

ARTIGO ORIGINAL

Relações entre o estresse crônico e a memória espacial em ratos

Relations between chronic stress and the spatial memory

Amanda Rocha Moreno¹, Elisa Moreira Pessoa¹, Rodolfo Souza de Faria ²

¹ Acadêmica do 6º ano da Faculdade de Medicina de Itajubá

² Professor da Faculdade de Medicina de Itajubá

Contato:

Amanda Rocha Moreno

amandarochamorenotp@hotmail.com

Relações entre o estresse crônico e a memória espacial em ratos

Resumo

Introdução: A memória é definida como uma modificação comportamental advinda das relações entre o organismo e o seu meio. O estresse denota o estado gerado pela percepção de estímulos que provocam excitação emocional e, ao perturbarem a homeostasia, disparam um processo de adaptação. **Objetivo:** Investigar a relação entre o estresse crônico e a memória espacial em ratos. **Metodologia:** Utilizou-se 20 ratos, machos, com 45 dias de vida, linhagem Wistar divididos em 2 grupos de 10 ratos (n=10) - Grupo 01: Estresse Choque – recebeu um choque nas patas de 0,5 mA, por 2 segundos, a cada 30 segundos, por 5 minutos/dia, por 49 dias consecutivos. Grupo 02: Controle – submetido à mesma caixa utilizada pelo Grupo 01, mas não recebeu nenhum estímulo, por 5 minutos, durante 49 dias. Posteriormente, iniciaram-se os procedimentos comportamentais, que consistem na Habituação na Arena, Teste de Campo Aberto, Treino de Reconhecimento de Objetos, Teste de Memória de Curto Prazo e Teste de Memória de Longo Prazo. **Resultados:** No Teste de Memória de Curto Prazo o grupo estresse choque apresentou um significativo aumento da taxa de exploração ($p < 0,05$), demonstrando um efeito positivo do estresse crônico sobre a memória de curto prazo. No Teste de Memória de Longo Prazo não houve diferença significativa do grupo estresse choque em relação ao grupo controle ($p > 0,05$). **Conclusão:** o estresse crônico revelou efeitos positivos sobre a memória de curto prazo no Teste de Reconhecimento de Objetos, quando comparado ao grupo de controle, porém não obteve efeitos significativos sobre a memória de longo prazo. **Palavras-chave:** estresse crônico, memória, aprendizado

Relations between chronic stress and the spatial memory in rats

Abstract

Introduction: Memory is defined as a behavioral change between organism and its environment. Stress is aroused by the perception of stimuli that provoke emotional arousal, and by disrupting a homeostasis triggers a process of adaptation.

Objective: To investigate a relationship between chronic stress and spatial memory in rats. Wistar strain divided into 2 groups of 10 rats (n = 10) - Group 01: Stress Shock - received a shock in the legs of 0.5 mA, for 2 seconds, every 30 seconds, for 5 minutes / day, for 49 consecutive days. Group 02: Control - submitted to the current box by Group 01, but not based on, for 5 minutes, for 49 days. Subsequently, behavioral procedures were started, which consist of Arena Habituation, Open Field Test, Object Recognition Trial, Short Term Memory Test and Long Term Memory Test. Results: In the Short Term Memory Test, the work group is showing an increase in the growth rate ($p < 0.05$), demonstrating a positive effect on short-term memory stress. Do not Be More Likely, either to the Supreme Court or to the Remote Control ($p > 0.05$). Conclusion: chronic stress in results of a control process, but is not a critical process of long-term evaluation.

Key words: chronic stress, memory, learning

1. Introdução

A memória é definida como uma modificação comportamental advinda das relações entre o organismo e o meio no qual está inserido. Tais relações ocorrem como resultado da prática, da experiência e/ou observação, estabelecendo alterações moleculares e celulares nos circuitos neuronais do sistema nervoso central, onde o cérebro constantemente cria e evoca memórias. Porém, a memória não é apenas a capacidade de repetir, mas sim de variar a resposta frente a uma nova aprendizagem.^{1,2} A aprendizagem transforma experiências em memórias e é o processo pelo qual humanos e outros animais captam conhecimento. Em uma perspectiva cognitiva, a aprendizagem seria concebida como a aquisição de novas informações e a sua integração no conjunto de conhecimentos pré-existentes. Aprender, porém, não se limita apenas à aquisição de novas informações, mas tem ainda por objetivo corrigir, aprofundar, alargar e reorganizar a base dos conhecimentos já adquiridos. Dessa forma, a aprendizagem está vinculada aos demais processos mentais de atenção, percepção, memória e raciocínio, sendo o conhecimento o resultado da mediação coordenada dos vários processos cognitivos.³

Classicamente, a memória pode ser dividida em estágios, que se classificam conforme o tempo de retenção ou armazenamento de uma informação: muito rápido (na ordem de milissegundos, denominada de memória sensorial), de curto e de longo prazo. A memória de curto prazo é aquela que apresenta armazenamento temporário de poucas informações por curto intervalo de tempo advindas da memória sensorial ou da memória de longo prazo. A memória de longo prazo tem a capacidade de armazenar informações por períodos de tempo bem mais longos, na ordem de minutos, horas, dias, semanas, meses ou anos.³⁻⁵

Neste cenário, a memória espacial envolve a habilidade para codificar, armazenar e recuperar informações sobre localizações espaciais, configurações ou rotas. É esta função que permite lembrar da localização de objetos ou encontrar o caminho dentro do meio ambiente. Informações referentes aos objetos e às relações espaciais entre eles são armazenadas pelo esboço visuoespacial, também considerado um sistema duplo formado por um armazenador visual e por um sistema ativo, responsável por manter informações visuoespaciais.⁶⁻⁸ A memória espacial pode ser afetada por vários fatores externos e internos, incluindo o estresse.⁹⁻¹¹

Demonstrou-se ainda que o estresse pode melhorar ou piorar as memórias relacionadas a diversas tarefas (como na memória de reconhecimento de objeto, condicionamento clássico e navegação espacial).⁹ A direção destes efeitos depende da intensidade da resposta ao estresse, do tipo de agente estressante utilizado e da fase da memória na qual se induz o estresse.¹⁰ A exposição ao estresse agudo pode exercer um efeito positivo ou negativo na memória de curto prazo.¹ Troncoso et al., 2010 demonstrou que a indução de estresse agudo por imobilização em ratos, antes da aquisição de uma tarefa espacial, avaliada no labirinto radial de oito braços, melhorou o desempenho desta tarefa comparados ao grupo controle.¹¹ Por outro lado, o estresse crônico também é capaz de exercer efeitos na memória espacial. Barreto et al., 2018 demonstrou que apesar do desgaste metabólico, a memória de aprendizagem foi preservada durante o estresse crônico. Esse fato é interessante, uma vez que esta forma de estresse é frequentemente relatada como deletéria para o desempenho da memória em mamíferos, assim como evidenciado em Izquierdo et al., 2008, que demonstrou o estresse agudo como prejudicial tanto para a memória de reconhecimento de objetos a curto prazo, quanto para a longo prazo, enquanto o estresse crônico prejudicou apenas a de longo prazo.¹²⁻¹⁶

Diante da relevância de tal problemática e da escassez de estudos relacionados especificamente ao estresse crônico e suas interações com a memória de longo prazo, o objetivo do presente estudo foi, visando ampliar as bases da relação entre tais temas, investigar o efeito do estresse crônico nas diferentes fases da memória espacial em ratos.

2. Materiais e método

2.1. Animais

Os experimentos foram realizados com ratos Wistar machos (220-280 g, com idades entre seis e nove semanas), obtidos no biotério da Faculdade de Medicina de Itajubá (FMIt). Os ratos foram mantidos em temperatura média de 25°C e ciclo claro/escuro de 12h (às 07:00 horas), com comida e água disponíveis *ad libitum*. Todos procedimentos experimentais foram realizados de acordo com o Requisitos do Comitê de Ética em Experimentação Animal de FMIt, sob o número de protocolo 015/2015.

2.2. Procedimentos experimentais

Após a realização de cada etapa dos procedimentos experimentais, os animais retornaram a suas gaiolas no biotério. Todos os objetos utilizados no treino de reconhecimento de objetos e nos testes eram do mesmo material (plástico), apresentavam a mesma textura e tamanho, mas formas e cores distintas. O tempo de exploração de cada objeto, em todas as etapas, foi gravado em vídeo para documentação e posterior análise.

2.2.1. Indução do estresse crônico

Os animais foram divididos, aleatoriamente, nos seguintes grupos experimentais: Estresse Choque (composto por 10 animais, recebeu um choque nas patas de 0,5 mA, por 2 segundos, a cada 30 segundos, durante 5 minutos, por 49 dias

consecutivos; Controle (composto por 10 animais, foi submetido à mesma caixa utilizada pelo grupo Estresse Choque, por 5 minutos, durante 49 dias consecutivos, mas não recebeu nenhum estímulo elétrico para indução de estresse).^{9,17,18}

2.2.2. Habituação da arena

Do 50º ao 52º dia, os animais passaram pela Habituação na Arena, onde foram expostos à arena 90x90x40cm, durante 10 minutos por dia, onde o animal não foi exposto a qualquer objeto.^{9,18} Esse experimento tem como objetivo minimizar o estresse do animal no contexto experimental da arena.

2.2.3. Teste de campo aberto

No 53º dia foi realizado o Teste de Campo Aberto, no qual os animais foram colocados no quadrante central de um campo aberto de 90x90x40cm, com paredes brancas e piso dividido em 12 retângulos iguais por linhas pretas no piso, para medir a capacidade de movimentação e exploração de cada rato, sem exposição a qualquer objeto.^{9,18} Esse experimento tem como objetivo analisar as atividades exploratórias e locomotoras, bem como a memória de habituação dos animais.¹²

2.2.4. Treino de reconhecimento de objetos

No 54º dia decorreu o Treino de Reconhecimento de Objetos, em que os ratos foram colocados individualmente por 5 minutos para explorar a arena (90x90x40cm), na presença de 02 objetos idênticos (1A a 2A) posicionados em dois cantos opostos, a 6 centímetros das paredes da caixa.^{9,18}

2.2.5. Teste de memória de curto prazo

Após 1 hora e 30 minutos do treino os animais passaram pelo Teste de Memória de Curto Prazo, em que exploraram a mesma arena do treino por 5 minutos na presença de um objeto familiar (1A) e de um novo objeto (B).^{9,18}

2.2.6. Teste de memória de longo prazo

No 64º dia transcorreu o Teste de Memória de Longo Prazo, 10 dias após o Teste de Memória de Curto Prazo, em que os animais, individualmente, foram colocados na arena para exploração, por 5 minutos, na presença de um objeto familiar (1A) e de um novo objeto (C). Finalizado o Teste de Memória de Longo Prazo, os ratos retornaram para suas gaiolas.

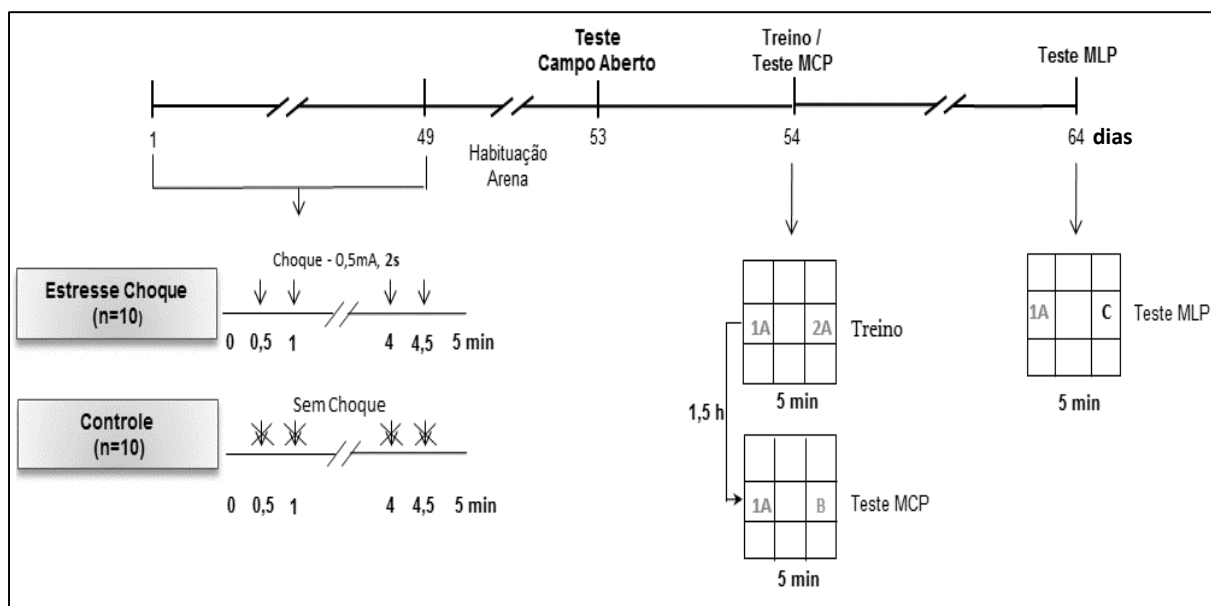


Figura 1. Desenho esquemático dos procedimentos experimentais realizados

2.2.7. Procedimento de eutanásia

Ao final do período experimental, os animais foram submetidos a uma caixa de acrílico, a qual continha gazes embebidas com éter etílico para estabelecimento do plano anestésico e posterior realização da eutanásia por decapitação.

2.2.8. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas no IBM SPSS Statistics®, versão 22. Os resultados relacionados ao comportamento de exploração de objetos são apresentados como preferência exploratória.⁴ Para tanto, foi calculado o índice de reconhecimento para cada animal por meio da razão $TB,C/(TA+TB,C) \times 100$, em que

TA = tempo gasto explorando o objeto familiar A e TB,C = tempo gasto explorando os novos objetos B ou C.

Todos os resultados experimentais foram expressos como média±erro padrão da média (EPM). Para garantir que análises paramétricas pudessem ser aplicadas, os dados foram submetidos aos testes Kolmogorov-Smirnov (para normalidade) e Levene (homogeneidade da variância), sendo todos os $p > 0,050$. Em seguida, foram realizados testes t de Student para amostras independentes para comparar, entre os dois grupos, a preferência exploratória para cada uma das três fases do estudo: a) memória de curto prazo; b) memória de longo prazo (10 dias). Foram considerados significativos valores de $p \leq 0,05$.

3. Resultados

Análise do comportamento de exploração dos objetos durante o teste de memória de curto prazo (90 minutos após o treino) de reconhecimento de objetos: A Figura 2A mostra os dados da duração média percentual do tempo de comportamento de exploração dos objetos A e B, durante a sessão do teste realizado 90 minutos após o treino de reconhecimento de objetos (memória de curto prazo). A realização de um teste t de Student para amostras independentes mostrou diferenças entre os grupos ($t(20)=2,46$, $p=0,023$), sendo que a média±EPM do grupo choque ($75,75 \pm 4,77$) foi maior do que a do grupo controle ($58,49 \pm 4,83$).

Análise do comportamento de exploração dos objetos durante o teste de memória de longo prazo (10 dias após o treino) de Reconhecimento de Objetos: A Figura 2B mostra os dados da duração média percentual do tempo de comportamento de exploração dos objetos A e C (teste ocorrido 10 dias após o treino). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos no teste de longo prazo (grupo choque= $55,23 \pm 8,33$, grupo controle= $71,61 \pm 4,76$; $p=0,146$).

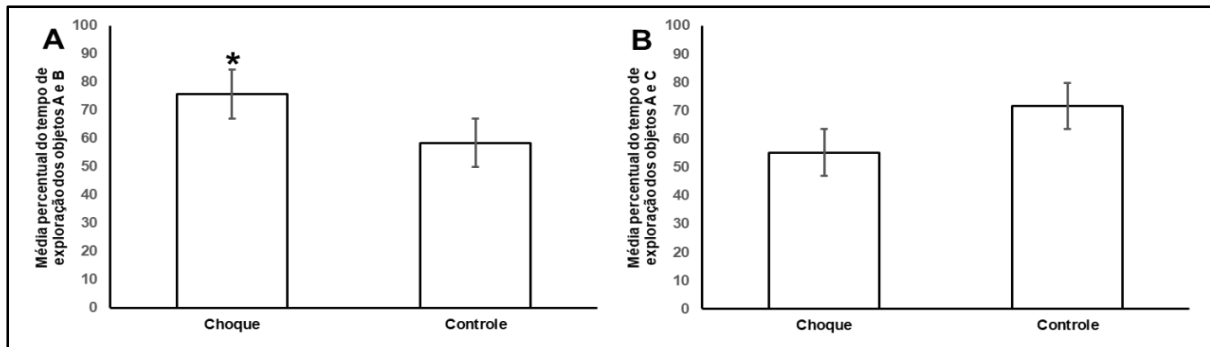


Figura 2. Média±erro padrão da média (EPM) da duração da porcentagem de exploração de objetos para os grupos choque (n=13) e controle (n=9). Em (A), referente ao teste de curto prazo ocorrido após 90 minutos do treino de reconhecimento de objetos. Por outro lado, não foram detectadas diferenças nem em (B) (teste de longo prazo após 10 dias do treino de reconhecimento de objetos; $p=0,146$).

4. Discussão

Nos dias hodiernos, a cada momento os indivíduos interagem com um complexo cotidiano de situações desafiadoras, nas quais o ritmo acelerado das mudanças socio-econômicas e culturais impõem ao organismo humano constantes readaptações psicofisiológicas, cognitivas e comportamentais. Tais adaptações são eficazes até certo limite, a partir do qual se sobrepõe um efeito desorganizador acompanhado de todas as repercussões relativas ao estresse.¹⁹⁻²⁴

Um evento estressor é caracterizado como um estímulo que ameaça o organismo, gerando, como consequência, um padrão de respostas físicas que o corpo utiliza para evitar ou escapar de uma condição avaliada como adversa. Como parte desse padrão, o estresse pode desencadear mudanças fisiológicas nas taxas cardíacas e respiratórias, além da pressão arterial.²¹ Esse efeito do estressor não está restrito apenas ao tecido periférico; também interage com as funções do sistema nervoso central e dos outros sistemas a ele relacionados.¹⁹ Além disso, o estresse, agudo ou crônico, foi repetidamente associado à piora das funções cognitivas, incluindo os processos intrínsecos à aprendizagem e à memória.^{16-18,20,22,25,26}

São poucos os estudos que avaliam os efeitos do estresse crônico sobre a memória de longo prazo, principalmente no modelo de reconhecimento de objetos. Esses dados mostram que o estresse crônico induziu efeitos positivos na memória de curto prazo, cuja análise foi feita durante a realização, 90 minutos após o treinamento, do Teste de Memória de Curto Prazo, no qual o grupo estresse revelou significância com um maior tempo de exploração, quando comparado ao grupo controle. Contudo, esse protocolo de estresse não apresentou diferenças significativas entre os grupos quando testados 10 dias após o treinamento, durante o Teste de Memória de Longo Prazo.

A literatura ainda apresenta divergentes resultados dos efeitos do estresse crônico na memória.^{11,12,27} Faria et al. (2016) demonstraram que ratos submetidos ao estresse do nado forçado, por 30 dias, apresentaram uma melhora na memória de curto prazo quando testados ao contexto ao som, comparados ao grupo de ratos sedentários, os quais não foram submetidos ao estresse crônico. Os resultados confirmaram esse mesmo efeito positivo do estresse crônico sobre a memória de curto prazo no teste de reconhecimento de objetos. Izquierdo et al. (2008) avaliaram a memória de curto e longo prazo submetendo ratos, que foram expostos ao estresse crônico por estímulo elétrico por 8 semanas, ao teste de reconhecimento de objetos. Os pesquisadores concluíram que o estresse crônico teve efeito deletério apenas na memória de longo prazo, não tendo efeito significativo na de curto prazo. Troncoso e colaboradores (2010) apresentaram resultados em que os animais foram expostos ao estresse crônico por estímulo elétrico por 8 semanas e ao Labirinto de Barnes. Esses animais apresentaram efeito prejudicial na memória de longo prazo apenas, sem interferência na de curto prazo.¹¹

Outro novo parâmetro avaliado foram os efeitos do estresse crônico sobre as duas fases da memória – curto e longo prazo – pelo protocolo de reconhecimento de objetos, tendo em vista que a literatura é escassa acerca desses dados especificamente. Nosso principal resultado destacou um efeito positivo do estresse crônico na memória de curto prazo, no entanto, não evidenciaram nenhum impacto na memória de longo prazo. Os animais do grupo Estresse Choque não obtiveram diferença estatística no comportamento de exploração quando comparados ao grupo controle no Teste de Memória de Longo Prazo. Estes resultados podem sugerir que o efeito do estresse foi capaz de induzir alterações neuronais necessárias para

estabelecer a memória de curto prazo. Assim, o efeito do estresse estaria restrito à essa memória.

5. Conclusão

Em resumo, os resultados demonstram que o estresse crônico revelou efeitos positivos sobre a memória de curto prazo no teste de reconhecimento de objetos, quando comparado ao grupo de controle. Ainda assim, essa modalidade de estresse não exerceu nenhuma mudança na memória de longo prazo. Assim, este estudo contribui e complementa a literatura de pesquisa atual, demonstrando uma outra perspectiva das relações entre o estresse crônico e a memória no reconhecimento de novos objetos. Os efeitos do estresse, de acordo com nossos resultados, apresentaram-se limitados à memória de curto prazo, talvez modulando uma série de eventos moleculares e celulares necessários para a regulação fina da plasticidade neuronal vital para a consolidação da memória.

6. Referências

1. Moreira MB, Montero EFS, Fagundes DJ, Chida VV, Ramalho CEB, et al. A Função Renal de Ratos Espontaneamente Hipertensos Submetidos ao Pneumoperitônio. *Acta Cir. Bras.* 2002.
2. Lin M, Hou G, Zhao Y, Yuan T. Recovery of Chronic Stress-Triggered Changes of Hippocampal Glutamatergic Transmission. *Neural Plast.* 2018 Jan.
3. Brito MVH. Lesão intestinal após isquemia e reperfusão: estudo comparativo usando sal tetrazólico (MTT) e histologia. *Acta Cir. Bras.* 2001;16(1):26-31.
4. Cechella JL, Leite MR, Rosario AR, Sampaio TB, Zeni G. Disphenyl diselenide-supplemented diet and swimming exercise enhance novel object recognition memory in old rats. *Age (Dordr).* 2014;36(4):96.

5. Lindqvist C, Jensen, P. Domestication and stress effects on contrafreeloading and spatial learning performance in red jungle fowl (*Gallus gallus*) and White Leghorn layers. *Behav Processes*. 2009;81(1):80-4.
6. Pinto A. Memória, cognição e educação: implicações mútuas. Educação, cognição e desenvolvimento: textos de psicologia educacional para a formação de professores (2001).
7. Dias LBT, Landeira-Fernandez J. Neuropsicologia do desenvolvimento da memória: da pré-escola ao período escolar. *Rev Neuropsicol. lat.am.* Rio de Janeiro. 2011;3(1):19-26
8. Diehl F. Plasticidade de receptores colinérgicos muscarínicos m4 hipocampais decorrente de uma consolidação da memória como possível marcador sináptico do engrama: ensaios farmacológico-comportamentais. Diss. Universidade federal do rio grande do sul, 2010.
9. Galera C, Garcia RB, Vasques R. Componentes funcionais da memória visuoespacial. *Estud. Av. São Paulo*. 2013;27(77):29-44.
10. Rocha AM, Blattes SF. Avaliação da memória espacial em pacientes portadores de Epilepsia com esclerose hipocampal. 2010.
11. Troncoso J, Lamprea M, Cuestas DM, Múnera A. El estrés agudo interfiere con la evocación y promueve la extinción de la memoria espacial em El laberinto de Barnes. *Acta Biol. Colomb.* 2010;15(1):207-22.
12. Izquierdo I, Mello PB, Benetti F, Cammarota M. Effects of acute and chronic physical exercise and stress on different types of memory in rats. *An Acad Bras Ciênc.* 2008;80(2):301-9.
13. Conrad CD. What Is the Functional Significance of Chronic Stress-Induced CA3 Dendritic Retraction Within the Hippocampus?. 2006;41(5).
14. Barreto AB. Estresse e memória: Efeito do estresse agudo e crônico na retenção da memória em diferentes perfis de personalidade em tilápias-do-Nilo. Universidade estadual de são Paulo, 2018.
15. Bale TL, Mueller BR. Early prenatal stress impact on coping strategies and learning performance is sex dependent. *Physiol Behav.* 2007;91:55-65.
16. Narayanan SN, Kumar RS, Potu BK, Nayak S, Mailankot M. Spatial memory performance of wistar rats exposed to mobile phone. *Clinic.* 2009;64(3):231-4.

17. Joëls M, Pu Z, Wiegert O, Oitzl M, Krugers H. Learning under stress: how does it work?. *Trends Cogn Sci.* 2006;10(4):152-8.
18. De Kloet, E., Oitzl, M. and Joëls, M. Stress and cognition: are corticosteroids good or bad guys?. *Trends Neurosci.* 1999;22(10):422-6.
19. Margis R, Picon P, Cosner AF, Silveira RO. Relação entre estressores, estresse e ansiedade. *Rev. Psiquiatr. Rio Gd. Sul.* 2003;25(1):65-74.
20. Machado SS. Qualidade de vida e stress de adultos jovens na sociedade contemporânea. Rio Grande do Sul: Universidade Federal do Rio Grande do Sul;2003.
21. Rocha R, Porto M, Morelli MYG, Maestá N, Waib PH, Burini RC. Efeito do estresse ambiental sobre a pressão arterial em trabalhadores. *Rev Saúde Públ.* 2002;36(5):568-75.
22. Cortez CM, Silva D. Implicações do estresse sobre a saúde e a doença mental. *Arq Catarin Med.* 2007;(4):96-108.
23. Pereira A, Freitas C, Mendonça C, Marçal F, Souza J, Noronha JP, Lessa L, et al. Envelhecimento, estresse e sociedade: uma visão psiconeuroendocrinológica. *Comun. ciênc. Saúde.* 2004;(1):34-53.
24. Schultchen D, Reichenberger J, Mittl T, Weh TRM, Smyth JM, Blechert J, Pollatos O. Bidirectional relationship of stress and affect with physical activity and healthy eating. *Br J Health Psychol.* 2019
25. Smith AM, Hughes GI, Davis FC, Thomas AK. Acute stress enhances general-knowledge semantic memory. *Horm Behav.* 2019;13(109):38-43.
26. Barry TJ, Sze WY, Raes F. A meta-analysis and systematic review of Memory Specificity Training (MeST) in the treatment of emotional disorders. *Behav Res Ther.* 2019 (2):36-51.

27. Faria RS, Gutierrez LFS, Faria FCS, Vale I, Reis J, Dias EV, SartoriCR, *et al.* Effects of the swimming exercise on the consolidation and persistence of auditory and contextual fear memory. *Neurosci Lett.* 2016;628:147-52