

7.07.03 - Psicologia / Psicologia Fisiológica.

APRENDIZAGEM REVERSA EM RATOS: IMPLEMENTAÇÃO DO TESTE E EXPLORAÇÃO DE DIFERENÇAS ENTRE MACHOS E FÊMEAS

Erinete da Silva Leite^{1*}, Adriano Edgar Reimer², Amanda Ribeiro de Oliveira³
 1. Mestranda em Psicologia da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar)
 2. Pesquisador do DPsi - Departamento de Psicologia - UFSCar
 3. Professora do DPsi - Departamento de Psicologia - UFSCar /Orientadora

Resumo

Diversos transtornos são conhecidos pela rigidez comportamental, como o Transtorno Obsessivo-Compulsivo, que se associa com resistência ao condicionamento quando regras ambientais são alteradas (aprendizagem reversa). Pouco se sabe, entretanto, como diferenças entre os sexos afetam a flexibilidade comportamental. O presente estudo teve como objetivo implementar o teste de aprendizagem reversa e verificar potenciais diferenças entre machos e fêmea. Foram utilizados 24 ratos Wistar adultos (12 machos, 12 fêmeas) condicionados em um labirinto em T e, na sequência, reconicionados para o teste de aprendizagem reversa. Machos e fêmeas aprenderam igualmente sobre a posição do alimento no labirinto, ilustrada pela diminuição progressiva no número de omissões, erros e tempo de reação. Diferenças entre os sexos foram observadas na aprendizagem reversa, com mais erros sendo cometidos pelas fêmeas, indicando menor flexibilidade comportamental para desvincular o comportamento de uma regra previamente aprendida.

Autorização legal: CEUA nº 3442130619

Palavras-chave: rigidez comportamental; flexibilidade comportamental; diferenças sexuais.

Apoio financeiro: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES; bolsa mestrado: processo no. 88887.469373/2019-00 e PROEX: código de financiamento 001).

Introdução

Flexibilidade comportamental se refere à capacidade de ajustar dinamicamente o comportamento às regras do ambiente (Armbruster et al., 2012), podendo ser medida mudando-se esquemas de reforço (Dajani & Uddin, 2015). No protocolo de aprendizagem reversa, a falha em se adaptar à mudança de contingência reflete comportamentos automatizados que são relevantes em diversos transtornos mentais (Izquierdo et al., 2017). Pacientes com Transtorno Obsessivo-Compulsivo (TOC), por exemplo, falham mais em testes de aprendizagem reversa (Tezcan et al., 2017).

A redução da alternância espontânea em roedores foi proposta como um modelo para os sintomas de perseveração e indecisão observados no TOC, respondendo farmacologicamente de maneira análoga ao comportamento compulsivo em humanos (Tsaltas et al., 2005). A metodologia da aprendizagem reversa propõe condicionar os animais a determinadas contingências e depois invertê-las, contabilizando os erros cometidos pelos animais durante a reversão da aprendizagem (Rommelink et al., 2016).

O objetivo do presente estudo é implantar o teste de aprendizagem reversa para ratos Wistar e avaliar potenciais diferenças entre machos e fêmeas. O conhecimento sobre as diferenças sexuais na aprendizagem e aprendizagem reversa pode nos ajudar a prevenir e tratar com mais eficácia vários distúrbios relacionados a falhas no aprendizado ou extinção/substituição de contingências, onde há diferenciação entre os sexos na prevalência e na semiologia (Lensi et al., 1996).

Metodologia

Ratos Wistar (12 machos; 12 fêmeas) com 10-12 semanas de idade foram privados de alimento por 23h e pesados diariamente (Deacon & Rawlins, 2006). Os animais tinham acesso ao alimento diariamente por 1 h após os testes comportamentais.

Para comparação da aprendizagem e aprendizagem reversa entre os sexos, os animais foram condicionados e depois submetidos ao teste de aprendizagem reversa no labirinto em T (acrílico preto, braços de 50 cm de comprimento e 10 cm de largura, com paredes de 30 cm de altura, um pellet de NESCAU® cereal colocado em um dos braços e trocado de lado na reversão de aprendizagem). A fase de aprendizagem contou com 10 tentativas diárias de cada animal por 5 dias, seguidos por um intervalo de 48h. Na sequência foram iniciadas as sessões de aprendizagem reversa, também com 10 tentativas diárias, por mais 3 dias. O tempo máximo de permanência no labirinto foi de 5 min. Foram contabilizados acertos (animal encontra o alimento), erros (animal escolhe o braço do labirinto sem alimento), omissões (tarefa não concluída) e o tempo de reação dos animais até a entrada em um dos braços do labirinto.

Os dados são apresentados como média \pm EPM. As comparações foram realizadas com ANOVAs de duas vias com medidas repetidas, com um fator para fase do procedimento (sessão: A1 \times A2 \times A3 \times A4 \times A5, ou AR1 \times AR2 \times AR3) e outro fator para grupo (sexo: machos \times fêmeas). Após as ANOVAs seguiu-se, no caso de

significância estatística, o teste Newman-Keuls. Valores de p menores que 0,05 foram considerados significativos.

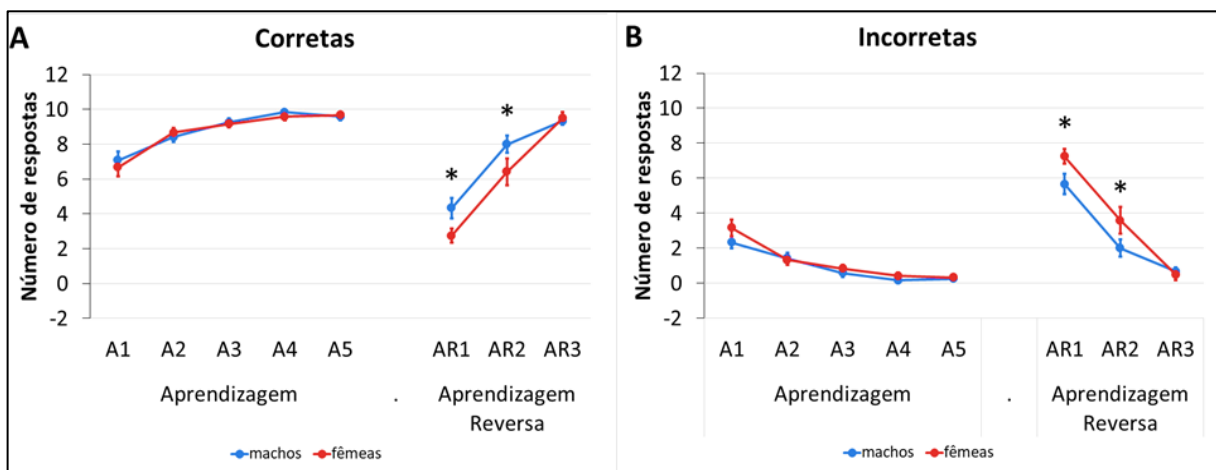
Resultados e Discussão

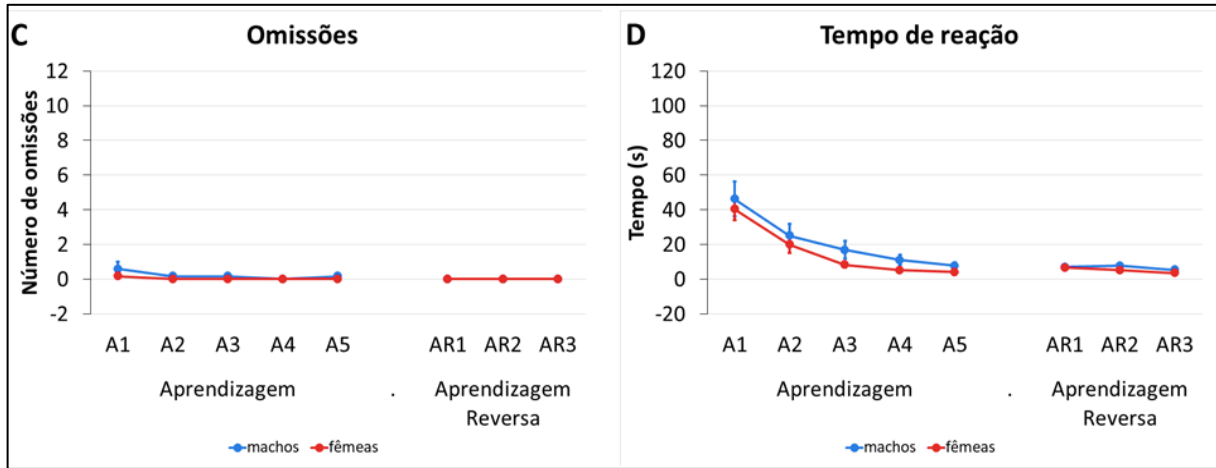
No presente estudo, exploramos potenciais diferenças entre machos e fêmeas na aprendizagem e aprendizagem reversa (Figura 1). Durante a aprendizagem, não encontramos diferenças entre machos e fêmeas para o número de acertos ($F_{1,88} = 0,17$, $p > 0,05$), erros ($F_{1,88} = 1,74$, $p > 0,05$), omissões ($F_{1,88} = 1,77$, $p > 0,05$), ou tempo de reação ($F_{1,88} = 1,42$, $p > 0,05$). Os animais machos e fêmeas aprenderam igualmente sobre a posição do alimento no Labirinto em T, diminuindo progressivamente as omissões, erros cometidos e o tempo até alcançar o alimento. Nossos resultados estão de acordo com os descritos por Lucon-Xiccato & Bisazza (2014) em seu experimento de aprendizagem com peixes machos e fêmeas da espécie *Poecilia reticulata* (lebiste ou barrigudinho). Milad et al. (2009), em seu experimento de medo condicionado com ratos machos e fêmeas, também não observaram diferenças associadas ao sexo durante a fase de condicionamento, com os animais não diferindo na aprendizagem do medo nem mesmo quando considerada a fase do ciclo estral nas fêmeas.

Quando a recompensa alimentar teve seu lado invertido, houve um grande aumento no número de tentativas erradas, mas esses erros diminuíram nos dias subsequentes. Durante a aprendizagem reversa, houve maior número de respostas corretas para machos em relação às fêmeas nas sessões AR1 e AR2 ($F_{2,71} = 3,30$, $p < 0,05$), e maior número de erros das fêmeas em relação aos machos em AR1 e AR2 ($F_{2,71} = 3,30$, $p < 0,05$). Para o tempo de reação durante a aprendizagem, não houve diferença entre sexos ($F_{1,44} = 2,11$, $p > 0,05$). Não foram observadas omissões para machos ou fêmeas durante a aprendizagem reversa. Os resultados apresentados aqui concordam com os achados de Reimer et al. (2018) que observaram pior desempenho das fêmeas na retenção de medo contextual dependente da fase estral e particularmente mais pronunciado durante as fases de baixo hormônio ovariano. O melhor desempenho dos machos em relação às fêmeas, nos dois primeiros dias de reversão de aprendizagem, foi diferente dos achados de Lucon-Xiccato & Bisazza (2014) com peixes. Em seu experimento de aprendizagem reversa de discriminação, conduzido em uma única sessão com 10 tentativa para cada animal, peixes machos mostraram o dobro de erros em relação às fêmeas antes de aprender a associação reversa entre cor-alimento.

A diferença observada entre machos e fêmeas durante a aprendizagem reversa no presente estudo não parece relacionada ao tempo necessário para realização de cada tentativa ou a alguma diferença locomotora, uma vez que não encontramos diferenças nas omissões (praticamente inexistentes) ou no tempo de reação para machos e fêmeas. O maior número de erros cometidos pelas fêmeas parece indicar menor flexibilidade (maior rigidez comportamental) para desvincular o comportamento de uma regra previamente aprendida e bem estabelecida, sugerindo a prevalência de comportamento habitual por mais tempo (LaClair et al., 2019; Aguirre et al., 2020). As diferenças observadas refletem um atraso, mais do que algo permanente, visto que as fêmeas passam a exibir um comportamento similar àquele apresentado pelos machos na terceira sessão de AR.

Figura 1 - Comparação entre as respostas de machos (azul) e fêmeas (vermelho)





Os pontos representam médias \pm EPM de 12 animais em 10 tentativas. * $p < 0,05$ entre machos e fêmeas.

Conclusões

O protocolo de aprendizagem reversa foi implantado com sucesso utilizando ratos Wistar machos e fêmeas em um labirinto em T, sendo necessária privação alimentar prévia de 23 h. Os erros cometidos na aprendizagem reversa foram visíveis principalmente no 1º dia. O desempenho dos ratos Wistar no protocolo experimental apresentou diferença entre sexos na aprendizagem reversa, com melhor desempenho dos machos. Influências hormonais podem contribuir para a diferença de desempenho entre machos e fêmeas e precisam ser exploradas em estudos futuros, com avaliação, por exemplo, da influência do ciclo estral sobre a aprendizagem reversa.

Referências bibliográficas

- Aguirre, C. G., Stolyarova, A., Das, K., Kolli, S., Marty, V., Ray, L., ... & Izquierdo, A. (2020). Sex-dependent effects of chronic intermittent voluntary alcohol consumption on attentional, not motivational, measures during probabilistic learning and reversal. *PLoS one*, 15(6), e0234729.
- Armbruster, D. J., Ueltzhöffer, K., Basten, U., & Fiebach, C. J. (2012). Prefrontal cortical mechanisms underlying individual differences in cognitive flexibility and stability. *Journal of cognitive neuroscience*, 24(12), 2385-2399.
- Dajani, D. R., & Uddin, L. Q. (2015). Demystifying cognitive flexibility: Implications for clinical and developmental neuroscience. *Trends in neurosciences*, 38(9), 571-578.
- Deacon, R. M., & Rawlins, J. N. P. (2006). T-maze alternation in the rodent. *Nature protocols*, 1(1), 7.
- Izquierdo, A., Brigman, J. L., Radke, A. K., Rudebeck, P. H., & Holmes, A. (2017). The neural basis of reversal learning: an updated perspective. *Neuroscience*, 345, 12-26.
- LaClair, M., Febo, M., Nephew, B., Gervais, N. J., Poirier, G., Workman, K., ... & Lacreuse, A. (2019). Sex differences in cognitive flexibility and resting brain networks in middle-aged marmosets. *ENEURO*, 6(4).
- Lensi, P., Cassano, G. B., Correddu, G., Ravagli, S., Kunovac, J. L., & Akiskal, H. S. (1996). Obsessive-compulsive disorder. Familial-developmental history, symptomatology, comorbidity and course with special reference to gender-related differences. *The British Journal of Psychiatry*, 169(1), 101-107.
- Lucon-Xiccato, T., & Bisazza, A. (2014). Discrimination reversal learning reveals greater female behavioural flexibility in guppies. *Biology Letters*, 10(6), 20140206.
- Milad, M. R., Igoe, S. A., Lebron-Milad, K., & Novales, J. E. (2009). Estrous cycle phase and gonadal hormones influence conditioned fear extinction. *Neuroscience*, 164(3), 887-895.
- Reimer, A. E., de Oliveira, A. R., Diniz, J. B., Hoexter, M. Q., Miguel, E. C., Milad, M. R., & Brandão, M. L. (2018). Fear extinction in an obsessive-compulsive disorder animal model: Influence of sex and estrous cycle. *Neuropharmacology*, 131, 104-115.
- Rommelink, E., Smit, A. B., Verhage, M., & Loos, M. (2016). Measuring discrimination-and reversal learning in mouse models within 4 days and without prior food deprivation. *Learning & Memory*, 23(11), 660-667.
- Tezcan, D., Tumkaya, S., & Bora, E. (2017). Reversal learning in patients with obsessive-compulsive disorder (OCD) and their unaffected relatives: Is orbitofrontal dysfunction an endophenotype of OCD? *Psychiatry research*, 252, 231-233.
- Tsaltas, E., Kontis, D., Chrysikakou, S., Giannou, H., Biba, A., Pallidi, S., ... & Rabavilas, A. (2005). Reinforced spatial alternation as an animal model of obsessive-compulsive disorder (OCD): investigation of 5-HT2C and 5-HT1D receptor involvement in OCD pathophysiology. *Biological Psychiatry*, 57(10), 1176-1185.