

DESNUTRIÇÃO PROTEICA PRECOCE REDUZ O INTERVALO ENTRE TENTATIVAS DE RATOS EM TAREFA DE DISCRIMINAÇÃO CONDICIONAL

EARLY PROTEIN UNDERNUTRITION REDUCES ADULT RATS' INTERTRIAL INTERVAL DURING CONDITIONAL DISCRIMINATION TASK

EDSON MELLO DA SILVA

LUIZ MARCELLINO DE OLIVEIRA[†]

SEBASTIÃO DE SOUSA ALMEIDA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, SÃO PAULO, BRASIL

RESUMO

A má nutrição precoce gera efeitos deletérios graves no crescimento, no comportamento e nas capacidades cognitivas de diferentes organismos, sendo a desnutrição proteica a principal insuficiência nutricional que pode ser examinada individualmente em estudos experimentais. O objetivo deste estudo foi testar o procedimento de correção de tentativas diretamente no treino de discriminação condicional, comparando o desempenho de animais previamente desnutridos e recuperados nutricionalmente, com o desempenho de animais controles. As curvas de desempenho dos grupos não indicaram uma melhora significativa nos acertos ao longo das sessões, mas ao final do treino os animais submetidos ao procedimento de correção de tentativas apresentaram melhor desempenho do que os animais não submetidos à correção. Os animais desnutridos apresentaram IETs médios menores do que os IETs apresentados pelos animais bem nutridos. Entre os fatores apontados como responsáveis pela não aprendizagem da discriminação condicional, destacam-se a programação da contingência e a disposição espacial aleatória dos estímulos de escolha durante o treino.

Palavras-chave: desnutrição proteica; aprendizagem; discriminação condicional; correção de tentativas; IET.

ABSTRACT

Early malnutrition generates severe deleterious effects on growth, behavior and cognitive abilities of different organisms, and protein malnutrition is the main nutritional insufficiency that can be examined individually in experimental studies. The aim of this study was to establish conditional discriminations in rats, comparing malnourished animals which have received nutritional recovery with control ones, and test the effects of a correction procedure. Even though animals under the correction procedure have performed better than the animals not submitted to it, their performances did not improve during training sessions. Malnourished animals showed lower average ITIs than well-nourished animals. Contingency planning and the random spatial presentation of choice stimuli are the factors pointed out as potentially responsible for the absence of a learning curve to the conditional discrimination, at the end of training.

Keywords: protein malnutrition; learning; conditional discrimination; correction procedure; ITI.

Os autores agradecem a Andréia Schmidt pelos comentários a este trabalho.

A realização desta pesquisa teve apoio financeiro da CAPES, incluindo a concessão de bolsa de mestrado ao primeiro autor. Correspondência editorial para Edson Mello da Silva. Endereço: – Rua Peter Lund, 38, Bl. A-1, apto. 306 – CEP 20930-390 – Bairro Caju – Rio de Janeiro – RJ –Brasil. E-mail: edsonms@gmail.com

A má nutrição é um problema mundial, sendo o principal fator não genético causador de distúrbios no desenvolvimento cerebral (Feoli et al., 2006; Galler, Shumsky, & Morgane, 1995). Grande ênfase tem sido dada à investigação acerca da má nutrição proteica, por ser a principal insuficiência nutricional examinada individualmente em estudos experimentais (Morgane et al., 1993). As proteínas são macromoléculas biológicas formadas por grandes polímeros contendo cerca de 300 aminoácidos, e foram consideradas como os primeiros nutrientes essenciais ao organismo, por desempenharem diversas funções estruturais, de transporte, regulação e defesa (Brody, 1999; Tirapegui, Castro, & Rossi, 2005; Zucoloto, 2013).

Os estudos acerca da má nutrição proteica utilizam-se do conceito de período crítico de desenvolvimento, no qual a maturação do sistema nervoso central é vista como um processo em que ocorrem períodos de rápidas mudanças organizacionais, nos quais o sistema nervoso fica mais vulnerável aos insultos nutricionais (Feliciano, 2007; Feliciano, de Souza, & de Oliveira, 2007; Morgane et al., 1993; Morgane, Mokler, & Galler, 2002). A hipótese do período crítico relaciona os insultos cerebrais decorrentes da má nutrição ao desenvolvimento do organismo, possibilita a comparação de diferentes espécies quanto ao período de desenvolvimento cerebral, e mostra a proporção dos jorros de crescimento cerebral quanto à ocorrência pré ou pós-natal (Morgane et al., 1993).

De um modo geral, no rato, o período crítico inicia-se na última semana de gestação e se estende até o 35º dia de vida pós-natal (Morgane et al., 1993). Quando ocorre nos períodos críticos de desenvolvimento do sistema nervoso central, a má nutrição proteica desencadeia efeitos neuroquímicos (Feoli et al., 2006; Mokler, Torres, Galler, & Morgane, 2007), neuroanatômicos (Galler et al., 1995) e comportamentais (Collier, Squibb, & Hamlin, 1975; Levitsky, 1975, 1979; Mokler et al., 2007; Riul, Carvalho, Almeida, De Oliveira, & Almeida, 1999; Rocinholi, Almeida, & De Oliveira, 1997; Strupp, & Levitsky, 1995; Wainwright, & Colombo, 2006).

Entre os efeitos neuroquímicos encontram-se a redução dos níveis extracelulares de dopamina no córtex pré-frontal medial (Mokler et al., 2007) e o aumento da concentração de radicais livres no cérebro (Feoli et al., 2006). As alterações neuroanatômicas decorrentes da desnutrição proteica envolvem a redução da ramificação e das espinhas dendríticas e também das conexões sinápticas, além de prejudicar o desenvolvimento de células granulares (Galler et al., 1995). No rato, as alterações neuroanatômicas decorrentes da má nutrição no período do nascimento até o 35º dia de vida pós-natal ocorrem principalmente na formação hipocampal, no cerebelo e no bulbo olfatório (Galler et al., 1995; Morgane et al., 1993).

Quanto às alterações comportamentais, a má nutrição proteica reduz o limiar de respostas a estímulos aversivos como o choque (Rocinholi, Almeida, & De Oliveira, 1997), modifica a interação entre mãe e filhotes

(Riul et al., 1999) e altera a resposta de monoaminas ao estresse (Mokler et al., 2007). Os efeitos deletérios sobre as funções cognitivas do organismo não são totalmente eliminados, ainda que ocorra a recuperação nutricional do organismo (Collier et al., 1975; Strupp, & Levitsky, 1995; Tirapegui et al., 2005; Wainwright, & Colombo, 2006).

De acordo com Levitsky (1979), a má nutrição não prejudica a aprendizagem de discriminações simples em ratos, tornando necessária a utilização de procedimentos mais complexos, como a discriminação condicional, para o estudo dos efeitos da má nutrição proteica sobre a aprendizagem. Os experimentos de Lashley, em 1938, são apontados como os primeiros a tratar de desse tipo de tarefa, caracterizada pelo fato da contingência de três termos estar sob controle de um estímulo antecedente. Assim, a função de um estímulo como S^+ está condicionada a algum outro aspecto ambiental, chamado estímulo condicional (S^C) (Lopes Jr., & Matos, 1995). Cumming e Berryman (1965) mostraram a diferença entre a discriminação simples e a condicional: na discriminação simples o S^+ funciona como um seletor de relações respostas-consequências, enquanto que na discriminação condicional o S^C funciona como um “seletor de discriminações” (p.286). Dessa forma, um S^C faria com que a resposta a um estímulo específico, e não a outros, fosse seguida de reforço, definindo a função deste como S^+ . Mudando o S^C , muda também o estímulo que funciona como S^+ .

A aprendizagem de discriminações condicionais tem sido investigada em diferentes tipos de procedimentos, sendo um deles o de emparelhamento ou escolha de acordo como o modelo (*matching-to-sample* – MTS) (Cumming, & Berryman, 1961, 1965). A tarefa de MTS consiste na apresentação de estímulos condicionais, chamados também de estímulos modelo, aos quais os sujeitos devem apresentar uma resposta que tem como consequência a apresentação dos estímulos de comparação. No MTS ocorre discriminação condicional se os indivíduos emitirem a resposta de escolha somente aos estímulos de comparação com função de S^+ , sendo que é o estímulo modelo que define as funções S^+ e S^- dos estímulos de comparação (Cumming, & Berryman, 1965; Debert, 2003; Iversen, 1993, 1997; Sidman, & Tailby, 1982).

Diversos estudos mostram que há relativa facilidade no ensino de discriminações condicionais para seres humanos em tarefas de MTS (Medeiros, Ribeiro, & Galvão, 2003; Sidman, & Tailby, 1982), com importantes implicações práticas deste tipo de aprendizagem (e.g., Hanna et al., 2011; Haydu, Costa, & Pullin, 2006; Lima, de Souza, Martinez, & Rocca, 2010; Matos, Hübner, Serra, Basaglia, & Avanzzi, 2002). Para organismos não humanos são encontrados estudos sobre a aprendizagem de discriminações condicionais por meio de procedimentos de MTS com diferentes espécies, como macacos (Barros, Galvão, & McIlvane, 2002; Iversen, Sidman, & Carrigan, 1986; McIntire, Cleary, & Thompson, 1987), abelhas (Carli, 1977; Moreno, Souza,

& Reinhard, 2012; Pessotti, 1981) e ratos (Feliciano, 2007; Feliciano et al., 2007; Iversen, 1993, 1997).

Iversen (1993) empregou procedimento e equipamento similares aos de Cumming e Berryman (1961) para estudar discriminação condicional em ratos. Cada tentativa começava com um estímulo apresentado em um círculo central de uma parede de uma caixa operante. Ao pressionar o círculo central com o focinho, o rato acionava os estímulos de comparação laterais. Os animais deveriam selecionar o estímulo lateral igual ao estímulo central (*identity matching-to-sample* – IMTS). Todos os animais atingiram o critério de 80% de acertos em até 25 sessões, porém Iversen (1993) constatou que pombos e seres humanos aprendiam o emparelhamento consideravelmente mais rápido do que os ratos.

Com base no estudo de Iversen (1993), Feliciano (2007; Feliciano et al., 2007) delimitou um experimento no qual ratos, desnutridos recuperados e controles, passaram por um treino de discriminação simples seguido pela reversão da discriminação e, finalmente, por treino de discriminação condicional. Foram utilizadas caixas operantes que continham em uma das paredes laterais uma barra, que os animais deveriam pressionar para ativar os estímulos, e na parede oposta, três túneis nos quais os animais deveriam colocar o focinho (resposta de *nose poke*). Acima de cada túnel havia um mostrador onde podia ser apresentado um triângulo, uma linha vertical, ou não haver a apresentação de qualquer estímulo. No treino de discriminação condicional, ao apertar a barra os animais ativavam estímulos condicionais sonoros junto com os estímulos luminosos. Quando o som era constante, a linha tinha a função de S^+ , enquanto que quando o som era pulsante, o triângulo tinha a função de S^+ . Não ocorreu aprendizagem da discriminação condicional, com o desempenho dos grupos variando entre 40 e 55% de acertos ao longo das 70 sessões de treino (Feliciano, 2007; Feliciano et al., 2007). Outros estudos indicam a dificuldade de se estabelecer desempenhos condicionais com ratos, sobretudo em tarefas de emparelhamento arbitrário de estímulos (*arbitrary matching to sample* – AMTS), como o empregado por Feliciano (e.g., Iversen, 1993, 1997 – mas, ver Nakagawa, 2005).

Uma maneira de se facilitar o processo de aprendizagem de discriminações condicionais é o emprego do procedimento de correção de tentativas (Iversen, 1993). Neste procedimento, cada erro em uma tentativa é seguido pela repetição da mesma configuração de estímulos na tentativa imediatamente seguinte (Catania, 1999; Kangas & Branch, 2008). Iversen (1993) afirma que o procedimento de correção é importante por evitar que o aprendiz desenvolva preferência por algum estímulo ou alguma posição na qual possa responder. Considerando a indicação de Iversen, o objetivo deste estudo foi testar o procedimento de correção de tentativas diretamente no treino de discriminação condicional empregado por Feliciano (2007), comparando o desempenho de animais (ratos) com histórico de desnutrição seguida por recuperação nutricional, com o desempenho de animais controles.

MÉTODOS

Sujeitos

Neste experimento foram utilizados 48 ratos albinos machos, da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, provenientes do Biotério Central da USP de Ribeirão Preto, divididos em quatro grupos com 12 animais cada. Ratas com filhotes foram recebidas e alojadas, no dia do nascimento, no biotério do Laboratório de Nutrição e Comportamento da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP. Os filhotes foram agrupados e distribuídos aleatoriamente entre as ratas mães para a formação das ninhadas. Cada ninhada foi composta por uma rata-mãe, seis filhotes machos e duas fêmeas, colocadas em gaiolas de polipropileno (41 x 34 x 17 cm) forradas com raspa de madeira e mantidas com água e ração à vontade.

Os filhotes e as ratas mães foram pesados semanalmente, quando era feita a troca das raspa de madeira. Aos 21 dias de idade dos filhotes, as fêmeas foram sacrificadas, e os filhotes machos, colocados em gaiolas individuais (30 x 20 x 17 cm), com água e dieta à vontade. Os ratos foram mantidos desta forma até atingirem 70 dias de idade, quando começaram as manipulações experimentais. Do 70º ao 77º dias, cada rato foi pesado diariamente para o cálculo da média do peso dos animais com água e dieta à vontade. A partir do 78º dia teve início a restrição de água, que durou até que os animais atingissem 85% do peso médio, que foi mantido durante o período de treino. No início do treino de discriminação, foi aceita uma variação de peso de 80% a 90% do peso médio.

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (C.E.U.A.) do *Campus* de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Dietas

Dois grupos foram mantidos com dietas contendo 16% de proteína, constituindo-se como grupos controles (C), enquanto os outros dois grupos receberam dietas contendo 6% de proteína, constituindo-se como grupos desnutridos (D). As dietas isocalóricas foram preparadas conforme Reeves, Nielsen e Fahey Jr. (1993), com acréscimo de metionina, aminoácido deficitário na caseína (Santucci et al, 1994). No período de lactação, as ratas mães foram alimentadas com uma das dietas descritas acima. No período de pós-lactação, os filhotes machos receberam o mesmo tipo de dieta consumido pelas ratas mães. A partir dos 36 dias de idade, os animais dos quatro grupos passaram a receber dieta comercial (Ração Comercial, Nuvilab, da Nuvital, Colombo, PR).

Equipamentos

Foram utilizadas duas caixas de condicionamento operante (32,6 x 34,5 x 21 cm), idealizadas pelo Dr. Luiz Marcellino de Oliveira e produzidas pela Insight Equipamentos Científicos. Cada caixa continha uma barra na parede lateral esquerda. A parede lateral direita de cada caixa estava dividida em três partes, formando um ângulo de 45º entre a parte central e as partes contíguas a esta. Em cada subdivisão da parede lateral direita da caixa, a 2,2 cm

do piso da caixa, foi instalado um túnel (3 cm de diâmetro e 5 cm de profundidade) no qual era liberado o reforço (água). Na entrada dos túneis foram instalados sensores para o registro das respostas de colocação do focinho (*nose poke*) no túnel. Acima de cada túnel, havia um sistema de apresentação dos estímulos utilizados nas diversas fases do procedimento. Foram empregados os seguintes estímulos: a) linha vertical, com 12 mm de altura e triângulo com 12 mm de base e 11,5 mm de altura (Figura 1); b) som (constante ou pulsante), apresentado em um alto-falante localizado acima dos bebedouros. A apresentação dos estímulos e o registro das respostas foram comandados por um computador modelo IBM-PC e uma interface Intercom 2000 (Insight Equipamentos Científicos). As caixas de condicionamento operante foram instaladas em câmaras de isolamento (55 X 55 X 55 cm). Um ventilador permaneceu constantemente ligado para mascarar ruídos externos.

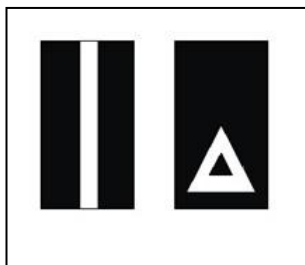


Figura 1. Estímulos visuais, linha e triângulo, empregados como estímulos de comparação no experimento.

Procedimento

O procedimento foi dividido em duas fases: *pré-treino* e *treino de discriminação condicional*.

Pré-treino. O objetivo dessa fase foi ensinar o animal a resposta de focinhar nos túneis e de pressionar a barra, cuja consequência (água) era apresentada em um dos túneis da caixa. Na primeira sessão de treino, os animais tiveram a resposta de *nose poke* reforçada 100 vezes em esquema CRF no túnel central, acima do qual havia um estímulo luminoso (luz acesa). Nas duas sessões seguintes, foi realizada a modelagem da resposta de pressão à barra, que recebeu 120 reforços em esquema CRF, no túnel em que o estímulo luminoso era apresentado. O túnel em que a água seria disponibilizada variava a cada tentativa, sendo o correto aquele em que o estímulo luminoso era apresentado. Portanto o operante a ser usado na discriminação condicional consistia em pressionar a barra na parede esquerda, locomover-se até a parede direita e focinhar um dos painéis no qual estivesse apresentado o S^+ .

Treino de discriminação condicional. Após a modelagem da resposta de pressão à barra, os animais passaram ao treino de discriminação condicional. As sessões do treino de discriminação foram programadas para durar 120 tentativas. Nesta fase, a resposta de pressão à barra acionava simultaneamente o estímulo condicional (SC) sonoro, juntamente com os estímulos visuais “linha vertical” e “triângulo”. A localização dos estímulos visuais

(comparações) nas diversas tentativas foi aleatória. O estímulo sonoro (modelo) podia ser constante ou pulsante, sendo alternado a cada bloco de 30 tentativas. Durante a apresentação do som constante, apenas a resposta ao túnel com o estímulo “linha” recebia reforço. Durante a apresentação do som pulsante, a resposta ao túnel com “triângulo” era reforçada. Cada tentativa começava com a resposta de pressão à barra e terminava com a resposta de *nose poke*. O intervalo entre as tentativas (IET) não era programado; como o estímulo modelo era acionado pela resposta de pressão à barra, o IET dependia do desempenho de cada animal.

Dois grupos, um controle e um desnutrido, foram submetidos ao procedimento de correção de tentativas; os outros dois grupos foram submetidos apenas ao procedimento de discriminação condicional. Na correção de tentativas, a disposição dos estímulos visuais nos túneis repetia a disposição apresentada na tentativa imediatamente anterior, caso esta tivesse sido encerrada com uma resposta incorreta. Tentativas terminadas com uma resposta correta não geravam a repetição da mesma disposição dos estímulos na tentativa seguinte. O critério de encerramento do procedimento era de pelo menos 80% de acertos em três sessões consecutivas, ou 50 sessões de treino.

RESULTADOS

Os dados de peso corporal das ratas mães, foram submetidos à ANOVA 2 X 4 (Dieta X Dias de lactação), com medidas repetidas para o fator dias. Houve um efeito significativo do fator dia [$F(3, 27) = 150,93, p < 0,05$], indicando a perda de peso das ratas de ambos os grupos nutricionais durante o período de lactação. Também houve um efeito de interação entre os fatores dieta e dia [$F(3, 27) = 44,81, p < 0,05$], indicando ausência de diferenças nos pesos corporais entre as ratas desnutridas e controles nos dias 0 e 7, e um menor peso das ratas desnutridas quando comparadas aos controles nos dias 14 e 21. Não houve efeito significativo para o fator dieta.

No período de lactação, os pesos das ninhadas foram analisados por uma ANOVA 2 X 4 (Dieta X Dias de lactação), com medidas repetidas no fator dias de lactação. Houve um efeito significativo para o fator dieta [$F(1, 9) = 196,31, p < 0,05$], com as ninhadas controles apresentando um ganho de peso significativamente maior do que as desnutridas. Também houve um efeito do fator dia [$F(3, 27) = 991,58, p < 0,05$], indicando que as ninhadas de ambos os grupos nutricionais ganharam peso durante o período de lactação. Por fim, houve um efeito de interação entre os fatores dieta e dia [$F(3, 27) = 298, p < 0,05$], indicando ausência de diferenças nos pesos corporais entre as ninhadas controles e desnutridas no dia 0 e um menor peso das ninhadas desnutridas, quando comparadas às ninhadas controles, nos dias 7, 14 e 21.

No período de pós-lactação, os pesos dos filhotes machos foram analisados por uma ANOVA 2 X 3 (Dieta X Dias), com medidas repetidas no fator dias. Houve um efeito significativo do fator dieta [$F(1, 46) = 194,71, p < 0,05$], com os animais controles apresentando um ganho de peso significativamente maior do que os desnutridos.

Também houve um efeito do fator dia [$F(2, 92) = 986,46$, $p < 0,05$], indicando que apenas os animais controles apresentaram um ganho de peso significativo, quando comparados aos animais desnutridos. Por fim, houve um efeito de interação entre os fatores dieta e dia [$F(2, 92) = 787,56$, $p < 0,05$], indicando diferenças significativas entre os pesos corporais dos ratos controles e desnutridos durante todo o período (Figura 2).

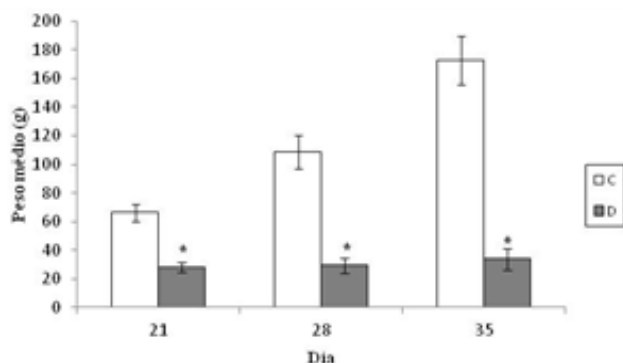


Figura 2. Peso corporal dos filhotes durante o período de pós-lactação. Controles (C) e Desnutridas (D). As colunas indicam o valor médio dos pesos e as barras de erro o desvio padrão. * Efeito de dieta.

No período de recuperação nutricional, os pesos dos machos foram analisados por uma ANOVA 2 X 7 (Dieta X Dias), com medidas repetidas no fator dias. O peso corporal médio dos animais que passaram por desnutrição não atingiu o peso corporal médio dos animais controles (Figura 3). Houve um efeito significativo do fator dieta [$F(1, 36) = 591,1$, $p < 0,05$], com os animais controles apresentando um ganho de peso maior do que os animais desnutridos. Também houve um efeito do fator dia [$F(6, 216) = 1001,31$, $p < 0,05$], indicando que os ratos de ambos os grupos nutricionais ganharam peso durante o período de recuperação nutricional. Finalmente, houve um efeito de interação entre os fatores dieta e dias [$F(6, 216) = 24,65$, $p < 0,05$], mostrando um menor peso dos ratos desnutridos quando comparados aos controles, durante todo o período (Figura 3).

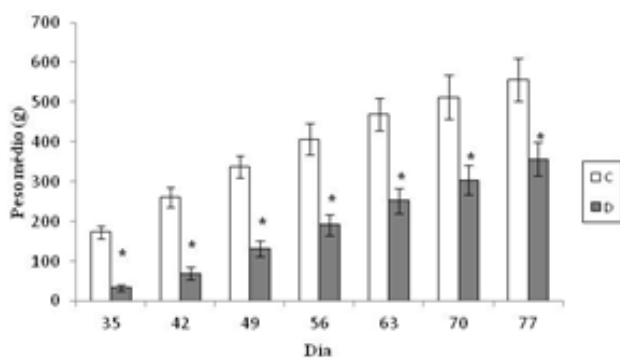


Figura 3. Peso corporal dos filhotes durante o período de recuperação nutricional. Controles (C) e Desnutridas (D). As colunas indicam o valor médio dos pesos e as barras de erro o desvio padrão. * Efeito de dieta.

Nenhum dos animais atingiu o critério de aprendizagem estabelecido, ou seja, o experimento foi encerrado para todos os sujeitos na 50ª sessão. Os dados referentes aos acertos na discriminação condicional foram analisados por uma ANOVA 2 x 2 x 10 (Dieta X Correção X Bloco de sessões), com medidas repetidas para o fator bloco (cada bloco apresenta o resultado médio de cinco sessões experimentais). Houve um efeito significativo do fator correção [$F(1, 44) = 1457,26$; $p < 0,05$], ou seja, os animais dos grupos submetidos à correção apresentaram média de acertos maior quando comparados aos animais dos grupos que não passaram pela correção de tentativas. Também houve um efeito significativo do fator bloco [$F(9, 396) = 16,51$; $p < 0,05$], com o bloco 1 apresentando média de acertos significativamente menor do que os demais. A média de acertos no bloco 2 foi estatisticamente menor quando comparado aos blocos 4, 5 e 9 (Figura 4). Houve efeito significativo da interação entre os fatores correção e bloco [$F(9, 396) = 15,35$; $p < 0,05$], com os animais dos grupos submetidos à correção apresentando média de acertos estatisticamente menor no bloco 1 quando comparado aos demais blocos. Os animais dos grupos submetidos à correção apresentaram desempenho médio significativamente maior, ao longo dos blocos de tentativas, quando comparados aos animais não submetidos à correção. Entre os animais que não passaram pelo procedimento de correção, não houve diferença estatisticamente significativa no desempenho entre as sessões (Figura 4). Não houve efeitos significativos do fator dieta, nem das interações dieta x correção, dieta x bloco e dieta x correção x bloco.

Os dados referentes ao intervalo entre tentativas (IET), na discriminação condicional, foram analisados por uma ANOVA 2 x 2 x 10 (Dieta X Correção X Bloco), com medidas repetidas para o fator bloco. Houve um efeito significativo do fator dieta [$F(1, 44) = 8,28$, $p < 0,05$], com os animais dos grupos desnutridos apresentando IET médio menor quando comparados aos animais dos grupos controles. Também houve um efeito significativo do fator bloco [$F(9, 396) = 14,09$, $p < 0,05$], com o bloco 1 apresentando IET médio significativamente maior do que os demais (Figura 5). Apesar de não se ter verificado efeito significativo para as interações entre fatores, pode-se observar que no bloco 1 os animais desnutridos apresentaram IET médio superior ao IET médio dos blocos 2 a 10 dos animais controles (Figura 5). Não houve efeitos significativos do fator correção, nem das interações dieta x bloco, dieta x correção, correção x bloco, e dieta x correção x bloco.

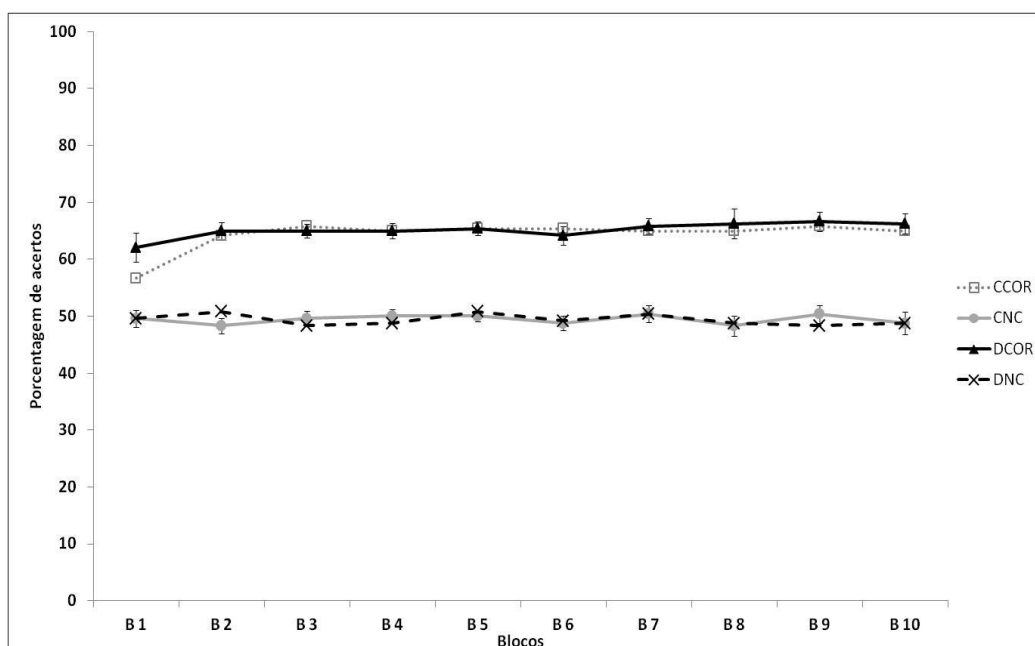


Figura 4. Porcentagem média de acertos na discriminação condicional, em blocos de cinco sessões. Grupos: CCOR – animais controles submetidos à correção; CNC – animais controles não submetidos à correção; DCOR – animais desnutridos submetidos à correção; DNC – animais desnutridos não submetidos à correção. Os pontos indicam a mediana dos acertos por sessão e as barras de erro o intervalo semi-interquartilico.

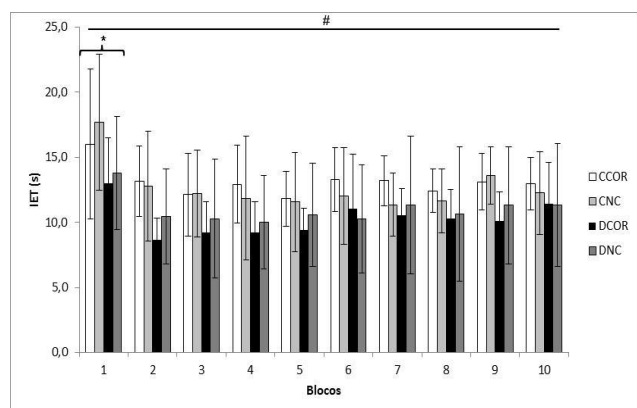


Figura 5. Intervalo entre tentativas (IET) médio nos blocos de tentativas na discriminação condicional. Grupos: CCOR – animais controles submetidos à correção; CNC – animais controles não submetidos à correção; DCOR – animais desnutridos submetidos à correção; DNC – animais desnutridos não submetidos à correção. As colunas indicam o IET médio por sessão e as barras de erro o desvio padrão. * Efeito de bloco. # Efeito de dieta.

DISCUSSÃO

Ratas mães alimentadas com a dieta hipoproteica perderam mais peso durante o período de lactação do que ratas mães alimentadas com dieta comercial. Estes resultados apontam para uma maior perda de peso pelas ratas mães desnutridas relacionada ao maior consumo energético devido aos cuidados com a prole (Riul et al., 1999), bem como à utilização das proteínas na geração de energia resultante da menor ingestão de dieta (Feliciano, 2007; Tirapegui et al., 2005). Mesmo não tendo sido

observada a ocorrência de efeito principal para o fator dieta, as ratas desnutridas apresentaram maior perda de peso do que as ratas controles durante o período de lactação.

A comparação entre os pesos dos sujeitos experimentais desnutridos e controles, no período de pós-lactação, indica que os animais desnutridos atingiram, no máximo, um quarto do peso dos animais controles. Esta diferença entre grupos nutricionais é amplamente documentada, mostrando a eficácia do procedimento em causar o insulto nutricional (Almeida, & De Araújo, 2001; Feoli et al., 2006; Riul et al., 1999; Rocinholi et al., 1997; Vilela et al., 2005). Devido à restrição proteica na dieta consumida pelas ratas mães desnutridas durante o período de lactação, provavelmente houve uma redução na disponibilidade de aminoácidos para síntese de proteínas do leite, o que teria gerado a perda de peso da prole dessas ratas (Passos, Ramos, & Moura, 2000).

No período de recuperação nutricional, no qual todos os animais passaram a receber dieta comercial, os animais previamente desnutridos apresentaram rápido ganho de peso, mas não atingiram o peso dos animais controles. Tomados em conjunto, os dados de peso corporal dos animais indicam que a desnutrição proteica precoce gera efeitos irreversíveis no desenvolvimento do organismo, mesmo que posteriormente seja fornecida uma dieta adequada (Lucas, 1998; Stevenson, 2006).

Os resultados apresentados em relação ao treino da discriminação condicional podem ser analisados em relação à aprendizagem da discriminação propriamente dita, assim como em relação os valores dos IETs, para todos os grupos estudados.

O procedimento de ensino de discriminações condicionais empregado foi semelhante a outros empregados na literatura (e.g., Iversen, 1993), mas a modalidade dos estímulos e a natureza das relações ensinadas foram diferentes. De modo geral, os estudos sobre discriminação condicional com ratos empregam uma modalidade única de estímulos (e.g., estímulos olfatórios – Peña, Pitts & Galizio, 2006; estímulos visuais – Nakagawa, 2005) e tarefas de IMTS (April, Bruce & Galizio, 2011; Iversen, 1993, 1997). O ensino de relações condicionais arbitrárias via tarefas de MTS para ratos é pouco comum e, para tentar minimizar as dificuldades encontradas em outros estudos, optou-se por adotar um procedimento de correção de tentativas. O procedimento empregado teve um efeito significativo no desempenho dos sujeitos. Os animais submetidos à correção apresentaram desempenho superior ao dos animais que não passaram pela correção, como em outros estudos que empregaram o mesmo tipo de procedimento (e.g., Cook, Geller, Zhang, & Gowda, 2004; Kangas & Branch, 2008). De acordo com Mackay (1991), a correção de tentativas facilita a aprendizagem de uma discriminação condicional em uma tarefa de MTS porque previne ou corrige preferências por estímulo ou por posição ao reforçar seletivamente a alternância das respostas de seleção entre as posições após um erro. Iversen (1993) pondera, porém, sobre a necessidade de monitorar um possível efeito indesejado dessa correção, que é o fortalecimento da alternância de respostas entre as posições, o que pode interferir na aprendizagem da discriminação. Na presente pesquisa, porém, a despeito do efeito significativo da correção sobre os desempenhos dos grupos Desnutrido Correção (DCOR) e Controle Correção (CCOR), tal melhora não foi significativa ao longo das sessões, de tal forma que os sujeitos atingissem o critério de aprendizagem.

A ausência de aprendizagem da discriminação condicional pode ser atribuída à programação de contingências às quais os animais foram submetidos. Um primeiro ponto a ser discutido é a natureza dos estímulos de comparação empregados. Alguns autores apontam a dificuldade de ratos para aprender discriminações com estímulos visuais (Minini & Jeffery, 2006; Nakagawa, 2005). Minini e Jeffery (2006), por exemplo, afirmam que ratos, em função do seu sistema visual, tendem a ter seu comportamento controlado por diferenças de luminosidade em partes específicas dos estímulos, e não pelas figuras como um todo (Minini & Jeffery, 2006). Esse tipo de argumento, no entanto, pode ser minimizado pelos resultados obtidos por pesquisas que ensinaram discriminações visuais simultâneas simples para ratos, obtendo resultados positivos (e.g., Cook et al., 2004; Markham, Butt, & Dougher, 1996), inclusive com os mesmos estímulos e aparato empregados no presente estudo (Souza & Schmidt, 2014). Parece, pois, que mais importante que a natureza visual dos estímulos de comparação empregados, são as contingências requeridas na discriminação condicional, incluindo a forma de apresentação dos estímulos modelo e comparação ao longo das tarefas e a exigência para reforço, que muda

dependendo da configuração de estímulos modelo e de comparação.

Um parâmetro importante no MTS é a apresentação serial do estímulo condicional, ao qual o organismo deve emitir uma resposta de observação para que ocorra a apresentação dos estímulos de comparação, diante dos quais o organismo emitirá a resposta de escolha, que poderá ser reforçada ou não (Barros et al., 2002; Cumming, & Berryman, 1965; Iversen, 1993; Iversen et al., 1986; McIntire et al., 1987; Sidman, & Tailby, 1982). No presente estudo, assim como em Feliciano (2007), ao invés de uma apresentação serial dos estímulos sonoros e visuais, a resposta de pressão à barra acionava simultaneamente o estímulo modelo e os estímulos de comparação. A apresentação simultânea de estímulos de diferentes naturezas (auditiva e visual) e a ausência de uma resposta de observação específica ao modelo (REF) pode ter contribuído para que o som não exercesse o controle condicional necessário sobre o desempenho de escolha dos sujeitos ao longo do treino. Isso quer dizer que o procedimento proposto não foi capaz de produzir um controle de estímulos relacional, i.e., controle exercido por uma relação arbitrariamente estabelecida entre os estímulos modelo e comparação, ao invés de um controle específico (ou absoluto) por uma característica física de um estímulo, como ocorreria em uma discriminação simples (McIlvane & Dube, 1992). Os resultados deste estudo sugerem que o desempenho dos animais manteve-se ao nível do acaso exatamente porque a contingência de MTS simultâneo, sem a resposta de observação ao modelo, não favoreceu o estabelecimento do controle relacional entre os estímulos.

Outro fator a ser considerado nos resultados da aquisição da discriminação condicional é a disposição dos estímulos de comparação em relação aos estímulos condicionais. Iversen (1997), ilustrou essa possibilidade com ratos que já haviam aprendido a emparelhar estímulos luminosos por identidade. Os ratos foram então submetidos a treinos de discriminações condicionais nos quais tanto o estímulo condicional como os de comparação eram apresentados em locais específicos, em uma disposição de três chaves horizontais com o estímulo condicional apresentado na chave central e os de comparação nas chaves laterais. Nessa condição, a disposição espacial dos estímulos tornou-se um aspecto importante na aprendizagem da discriminação complexa. Iversen verificou que, embora a topografia de respostas sugerisse que os animais haviam aprendido as discriminações condicionais, quando os estímulos foram apresentados em localizações variáveis, o estímulo condicional deixou de controlar a resposta aos estímulos de comparação. Da mesma forma que em Feliciano (2007), no presente estudo a localização aleatória dos estímulos visuais de comparação pode ter contribuído para o aumento da dificuldade da tarefa de discriminação condicional, visto que os estímulos de comparação podiam ser apresentados em qualquer túnel, inclusive no túnel central, onde era apresentado o estímulo condicional auditivo, e os animais podiam emitir a resposta de escolha em qualquer um dos túneis. Talvez neste estudo, da mesma forma que em Iversen (1997), o

desempenho dos ratos poderia ser melhor descrito como discriminações específicas envolvendo os estímulos visuais e suas localizações espaciais, ao invés de discriminações condicionais.

Ao analisar os valores de IET (que neste estudo caracterizou-se como uma variável dependente) dos diferentes grupos, verificou-se um efeito de dieta sobre o desempenho dos animais, uma vez que ao longo das sessões de discriminação condicional os animais desnutridos apresentaram um IET médio menor quando comparados aos respectivos controles, indicando que variáveis como a privação de água podem alterar a velocidade com a qual os animais encerram uma tentativa e iniciam a seguinte (Feliciano, 2007). Vários efeitos da desnutrição precoce sobre o comportamento dos animais na fase adulta já foram documentados em outros estudos (Hernandes, Françolin-Silva, Valadares, Fukuda, & Almeida, 2005; Valadares, Fukuda, Françolin-Silva, Hernandez, & Almeida, 2010). Um desses efeitos é o aumento da motivação por comida ou por água desses animais, quando expostos à privação (Laus, Vales, Costa, & Almeida, 2011). Essa sensibilidade aumentada aos reforçadores, em função da privação, pode ter relação com os resultados obtidos nos IETs dos grupos, uma vez que os ratos desnutridos reiniciavam as tentativas mais rapidamente que os controles. Esse dado necessita de investigação mais ampla, pois pode indicar um efeito ainda pouco estudado em animais submetidos à desnutrição precoce.

Os resultados descritos sugerem a necessidade de se encontrar soluções metodológicas capazes de favorecer a aprendizagem de discriminações condicionais com ratos, importante para o estudo dos efeitos da desnutrição sobre a aprendizagem complexa desses animais. Estudos empregando estímulos olfatórios e IMTS demonstraram a ocorrência de emparelhamento generalizado por identidade em ratos (April et al., 2011; Peña et al., 2006). Nesses estudos, respostas de observação são exigidas do animal, o que pode ter aumentado o grau de contato deles com aspectos relevantes do estímulo e favorecido o desempenho relacional exigido na tarefa. A exigência de uma resposta de observação na situação experimental proposta deve ser uma mudança a ser implementada em estudos futuros, assim como a utilização de uma mesma modalidade de estímulo para o estímulo modelo e os comparações. Além disso, procedimentos que estabeleçam o desempenho de IMTS em animais desnutridos podem ser de interesse, porque esse pode ser um passo inicial para o estabelecimento de relações arbitrária, como as requeridas no matching arbitrário ou AMTS (McIlvane & Dube, 1992). Estudos futuros devem seguir nessa direção.

Pode-se concluir que o modelo de desnutrição utilizado foi eficiente em gerar perda de peso nas ratas mães e distúrbios no desenvolvimento dos filhotes, provenientes das ninhadas que receberam dieta hipoproteica. Por não ter ocorrido a aquisição da discriminação condicional, devem ser feitas alterações no procedimento empregado, principalmente na programação das contingências. Por exemplo, o procedimento de correção melhorou o desempenho dos animais, mas não

parece ter sido suficientes para reduzir ou minimizar as dificuldades inerentes à tarefa que requer responder relacional.

Da mesma forma, as diferenças nos intervalos entre tentativas no treino de discriminação condicional apontam para a necessidade de se analisar aspectos motivacionais dos animais previamente desnutridos, em tarefas de aprendizagem.

REFERÊNCIAS

- Almeida, S. S., & de Araújo, M. (2001). Postnatal protein malnutrition affects play behavior and other social interactions in juvenile rats. *Physiology & Behavior*, 74, 45-51.
- April, L. B., Bruce, K., & Galizio, M. (2011). Matching and nonmatching-to-sample learning in rats using olfactory stimuli. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*, 96, 139-154.
- Barros, R. S., Galvão, O. F., & McIlvane, W. J. (2002). Generalized identity matching-to-sample in *Cebus apella*. *The Psychological Record*, 52, 441-460.
- Brody, T. (1999). *Nutritional biochemistry*. San Diego: Academic Press.
- Carli, M. R. (1977). A resposta de escolha de acordo com o modelo em abelhas: um procedimento. *Psicologia*, 3(2), 35-79.
- Catania, A. C. (1999). *Aprendizagem: comportamento, linguagem e cognição*. Porto Alegre: Artes Médicas.
- Collier, C., Squibb, R. L., & Hamlin, P. (1975). Protein malnutrition and complex learning in the chicken. In G. Serban (Ed.), *Nutrition and Mental Functions* (pp. 99-112). New York: Plenum Press.
- Cook, R. G., Geller, A. I., Zhang, G. R., & Gowda, R. (2004). Touchscreen-enhanced visual learning in rats. *Behavior Research Methods, Instruments, and Computers*, 36 (1), 101-106.
- Cumming, W. W., & Berryman, R. (1961). Some data on matching behavior in the pigeon. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*, 4, 281-284.
- Cumming, W. W., & Berryman, R. (1965). The complex discriminated operant: Studies of matching-to-sample and related problems. In D. I. Mostofsky (Ed.), *Stimulus generalization* (pp. 284-330). Stanford: University Press.
- Debert, P. (2003). *Relações condicionais com estímulos compostos* (Tese de Doutorado). Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Feliciano, E. A. O. (2007). *Discriminações simples e complexas em ratos: efeitos da desnutrição proteica e da estimulação* (Tese de Doutorado). Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- Feliciano, E. A. O., de Souza, D. G., & de Oliveira, L. M. (2007). Aquisição e reversão de discriminação em ratos desnutridos. *Revista Brasileira de Análise do Comportamento*, 3, 79-95.
- Feoli, A. M., Siqueira, I. R., Almeida, L., Tramontina, A. C., Vanzella, C., Sbaraini, S., & Gonçalves, C. A. (2006). Effects of protein malnutrition on oxidative status in rat brain. *Nutrition*, 22, 160-165.

- Galler, J. R., Shumsky, J. S., & Morgane, P. J. (1995). Malnutrition and brain development. In W. A. Walker, & J. Watkins (Eds.), *Nutrition in pediatrics* (pp. 3-58). New York: Plenum Press.
- Hanna, E. S., Kohlsdorf, M., Quinteiro, R. S., Melo, R. M., de Souza, D. G., de Rose, J. C., & McIlvane, W. J. (2011) Recombinative reading derived from pseudoword instruction in a miniature linguistic system. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*, 95, 21-41.
- Haydu, V. B., Costa, L. P., & Pullin, E. M. M. P. (2006). Resolução de problemas aritméticos: efeito de relações de equivalência entre três diferentes formas de apresentação do problema. *Psicologia: Reflexão e Crítica*, 19, 44-52.
- Hernandes, A. S., Françolin-Silva, A. L., Valadares, C. T., Fukuda, M. T. H., & Almeida, S. S. (2005). Effects of different malnutrition techniques on the behavior of rats tested in the elevated T-maze. *Behavioural Brain Research*, 162(2), 240-245.
- Iversen, I. H. (1993). Acquisition of matching-to-sample performance in rats using visual stimuli on nose keys. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*, 59, 471-482.
- Iversen, I. H. (1997). Matching-to-sample performance in rats: A case of mistaken identity? *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*, 68, 27-45.
- Iversen, I. H., Sidman, M., & Carrigan, P. (1986). Stimulus definition in conditional discriminations. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*, 45, 297-304.
- Kangas, B. D., & Branch, M. N. (2008). Empirical validation of a procedure to correct position and stimulus biases in matching-to-sample. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*, 90, 103-112.
- Lashley, K. S. (1938). Conditional reactions in the rat. *Journal of Psychology*, 6, 311-324.
- Laus, M. F., Vales, L. D. M. F., Costa, T. M. B., & Almeida, S. S. (2011). Early postnatal protein-calorie malnutrition and cognition: A review of human and animal studies. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 8(2), 590-612.
- Levitsky, D. A. (1975). Malnutrition and animal models of cognitive development. In G. Serban, (Ed.), *Nutrition and Mental Functions* (pp. 75-89). New York: Plenum Press.
- Levitsky, D. A. (1979). Malnutrition and the hunger to learn. In D. A. Levitsky (Ed.), *Malnutrition, environment and behavior: New perspectives* (pp. 161-179). Ithaca: Cornell.
- Lima, D. C., de Souza, D. G., Martinez, C. M. S., & Rocca, J. Z. (2010) Atividades recreativas como suporte na ampliação de vocabulário e na aquisição de leitura para não-leitores. *Revista de Terapia Ocupacional da Universidade de São Paulo*, 21, 61-67.
- Lopes Jr., J., & Matos, M. A. (1995). Controle pelo estímulo: aspectos conceituais e metodológicos acerca do controle contextual. *Psicologia: Teoria e Pesquisa*, 11(1), 33-39.
- Lucas, A. (1998). Programming by early nutrition: An experimental approach. *The Journal of Nutrition*, 128, 401S-406S.
- Mackay, H. A. (1991). Conditional stimulus control. In I. H. Iversen & K. A. Lattal (Eds.), *Techniques in the behavioral and neural sciences: Vol. 6. Experimental analysis of behavior* (pp. 301-350). New York: Elsevier
- Markham, M. R., Butt, A. E., & Dougher, M. J. (1996). A computer touch-screen apparatus for training visual discriminations in rats. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*, 65, 173-182.
- Matos, M. A., Hübner, M. M., Serra, V. R. B. P., Basaglia, & A. E., Avanzzi, A. L. (2002). Rede de relações condicionais e leitura recombinativa: Pesquisando o ensinar a ler. *Arquivos Brasileiros de Psicologia*, 54(3), 284-303.
- McIlvane, W. J., & Dube, W. V. (1992). Stimulus control shaping and stimulus control topographies. *The Behavior Analyst*, 15(1), 89-94.
- McIntire, K. D., Cleary, J., & Thompson, T. (1987). Conditional relations by monkeys: reflexivity, symmetry, and transitivity. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*, 47, 279-285.
- Medeiros, C. A., Ribeiro, A. F., & Galvão, O. F. (2003). Efeito de instruções sobre a demonstração de equivalência entre posições. *Psicologia: Teoria e Pesquisa*, 19(2), 165-171.
- Minini, L., & Jeffery, K. (2006). Do rats use shape to solve "shape discriminations"? *Learning & Memory*, 13, 287-297.
- Mokler, D. J., Torres, O. I., Galler, J. R., & Morgane, P. J. (2007). Stress-induced changes in extracellular dopamine and serotonin in the medial prefrontal cortex and dorsal hippocampus of prenatally malnourished rats. *Brain Research*, 1148, 226-233.
- Moreno, A. M., de Souza, D. G., & Reinhard, J. (2012). A comparative study of relational learning capacity in honeybees (*Apis mellifera*) and stingless bees (*Mellipona rufiventris*). *PLoS ONE*, 7(12), 1-7.
- Morgane, P. J., Austin-LaFrance, R. J., Bronzino, J. D., Tonkiss, J., Diaz-Cintra, S., Cintra, & Galler, J. R. (1993). Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 17, 91-128.
- Morgane, P. J., Mokler, D. J., & Galler, J. R. (2002). Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 26, 471-483.
- Nakagawa, E. (2005) Emergent, untrained stimulus relations in many-to-one matching-to-sample discriminations in rats. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*, 83, 185-195.
- Passos, M. C. F., Ramos, C. F., & Moura, E. G. (2000). Short and long term effects of malnutrition in rats during lactation on the body weight of offspring. *Nutrition Research*, 20(11), 1603-1612.
- Peña, T., Pitts, R. C., & Galizio M. (2006). Identity matching-to-sample with olfactory stimuli in rats.

- Journal of the Experimental Analysis of Behavior*, 85, 203-221.
- Pessotti, I. (1981). Aprendizagem em abelhas. VI: Discriminação condicional em *Melipona rufiventris*. *Revista Brasileira de Biologia*, 41 (4), 681-683.
- Reeves, P. G., Nielsen, F. H., & Fahey Jr. (1993). AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *The Journal of Nutrition*, 123, 1939-1951.
- Riul, T. R., Carvalho, A. F., Almeida, P. S., de Oliveira, L. M., & Almeida, S. S. (1999). Ethological analysis of mother-pup interactions and other behavioral reactions in rats: Effects of malnutrition and tactile stimulation of the pups. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 32, 975-983.
- Rocinho, L. F., Almeida, S. S., & de Oliveira, L. M. (1997). Response threshold to aversive stimuli in stimulated early protein malnourished rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 30, 407-413.
- Santucci, L. B., Daud, M. M., Almeida, S. S., & de Oliveira, L. M. (1994). Effects of early protein malnutrition and environmental stimulation upon the reactivity to diazepam in two animal models of anxiety. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 49(1), 393-398.
- Sidman, M., & Tailby, W. (1982). Conditional discriminations vs. matching-to-sample: An expansion of the testing paradigm. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*, 37, 5-32.
- 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, 346-352.
- Stevenson, J. (2006). Dietary influences on cognitive development and behaviour in children. *Proceedings of the Nutrition Society*, 65, 361-365.
- Strupp, B. J., & Levitsky, D. A. (1995). Enduring cognitive effects of early malnutrition: A theoretical reappraisal. *The Journal of Nutrition*, 125, 2221S-2232S.
- Tirapegui, J., Castro, I. A., & Rossi, L. (2005). Biodisponibilidade de proteínas. Em S. M. F. Cozzolino (Ed.), *Biodisponibilidade de nutrientes* (pp. 67-123). Barueri: Manole.
- Valadares, C. T., Fukuda, M. T., Françolin-Silva, A. L., Hernandez, A. S., & Almeida, S. S. (2010). Effects of postnatal protein malnutrition on learning and memory procedures. *Nutritional Neuroscience*, 13(6), 274-282.
- Vilela, M. C. R., Mendonça, J. E. F., Bittencourt, H., Lapa, R. M., Alession, M. L. M., Costa, & Andrade da Costa, B. L. S. (2005). Differential vulnerability of the rat retina, suprachiasmatic nucleus and intergeniculate leaflet to malnutrition induced during brain development. *Brain Research Bulletin*, 64, 395-408.
- Wainwright, P. E., & Colombo, J. (2006). Nutrition and the development of cognitive functions: Interpretation of behavioral studies in animals and human infants. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 84, 961-970.
- Zucoloto, F. S. (2013). A evolução do comportamento alimentar na espécie humana. In S. S. Almeida, T. M. B. Costa, M. F. Laus, & G. Straatmann (Orgs.) *Psicobiologia do comportamento alimentar* (pp.11-31). Rio de Janeiro: Rubio.