para todos os sujeitos nessa sessão, independentemente do túnel em que ocorresse.

As sessões de ensino de discriminação de estímulos visuais foram iniciadas logo após o término da sessão de treino ao bebedouro. Cada sessão de ensino era composta de

99 tentativas. Cada tentativa era iniciada pela apresentação simultânea de dois estímulos visuais sobre dois dos três túneis – iluminação de uma figura de triângulo e de uma linha - e encerradas pela resposta de focinhar em um dos três túneis. As duas figuras iluminadas eram apresentadas nos painéis localizados acima de túneis distintos, de modo que o sujeito deveria escolher entre focinhar no túnel com o triângulo iluminado, no túnel com a linha iluminada ou no túnel com nenhuma figura geométrica iluminada. A apresentação das figuras foi balanceada em cada sessão, em relação aos túneis que apresentariam os estímulos e em relação à posição de S+ e S- em cada tentativa.

O triângulo foi estímulo discriminativo (S+) para metade dos sujeitos e a linha S+ para a outra metade. Os estímulos foram balanceados entre os grupos (experimental e controle). Quando o sujeito emitia a resposta de focinhar no túnel com o S+, era liberado o acesso ao bebedouro do respectivo túnel durante 3s, seguindo-se um IET de 10s, no qual nenhuma figura era iluminada e nenhuma resposta de focinhar era consequenciada. Quando o sujeito emitia a resposta de focinhar no túnel cujo estímulo era o S-, ou no túnel sem estímulos iluminados, não havia acesso ao bebedouro, as figuras eram apagadas e o IET era iniciado, encerrando a tentativa.

Foram registradas a porcentagem de acertos de cada sessão como medida de aprendizagem e a frequência de respostas no IET. O critério de encerramento dessa fase foi de 80% de acertos nas tentativas em três sessões consecutivas, ou 38 sessões.

Após a fase de ensino de discriminação visual, os sujeitos de ambos os grupos passaram pela tarefa de aprendizagem espacial no MWM, sendo encerrado o protocolo de estresse imediatamente após a última sessão de discriminação visual. Antes da primeira sessão, o sujeito era colocado sobre a plataforma do labirinto por 60s. Em seguida, em cada tentativa da sessão, o sujeito era colocado com sua parte posterior virada para o centro do tanque em um dos três quadrantes imaginários onde não havia a plataforma de escape (Quadrantes 2, 3 e 4), definidos aleatoriamente em igual proporção. Os sujeitos nadavam por um tempo limite de 60s durante o qual deveriam escapar pela plataforma. Se o animal não encontrasse a plataforma dentro do intervalo de 60s, era removido da água e colocado sobre a plataforma. Doze tentativas foram conduzidas em cada sessão, totalizando duas sessões em dois dias consecutivos (24 tentativas). A plataforma sempre foi mantida no mesmo quadrante durante as 24 tentativas (Quadrante 1). Tentativas de uma mesma sessão foram separadas por um período de 35s (IET), durante os quais o sujeito era mantido sobre a plataforma.

ANÁLISE DOS DADOS

A análise estatística de todas as comparações entre grupos foi feita por meio da ANOVA, com intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$). Para procedimentos com duas ou mais sessões, foi utilizada a ANOVA para medidas repetidas. Para procedimentos com apenas uma sessão, foi utilizada a ANOVA de uma via. Para verificar diferenças específicas dentro da ANOVA para medidas repetidas, foi feito *post hoc* por meio do teste *Turkey HSD*. O tamanho do efeito (η^2 quadrado parcial; n^2p) foi calculado para cada comparação de resultados posterior ao início do protocolo de CMS, classificando-se como elevado ($n^2p > 0,25$), médio ($0,05 < n^2p \leq 0,25$) e pequeno ($n^2p \leq 0,05$). O programa utilizado para a análise estatística foi o *Statistica 13*.

Para a análise da tarefa de discriminação visual, foram comparadas as porcentagens de acerto e as frequências de respostas no IET entre os grupos. Na análise da tarefa no MWM, foram comparadas as latências de escape entre os grupos. O peso foi analisado a partir da comparação do ganho de peso nas três primeiras semanas de CMS entre grupos, enquanto a preferência por solução de sacarose foi analisada pela comparação da porcentagem de preferência entre os grupos, calculada a partir da seguinte fórmula:

$$\% \text{ Preferência} = (\text{Consumo da solução de sacarose} / \text{Consumo total}) \times 100$$

RESULTADOS

Não houve diferença significativa entre o ganho de peso do grupo experimental ($M = 14,75 \text{ gm}$; $DP = 16,58$) e do grupo controle ($M = 18,50 \text{ gm}$; $DP = 15,95$) na semana anterior ao início do CMS [$F(1, 6) = 0,106$; $p = 0,755$]. No entanto, o ganho de peso acumulado no final das três primeiras semanas de CMS, em comparação ao início do CMS (Figura 2 - A), revela uma diferença significativa e um tamanho de efeito elevado entre as semanas [$F(2, 12) = 57,285$; $p < 0,001$; $n^2p = 0,905$], entre os grupos [$F(1, 6) = 24,820$; $p = 0,002$; $n^2p = 0,805$] e na relação entre semanas e grupos [$F(2, 12) = 4,233$; $p = 0,041$; $n^2p = 0,414$]. O grupo experimental teve um menor ganho de peso em uma semana ($p = 0,043$), em duas semanas ($p = 0,009$) e em três semanas de CMS ($p = 0,01$).

Em uma semana de CMS, os sujeitos do grupo experimental perderam peso, enquanto os animais do grupo controle ganharam. Ao longo das semanas, a curva acumulada mostra que os sujeitos dos dois grupos ganharam peso à medida que o CMS prosseguia.

A análise da linha de base de preferência por solução de sacarose do grupo controle ($M = 86,04\%$; $DP = 10,00$) e do grupo experimental ($M = 80,67\%$; $DP = 14,80$) não revela

nenhuma diferença significativa entre os grupos [$F(1, 6) = 0,362$; $p = 0,569$]. Da mesma forma, para os sete testes de preferência conduzidos ao longo da aplicação do CMS (Figura 2B), não foram verificadas diferenças significativas entre testes [$F(6, 36) = 1,714$; $p = 0,146$; $n^2p = 0,222$], com tamanho médio de efeito, entre os grupos [$F(1, 6) = 0,167$; $p = 0,697$; $n^2p = 0,027$], com tamanho de efeito pequeno, e entre a relação entre grupos e testes [$F(6, 36) = 1,015$; $p = 0,431$; $n^2p = 0,145$], com tamanho médio de efeito.

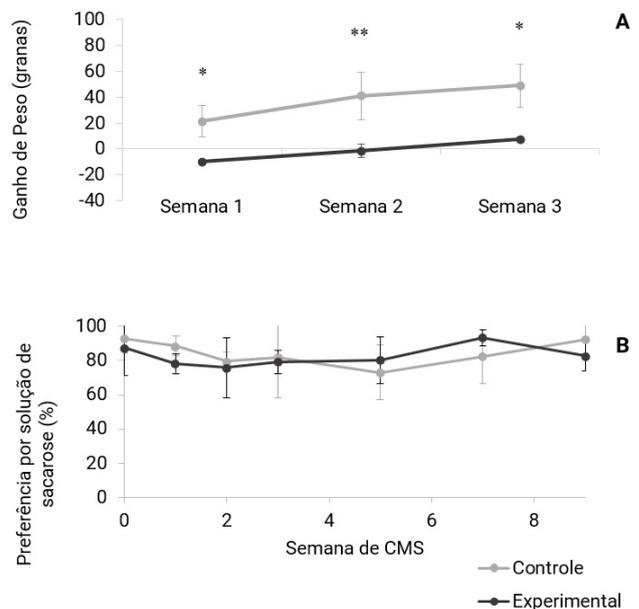


Figura 2. Média e desvio padrão do ganho de peso (em gramas) acumulado no final das três primeiras semanas do primeiro protocolo de CMS em relação ao primeiro dia de CMS (Painel A), e média e desvio padrão das preferências por solução de 1% de sacarose (em porcentagem) nas diferentes semanas de CMS nas quais o teste de preferência foi aplicado (Painel B). Dados do grupo experimental em cinza escuro e do grupo controle em cinza claro. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

O desempenho dos sujeitos ao longo da tarefa de discriminação visual é apresentado na Figura 3A. São apresentadas as porcentagens médias de acertos dos grupos em blocos de cinco sessões (exceto na Semana 8, que agrupa os dados de três sessões). Foi verificada uma diferença significativa dos acertos, com um tamanho de efeito elevado, entre as semanas da tarefa de discriminação visual [$F(7, 42) = 15,382$; $p < 0,001$; $n^2p = 0,719$] e na relação entre grupos e semanas [$F(7, 42) = 2,379$; $p = 0,038$; $n^2p = 0,284$], mas não entre grupos [$F(1, 6) = 1,975$; $p = 0,209$; $n^2p = 0,248$], com um tamanho médio de efeito, tendendo a elevado. Não foram verificadas diferenças específicas entre grupos em todas as semanas da tarefa, entretanto, verificou-se que o grupo controle apresentou uma porcentagem de acertos maior do que na primeira semana, nas Semanas 4, 5, 6, 7 e 8 ($p < 0,001$ para todas as semanas mencionadas), enquanto o grupo experimental apresentou uma

porcentagem de acertos maior do que na primeira semana apenas na Semana 6 ($p = 0,03$), o que não se manteve nas Semanas 7 ($p = 0,189$) e 8 ($p = 0,110$).

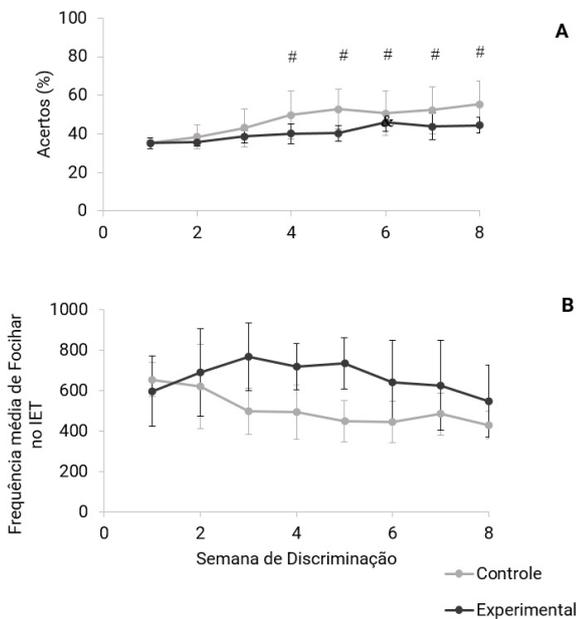


Figura 3. Porcentagem média e desvio padrão dos acertos em cada semana da tarefa de discriminação visual (Painel A) e média e desvio padrão das frequências médias de focinhar no IET em cada semana da tarefa de discriminação visual (Painel B) para os grupos controle e experimental. As Semanas 1 a 7 representam blocos de cinco sessões, enquanto a Semana 8 representa um bloco de três sessões. Dados do grupo experimental em cinza escuro e do grupo controle em cinza claro. #: $p < 0,001$ em relação à primeira semana para o grupo controle; &: $p < 0,05$ em relação à primeira semana para o grupo experimental.

Ambos os grupos tiveram médias de acertos e desvios padrões semelhantes na primeira semana de discriminação ($M = 35,35\%$; $DP = 1,16$ para o grupo controle, $M = 35,15\%$; $DP = 2,83$ para o grupo experimental; $M = 35,25\%$ e $DP = 2,01$ para todos os sujeitos). Nenhum dos sujeitos atingiu o critério de encerramento de 80% de acerto em três sessões consecutivas, finalizando-se a tarefa na sessão 38 da Semana 8 para todos os sujeitos. Entretanto, observa-se que a curva de acertos para os grupos experimental e controle é crescente, atingindo cerca de 50% de acerto nos blocos das três últimas sessões ($M = 49,91\%$; $DP = 10,13$). A curva de acertos foi mais acelerada para o grupo controle, no qual três de quatro sujeitos atingiram mais de 50% de acertos no conjunto das três últimas sessões ($M = 55,39\%$; $DP = 11,92$), em comparação com o grupo experimental, em que todos os sujeitos tiveram menos de 50% de acerto no conjunto das três últimas sessões ($M = 44,44\%$; $DP = 4,22$).

A frequência de respostas de focinhar durante o IET ao longo da tarefa de discriminação visual é apresentada na Figura 3B. Verificaram-se diferenças significativas entre as

semanas da tarefa de discriminação visual [$F(7, 42) = 2,789$; $p = 0,018$; $\eta^2p = 0,317$] e na relação entre grupos e semanas [$F(7, 42) = 2,990$; $p = 0,012$; $\eta^2p = 0,333$], mas não entre grupos [$F(1, 6) = 3,083$; $p = 0,130$; $\eta^2p = 0,339$], entretanto todas as comparações com um tamanho de efeito elevado. Nenhuma diferença significativa entre os grupos foi encontrada na comparação entre as semanas.

As médias e desvios padrões das frequências de resposta durante o IET foram semelhantes entre os grupos controle e experimental na Semana 1 e Semana 2. A partir da Semana 3, observa-se uma diferenciação maior entre as médias e desvios padrões dos grupos, sendo maior para o grupo experimental, principalmente na Semana 5. Também se observa uma maior semelhança entre os grupos na Semana 7 e Semana 8.

Os resultados obtidos no MWM são apresentados na Figura 4, que mostra a latência de escape (encontrar a plataforma) nas 24 primeiras tentativas. Não foram encontradas diferenças significativas para a latência de escape na Sessão 1 do MWM entre os grupos [$F(1, 6) = 1,912$; $p = 0,216$; $\eta^2p = 0,242$], com tamanho médio de efeito, entre os conjuntos de tentativas [$F(3, 18) = 3,081$; $p = 0,054$; $\eta^2p = 0,339$] e na relação entre grupos e conjuntos de tentativas [$F(3, 18) = 2,5514$; $p = 0,088$; $\eta^2p = 0,298$], embora se verifique uma tendência à diferença ($p < 0,10$) e um tamanho de efeito elevado entre conjuntos de tentativas e na relação entre grupos e conjuntos de tentativas. Na segunda sessão, não foram encontradas diferenças significativas para a latência de resposta entre grupos [$F(1, 6) = 0,472$; $p = 0,518$; $\eta^2p = 0,073$], com tamanho de efeito médio, e na relação entre grupos e conjunto de tentativas [$F(3, 18) = 0,060$; $p = 0,980$; $\eta^2p = 0,010$], com tamanho de efeito pequeno, mas verifica-se uma diferença significativa entre os conjuntos de tentativas [$F(3, 18) = 5,588$; $p = 0,007$; $\eta^2p = 0,482$], com tamanho de efeito elevado.

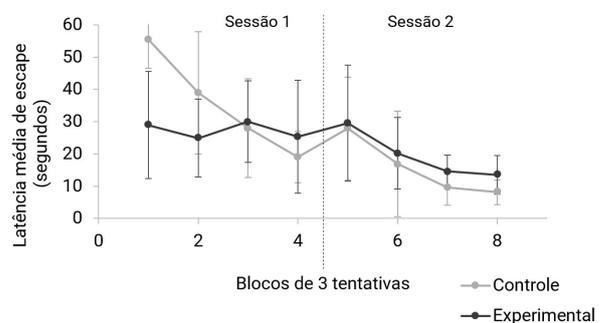


Figura 4. Médias e desvios padrões da latência média de escape em conjuntos de três tentativas para as duas sessões (12 tentativas cada) de aprendizagem espacial no MWM. Dados do grupo controle em cinza claro e do grupo experimental em cinza escuro.

A média da latência de escape do grupo controle foi maior em comparação ao grupo experimental no primeiro conjunto de tentativas, diminuindo ao longo da primeira sessão, enquanto a média da latência de escape dos sujeitos do grupo experimental permaneceu constante durante a primeira sessão. Na segunda sessão, observa-se que a média da latência de escape diminuiu ao longo dos conjuntos de tentativas para ambos os grupos de forma similar.

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos sugerem que o modelo de CMS pode ter atrasado a aprendizagem dos sujeitos na tarefa de discriminação visual, embora não tenha prejudicado, de modo geral, o desempenho nessa tarefa. Além disso, a análise dos resultados não revelou diferenças significativas no desempenho dos dois grupos no MWM. Embora não tenha sido verificado o efeito de anedonia pela queda na preferência por solução de sacarose, verificou-se que os animais do grupo experimental tiveram o ganho de peso reduzido durante a exposição ao CMS. Esses resultados gerais serão melhor discutidos na sequência.

É provável que a tarefa de discriminação visual utilizada tenha sido muito complexa para os sujeitos, uma vez que nenhum deles atingiu o critério de aprendizagem dentro do período estabelecido. Souza e Schmidt (2014) conduziram um experimento no qual ratos foram expostos ao ensino de discriminação visual simultânea no mesmo equipamento utilizado no presente experimento. Entretanto, diferentemente do presente estudo, os autores dividiram o procedimento em duas etapas, realizando o procedimento de discriminação simples de estímulos luminosos antes do procedimento de discriminação das figuras geométricas. Essa característica do procedimento pode ter sido crucial, uma vez que os sujeitos daquele experimento atingiram o critério de aprendizagem de 80% de acertos após cerca de 27 sessões. A mudança efetuada no procedimento do presente experimento provavelmente dificultou a aprendizagem da discriminação pelos sujeitos; talvez, o critério de 80% de acertos em três sessões consecutivas poderia ter sido atingido dentro das 38 sessões conduzidas se a tarefa de discriminação visual fosse dividida em duas etapas, como em Souza e Schmidt (2014). Essa, portanto, é uma limitação que deve ser revista em estudos futuros.

Embora o critério de aprendizagem de discriminação visual não tenha sido alcançado, observou-se uma melhora no desempenho dos sujeitos ao longo da tarefa (aumento da porcentagem de respostas acima do nível de acaso de 33,3% para cada estímulo). A ausência de diferenças no desempenho dos animais do Grupo Experimental em

comparação aos do Grupo Controle pode estar relacionada ao fato do procedimento ter sido interrompido enquanto a aprendizagem ainda estava em fase de transição. Além disso, a amostra reduzida pode ter aumentado a variância dos dados e dificultado a verificação de diferença entre os grupos. Ainda assim, os resultados sugerem que o CMS pode ter dificultado o processo de aprendizagem de discriminação visual, provocando um atraso na aprendizagem, como sugerido pela curva de aprendizagem dos animais do grupo experimental.

Um efeito semelhante foi observado por Rocha (2013), que encontrou um atraso na aprendizagem de discriminação de ratos expostos a um protocolo de CMS de longa duração (seis semanas). O efeito negativo verificado no presente estudo, assim como no experimento de Rocha (2013), pode estar relacionado a um modelo de CMS de longa duração, assim como é discutido por Conrad (2010) para tarefas de aprendizagem espacial, segundo o qual modelos de CMS mais prolongados e com estressores mais severos tenderiam a ter um efeito negativo sobre a aprendizagem espacial. Além disso, a observação de um atraso na aprendizagem pode ter sido favorecida pelo tipo da tarefa (uma tarefa de discriminação visual simultânea) com um período de aquisição longo (38 sessões). Fonseca Jr. et al. (2015), por outro lado, não encontraram nenhuma diferença significativa entre o desempenho de ratos expostos a um protocolo de CMS com duração de 43 dias e ratos do grupo controle em uma aprendizagem de discriminação de estímulos luminosos (10 dias de aquisição), mais simples que a tarefa aqui relatada. Esse resultado pode apoiar a hipótese de que os efeitos do CMS sobre a aprendizagem operante podem depender de um conjunto de variáveis que incluem a natureza/complexidade da tarefa, o tipo dos estressores empregados e o tempo de exposição ao protocolo.

Além desse efeito sobre a aprendizagem, os resultados sugerem uma tendência dos ratos que passaram pelo CMS a emitir mais respostas nos intervalos entre tentativas. Entretanto não foram verificadas diferenças significativas específicas entre os grupos em cada semana que suportem a conclusão de que ratos que passaram pelo CMS tiveram uma maior frequência de respostas em relação ao grupo controle durante o IET. Fonseca Jr. et al. (2015) verificaram que ratos que passaram pelo CMS apresentaram uma maior frequência de respostas para o S+ e para o S- durante a aprendizagem da discriminação, em comparação ao grupo controle, o que possibilita questionar se o número reduzido de sujeitos no presente estudo pode ter dificultado a ocorrência de diferenças significativas que permitissem afirmar com maior certeza que os sujeitos que passaram pelo CMS apresentaram uma maior frequência de resposta durante o IET.

Embora o CMS aparentemente tenha provocado um efeito negativo sobre o processo de aprendizagem de discriminação visual, no MWM não foi verificado um efeito significativo (positivo ou negativo) sobre a aprendizagem espacial: os sujeitos aprenderam a localizar a plataforma, resultado verificado pela diminuição estatisticamente significativa na latência de escape ao longo das tentativas. Embora os sujeitos que passaram pelo CMS tenham apresentado uma latência de escape menor nas primeiras tentativas, essa diferença foi dissipada rapidamente nas tentativas posteriores e não foi encontrada nenhuma diferença significativa que indicasse um efeito facilitador do CMS sobre a aprendizagem espacial. No entanto, o elevado tamanho do efeito verificado na primeira sessão no MWM pode indicar que a diferença encontrada nas primeiras tentativas pode estar relacionada a eventuais efeitos da exposição prolongada dos animais ao CMS, mas essa suposição demandaria uma replicação do experimento com um número maior de animais.

A literatura apresenta resultados contraditórios sobre os efeitos do CMS em tarefas de aprendizagem espacial. Riaz et al. (2015), Xi et al. (2011) e Wang et al. (2016) encontraram um efeito negativo do CMS sobre a aprendizagem espacial (labirinto radial e MWM). Por outro lado, assim como no presente estudo, Bessa (2009) não encontrou diferenças significativas em uma tarefa de aquisição de aprendizagem espacial no MWM entre ratos que passaram pelo CMS e ratos do grupo controle, embora tenham verificado que o CMS dificultou a aprendizagem reversa da mesma tarefa no MWM. Essa disparidade entre os dados de diferentes pesquisas indica a necessidade de estudar melhor os eventuais efeitos que o CMS pode ter sobre a aprendizagem de tarefas espaciais por ratos e as condições críticas para que esses eventuais efeitos ocorram.

Podem ser levantadas algumas possibilidades de explicação para os resultados obtidos no presente estudo na tarefa de aprendizagem espacial. A primeira poderia estar relacionada a um efeito de habituação aos estressores ao longo da implementação do protocolo, uma vez que os sujeitos iniciaram a tarefa no MWM após 11 semanas de CMS. Na literatura não foram encontrados estudos que documentassem os efeitos do CMS quando aplicado por períodos muito longos de tempo, como no presente estudo, mas deve-se considerar que o modelo de CMS é de natureza imprevisível e envolve a alternância entre os estressores, o que enfraquece a possibilidade de atenuação dos seus efeitos ao longo do tempo por habituação.

Outra possibilidade seria de que a exposição a uma tarefa de discriminação visual possa ter suprimido os efeitos do protocolo de CMS sobre o desempenho posterior dos animais

na tarefa do MWM. Thomaz (2001) observou que ratos expostos a um protocolo de CMS de seis semanas apresentaram uma queda no consumo de líquidos e na preferência por solução de sacarose. Alguns sujeitos que passaram por sessões operantes em esquema concorrente FR15 – FR15 com água e solução de sacarose após o período de CMS apresentaram um aumento no consumo e na preferência por solução de sacarose, revertendo os efeitos do protocolo de CMS. O mesmo não foi observado em sujeitos que não passaram pela tarefa operante, permanecendo com o consumo e a preferência por solução adocicada em níveis baixos. Isso poderia indicar que a exposição a tarefas operantes após um período de CMS pode atenuar os efeitos do protocolo de estressores. O presente estudo não controlou essa variável, mas uma sugestão para futuros estudos é a formação de diferentes grupos submetidos ao CMS e que passem por tarefas operantes antes ou depois do MWM (e.g., MWM e discriminação para um grupo, e discriminação e MWM para outro) a fim de que se possa comparar um eventual efeito de ordem das tarefas sobre a redução (ou não) dos efeitos do CMS.

Também é preciso considerar que tanto a tarefa de discriminação quanto a tarefa de fuga (MWM) envolvem diferentes reforçadores (reforço positivo no primeiro caso, e reforço negativo no segundo), o que poderia levar a diferenças de desempenho dos animais. Outras pesquisas revelam efeitos negativos de protocolos de CMS de longa duração sobre tarefas de aprendizagem espacial que utilizaram reforço positivo e também em tarefas de aprendizagem espacial que utilizaram reforço negativo (e.g. Riaz et al., 2015; Xi et al., 2011). Não está claro, no entanto, se essa diferenciação é relevante para a análise dos resultados aqui obtidos.

Finalmente, embora algumas pesquisas demonstrem que o CMS pode ter um efeito de queda na preferência por soluções adocicadas (e.g., Bessa, 2009; Stepanichev, 2016), outras pesquisas, assim como no presente estudo, não encontraram os mesmos efeitos de anedonia (e.g., Herrera-Pérez et al., 2016; Fonseca Jr. et al., 2015). Além disso, algumas pesquisas com CMS que encontraram efeitos sobre a aprendizagem encontram também efeito de queda na preferência por sacarose (e.g. Bessa, 2009), enquanto outras pesquisas que verificaram diferenças na aprendizagem não verificaram um efeito de anedonia (e.g. Gouirand & Matuszewich, 2005), como na presente pesquisa. Esses resultados têm sido interpretados de diferentes maneiras pelos autores. Tran et al. (2016) verificaram que apenas uma parcela dos ratos expostos ao CMS desenvolve anedonia, e sugerem que poderiam existir organismos mais resistentes ao estresse do que outros. Nesse sentido, é possível que os ratos do grupo experimental do presente estudo fossem

resistentes ao estresse, não apresentando efeitos significativamente negativos nas tarefas de aprendizagem, o que pode ter impedido a diferenciação entre os grupos controle e experimental. Essa hipótese, no entanto, demanda ainda pesquisas adicionais para ser melhor estudada.

Considera-se que a presente pesquisa possibilitou a análise dos efeitos do estresse crônico moderado sobre duas tarefas de aprendizagem, apesar da dificuldade da tarefa de discriminação visual proposta e do número reduzido da amostra, que devem ser considerados como limitações do estudo. Os resultados encontrados, porém, contribuem para o debate científico acerca de como o estresse crônico moderado influencia em tarefas de aprendizagem em ratos, e indicam a necessidade de se investir em mais estudos que possam elucidar com mais segurança os protocolos de pesquisa mais adequados de CMS e os seus efeitos sobre as variáveis estudadas.

DECLARAÇÃO DE FINANCIAMENTO

A segunda autora é membro do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia sobre Comportamento, Cognição e Ensino (INCT-ECCE), com financiamento Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Processo 465686/2014-1) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - Processo 2014/50909-8). Essa pesquisa também contou com o apoio da FAPESP com bolsa de iniciação científica para o primeiro autor (Processo 2016/12734-7).

DECLARAÇÃO DA CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

V.P. e A.S. participaram da conceitualização, formulação da metodologia e redação do manuscrito. V.P. conduziu a investigação e a análise formal dos dados. A.S. teve a responsabilidade de supervisão da pesquisa.

DECLARAÇÃO DE CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram que não há conflitos de interesse no presente artigo.

REFERÊNCIAS

Bessa, J. M., Mesquita, A. R., Oliveira, M., Pêgo, J. M., Cerqueira, J. J., Palha, J. A., Almeida, O. F. X., & Sousa, N. (2009). A trans-dimensional approach to the behavioral aspects of depression. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 3. <https://doi.org/10.3389/neuro.08.001.2009>

Bian, Y., Pan, Z., Hou, Z., Huang, C., Li, W., & Zhao, B. (2012). Learning, memory, and glial cell changes following recovery from chronic unpredictable stress. *Brain Research Bulletin*, 88(5), 471-476. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2012.04.008>

Conrad, C. D. (2010). A critical review of chronic stress effects on spatial learning and memory. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 34, 742-755. <https://doi.org/10.1016/j.pnpb.2009.11.003>

Fonseca Jr., A. R., Castelli, M. C. Z., & Oliveira E. C. A. (2015). Effects of chronic mild stress on operant discrimination learning. *Behavior Analysis: Research and Practice*, 15(1), 20-27. <https://doi.org/10.1037/h0101066>

Gouirand, A. M., & Matuszewich, L. (2005). The effects of chronic unpredictable stress on male rats in the water maze. *Physiology & Behavior*, 86, 21-31. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2005.06.027>

Herrera-Pérez, J. J., Benítez-Coronel, V., Jiménez-Rubio, G., Hernández-Hernández, T., & Martínez-Mota, L. (2016). Young-adult male rats' vulnerability to chronic mild stress is reflected by anxious-like instead of depressive-like behaviors. *Neuroscience Journal*, 2016, 5317242. <https://doi.org/10.1155/2016/5317242>

Morris, R. G. (1981). Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learning and Motivation*, 12, 239-260. [https://doi.org/10.1016/0023-9690\(81\)90020-5](https://doi.org/10.1016/0023-9690(81)90020-5)

Riaz, M. S., Bohlen, M. O., Gunter, B. W., Henry, Q., Stockmeier, C. A., & Paul, I. A. (2015). Attenuation of social interaction-associated ultrasonic vocalizations and spatial working memory performance in rats exposed to chronic unpredictable stress. *Physiology & Behavior*, 152, 128-134. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.09.005>

Rocha, L. M. (2013). *Os efeitos da submissão ao Chronic Mild Stress (CMS) no estabelecimento de uma discriminação*. Dissertação de mestrado, Pontifícia Universidade Católica de São Paulo (PUC-SP), São Paulo, SP, Brasil.

Souza, M. F., & Schmidt, A. (2014). Responding by exclusion in Wistar rats in a simultaneous visual discrimination task. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*, 102(3), 346-352. <https://doi.org/10.1002/jeab.106>

Stepanichev, M. Y., Tishkina, A. O., Novikova, M. R., Levshina, I. P., Freiman, S. V., Onufriev, M. V., Levchenko, O. A., Lazareva, N. A., & Gulyaeva, N. V. (2016). Anhedonia but not passive floating is an indicator of depressive like behavior in two chronic stress paradigms. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 76, 324-333. <https://doi.org/10.21307/ane-2017-031>

Thomaz, C. R. C. (2001). *Efeito da submissão ao chronic mild stress (CMS) sobre o valor reforçador do estímulo*. Dissertação de mestrado, Pontifícia Universidade Católica de São Paulo (PUC-SP), São Paulo, SP, Brasil.

- Tran, T. P., Christensen, H. L., Bertelsen, F. C. B., Bouzinova, E., Møller, A., & Wiborg, O. (2016). The touchscreen operant platform for assessing cognitive functions in a rat model of depression. *Physiology & Behavior*, *161*, 74-80. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.03.032>
- Wang, J., Yuan, J., Pang, J., Ma, J., Han, B., Geng, Y., Shen, L., Wang, H., Ma, Q., Wang, Y., & Wang, M. (2016). Effects of chronic stress on cognition in male SAMP8 mice. *Cellular Physiology and Biochemistry*, *39*(3), 1078-1086. <https://doi.org/10.1159/000447816>
- Willner, P., Towell, A., Sampson, D., Sophokleous, S., & Muscat, R. (1987). Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology*, *93*, 358-364. <https://doi.org/10.1007/BF00187257>
- Xi, G., Hui, J., Zhang, Z., Liu, S., Zhang, X., & Teng, G. (2011). Learning and memory alterations are associated with hippocampal N-acetylaspartate in a rat model of depression as measured by 1H-MRS. *Plos One*, *6*(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028686>

Data de submissão: 21/02/2018
Primeira decisão editorial: 12/07/2018
Aceite em 10/09/2018