

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

BARBARA KAZUE AMARAL ONISHI

**Desempenho de ratos nas tarefas de medo
condicionado e de contraste antecipatório de
incentivo: efeitos de lesões seletivas do núcleo basal
da amígdala**

São Paulo

2005

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

BARBARA KAZUE AMARAL ONISHI

**Desempenho de ratos nas tarefas de medo
condicionado e de contraste antecipatório de
incentivo: efeitos de lesões seletivas do núcleo basal
da amígdala**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Fisiologia Geral

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Fernando Xavier

São Paulo

2005

**FICHA CATALOGRÁFICA PREPARADA PELO SERVIÇO DE BIBLIOTECA DO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

Onishi, Barbara Kazue Amaral

O 58d

Desempenho de ratos nas tarefas de medo condicionado e de contraste antecipatório de incentivo: efeitos de lesões seletivas do núcleo basal da amígdala / Barbara Kazue Amaral Onishi. -- São Paulo : B.K.A. Onishi, 2005.
213 p. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, Departamento de Fisiologia, 2005.

1. Amígdala - núcleo basal. 2. Condicionamento. 3. Medo. 4. Contraste antecipatório de incentivo. 5. Emoção. 6. Aprendizagem. I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Fisiologia. II. Título.

LC: QP 382.T4

FOLHA DE APROVAÇÃO

BARBARA KAZUE AMARAL ONISHI

Desempenho de ratos nas tarefas de medo condicionado e de contraste antecipatório de incentivo: efeitos de lesões seletivas do núcleo basal da amígdala

Tese apresentada ao Instituto de Biociências
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Fisiologia Geral

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Tese defendida e aprovada em: ____/____/____

À minha mãe, Claudete, por toda a segurança que
acompanha o sentimento de ser genuinamente
amada.

Ao meu avô, José, por ter me mostrado a beleza
da simplicidade e o prazer em ser criança sempre.

À minha avó, Maria, por todo o amor.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Gilberto, por ter me concedido toda a liberdade em teorizar e executar esse trabalho, e também por ter me dado uma incrível liberdade de expressão, em todos os aspectos, nessa longa convivência. Agradeço também por acreditar, muitas vezes mais do que eu mesma, que as coisas dariam certo. Finalmente, agradeço por ter participado, de maneira chave, desse longo e importante processo de aprendizagem e de amadurecimento.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro para a realização desse trabalho (processo no. 02/08587-6).

Aos funcionários do Instituto de Biociências, que de alguma maneira fizeram esse trabalho possível. Em especial, ao bioterista Manoel, sempre tão eficiente no cuidado dos animais, e tão bem-humorado no convívio diário. À técnica de laboratório Gabriela, por todo o auxílio na manutenção do laboratório. E ao técnico de laboratório Ricardo, pela ajuda imprescindível na reta final, com a histologia de tantos cérebros...

Ao Prof. Dr. Newton Canteras, por toda a ajuda com os assuntos relacionados à amígdala, desde em ficar horas sentado ao microscópio me mostrando os diferentes núcleos (nos idos da iniciação científica...) até nas conversas sempre muito interessantes sobre comportamento e amígdala.

À Profa. Dra. Gabriela Oliveira e à aluna Larissa Figueiredo, por terem me ensinado o procedimento da tarefa de condicionamento clássico aversivo.

À Profa. Sarah Shamman-Lagnado e à aluna Renata, por terem me dado várias dicas, mais do que relevantes, para minimizar os erros na realização das lesões neurotóxicas.

À velha-guarda do laboratório – Andréa, Tati, Mazinho, Inês, Lotte, Frazão e Alê Campos – pelos inúmeros momentos especiais dentro e fora do ambiente de trabalho, sempre muito divertidos e cheios de discussões empolgantes. Vocês foram, realmente, muito importantes nesse processo. Em particular, agradeço à Andréa, por ter me ensinado tantas coisas e por estar sempre pronta a discutir com maestria e bom-humor, teorias, resultados de experimentos, delineamentos experimentais, e as coisas da vida... À Tati, por ter se tornado

uma grande e boa amiga, e óbvio por ter sempre organizado de forma inacreditável tudo que encontrava pela frente (brincadeira, Tati...). Ao Mazinho, por tanta inteligência na arte de fazer humor: saudades! Ao Frazão, por estar sempre disposto em discutir qualquer assunto a qualquer momento, sempre com idéias geniais; e claro, por ter se tornado também um amigo especial! À Lotte, por ter se revelado uma pessoa incrível. E, finalmente, ao Alexandre, pelas discussões sempre interessantes.

Aos colegas de laboratório – Adriano, Arnaldo, Cláudia Berlim, Cláudia Marote, Cláudia Sallai, Frazão, Édson, João, Luiz Fernando, Mari, Paula, Pavãozinho, Sylvia, Verônica e Viviane. Obrigada por participarem dessa etapa, cada um de uma forma única. Grandes momentos no bandeirão, no japonês de Pinheiros, nos churrascos de final de ano na casa do chefe, nas cervejinhas do final da tarde e nas presepadas subseqüentes, nas viagens de congressos, nos nascimentos dos filhos, nos conselhos da vida privada, nos apuros das entregas de teses e dissertações, nos finais de semana fazendo experimento, etc etc.

Aos meus amigos do peito – Caiones, Carlão, Dani e Papão. Apesar de não terem consciência, vocês foram super importantes nessa fase (até me deram um Cérebro de presente, lembram?). Valeu pela amizade, por estarem sempre presentes, e por eu ser a amiga preferida de vocês (brincadeira...)!

Às minhas amigas mais do que especiais – Karina, Paula, Raquel, Renata e Sandra – por fazerem parte da minha vida, do meu afeto.

Ao Léo, um companheiro muito importante e inesquecível de tantos anos... Léo, muito obrigada por tudo que as palavras não descrevem, mas que tocaram o nosso coração.

Aos amigos Léo, Frazão, Carol, Fritz, Lia, Tati, Nina, Gabi, Glau, Marcela e Robertinha por aqueles momentos de sossego, de divertimento, de abobrinhas, de gargalhadas, de comilança, e de tudo de bom que ainda está por vir. Que venha!!!

À minha família, também por tudo que não há como descrever... Em especial à minha mãe, pelo amor e confiança pra vida inteira, a qualquer hora.

RESUMO

ONISHI, B.K.A. Desempenho de ratos nas tarefas de medo condicionado e de contraste antecipatório de incentivo: efeitos de lesões seletivas do núcleo basal da amígdala. 2005. 213 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.

As mais influentes teorias sobre a função do complexo basolateral da amígdala (BLA) sugerem seu envolvimento no aprendizado de associações estímulo-reforço; nesse processo, o BLA seria requerido para que as representações sensoriais de estímulos sejam associadas às propriedades afetivas e motivacionais de eventos biologicamente significativos. Dados hodológicos e neurofisiológicos sugerem que diferentes representações sensoriais de estímulos são processadas paralelamente no BLA, sendo o núcleo basal (BL) importante na codificação polimodal e o núcleo lateral (LA) na codificação unimodal; processos associativos envolvendo representações unimodais ou polimodais poderiam ocorrer paralelamente nesses núcleos amigdalares.

Nesse contexto, hipotetizou-se que o BL seria importante para os processos subjacentes ao condicionamento clássico aversivo a um contexto, mas não a um som, já que o primeiro envolveria representações contextuais de múltiplas associações e o segundo a representação de um estímulo discreto.

Para testar essa hipótese, ratos com danos seletivos do BL, pela administração múltipla e tópica de ácido ibotênico, foram submetidos a uma tarefa de condicionamento clássico aversivo que incluiu um componente contextual e um componente sonoro, concomitantemente; posteriormente, os animais foram testados nas situações contextual e sonora, separadamente.

Em relação aos animais controle-operados, os animais com danos seletivos no BL exibiram prejuízo de desempenho no teste de medo condicionado ao contexto, mas não ao som.

A aprendizagem de associações do tipo estímulo-reforço seria também requerida para o desempenho de uma tarefa de contraste antecipatório de incentivo. Nesta tarefa, animais expostos diariamente à solução de sacarina 0,15% seguida de uma solução preferida de sacarose 32% reduzem o consumo da primeira solução em comparação com animais controles, que recebem sacarina 0,15% seguida de sacarina 0,15%. Acredita-se que essa redução relativa do consumo da primeira solução (i.e., o efeito de contraste antecipatório de incentivo) dependa do acesso à representação do valor de incentivo da solução pendente que é preferida. Isto é, diante da apresentação da primeira solução, juntamente com os estímulos discriminativos a ela associados, os animais comparariam seu valor de incentivo com o da segunda solução, suprimindo o consumo da primeira. Do ponto de vista dos processos neurais subjacentes, depreende-se que se os estímulos discriminativos envolverem uma representação configuracional o aparecimento do efeito de contraste antecipatório de incentivo dependerá da integridade do BL; por outro lado, se esses estímulos envolverem uma representação elemental, o efeito de contraste independe da integridade do BL. Observamos, porém, que ratos com danos seletivos do BL não exibem qualquer alteração do efeito de contraste antecipatório de incentivo, independentemente das situações discriminativas (elemental ou configuracional) impostas. Observamos ainda que a desvalorização da solução preferida (sacarose 32%), pelo seu pareamento com LiCl, não altera o efeito de contraste antecipatório de incentivo nos ratos com danos no BL e nem mesmo nos animais controle-operados. Esses resultados sugerem, diferentemente do inicialmente proposto, que o aprendizado de associações estímulo-reforço não é crucial para o aparecimento do efeito de contraste antecipatório de incentivo.

No conjunto, esses resultados apoiam a noção de que o BL está envolvido no estabelecimento de associações de estímulos aversivos com o contexto de sua apresentação, mas não com um estímulo auditivo discreto. Além disso, os dados permitem questionar o envolvimento de aprendizagem de associações estímulo-reforço no efeito de contraste antecipatório de incentivo.

ABSTRACT

ONISHI, B.K.A. Rat's performance on classical fear conditioning and anticipatory incentive contrast task: effects of selective lesions of basal amigdalar nucleus. 2005. 213f.
Thesis (Doctoral) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.

Influential theories related to the functions of the basolateral amigdala complex (BLA) suggest its involvement on learning of stimulus-reward associations; the BLA would be required for associating representations of a given stimulus with affective or motivational properties of relevant biological events. Hodological and neurophysiological studies suggest that the BLA can process distinct representations of stimuli in parallel; while the basal nucleus (BL) would process polimodal stimuli, the lateral nucleus (LA) would process unimodal stimuli.

In this context, one can hypothesize that the BL is required for contextual, but not auditory, fear conditioning.

In order to evaluate this hypothesis, rats with selective damage of the BL, induced by multiple-site injections of ibotenate, were trained in classical fear conditioning task that includes, concurrently, contextual and auditory components; later, the rats were tested for both the contextual and the auditory conditioning, separately.

Relative to the sham-operated controls, rats with damage to the BL exhibited disruption of performance in the contextual, but not auditory, component of the task.

Stimulus-reward associations would be required for performance on anticipatory incentive contrast task. In short, rats daily exposed to a solution of saccharin 0,15% followed by a preferred sucrose 32% solution, suppress the intake of the first solution when compared with rats exposed to saccharin 0,15% followed by saccharin 0,15%. This relative reduction of the first solution intake (i.e., effect of anticipatory contrast) is seen as dependent upon the access to the representation of the incentive value of the forthcoming preferred solution. In other words, the presentation of the first solution in combination with their associated

discriminative stimuli render the rats to compare its incentive value with that of the second solution, resulting in suppression of the intake. Supposedly, on considering the underlying neural processes, being the discriminative stimuli configural in nature, the occurrence of the anticipatory contrast would be dependent upon the integrity of the BL; on the other hand, being the discriminative stimuli elemental in nature, the anticipatory contrast would depend upon the BL integrity. However, data showed that damage to the BL does not interfere in the anticipatory contrast, independently on the requirement for a configural or an elemental discrimination. In addition, devaluation of the sucrose, by its pairing with LiCl, did not alter the anticipatory contrast effect both for the BL rats and the sham-operated controls. Thus, contrary to the initial idea, these results suggest that stimulus-reward associations are not crucial for the occurrence of the anticipatory incentive contrast effect.

Together, these results lend support to the notion that the BL is required for the establishment of associations between aversive stimuli and the context of its presentation, but not with a discrete auditory stimulus. In addition, these results allow to question that stimulus-reward associations are critical for the occurrence of the anticipatory incentive contrast effect.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BL	núcleo basal da amígdala
BLa	núcleo basal anterior da amígdala
BLp	núcleo basal posterior da amígdala
BLA	complexo basolateral da amígdala
BM	núcleo basal acessório da amígdala
BMa	núcleo basal acessório anterior da amígdala
BMp	núcleo basal acessório posterior da amígdala
Ce	núcleo central da amígdala
CS	estímulo condicionado
EP	núcleo endopiriforme
GABA	ácido gama-aminobutírico
i.p.	intra-peritoneal
LA	núcleo lateral da amígdala
LTP	potenciação de longa duração
NMDA	N-metil-D-asparato
PIR	córtex piriforme
PIT	transferência Pavloviana-instrumental, do inglês “Pavlovian-instrumental transfer”
US	estímulo incondicionado

SUMÁRIO

1. Introdução	15
Breve histórico	16
Anatomia e hodologia amigdalares: uma breve síntese	18
A amígdala e a associação estímulo-reforço	25
A amígdala e a aquisição do condicionamento aversivo	38
Os núcleos lateral e basal do BLA processariam dimensões sensoriais distintas?	43
Contraste antecipatório de incentivo: seria a amígdala importante para a sua aquisição?	49
2. Objetivos	60
3. Experimento 1	62
3.1. Materiais e Métodos	63
3.2. Resultados	71
4. Experimento 2	83
4.1. Materiais e Métodos	85
4.2. Resultados	92
5. Experimento 3	110
5.1. Materiais e Métodos	111
5.2. Resultados	113
6. Experimento 4	117
6.1. Materiais e Métodos	119
6.2. Resultados	127
7. Discussão	164

7.1. A lesão seletiva e neurotóxica do núcleo basal da amígdala e os testes de medo condicionado ao som e ao contexto	165
7.2. A lesão neurotóxica e seletiva do núcleo basal da amígdala e o desempenho na tarefa de contraste antecipatório de incentivo	177
8. Conclusões Gerais	194
9. Referências Bibliográficas	197
10. Apêndice	211

1. Introdução

Breve histórico

A amígdala foi primeiramente descrita no início do século XIX por Burdach (1819 *apud* Petrovich, 1997), que lhe concedeu esse nome por sua aparência semelhante a de uma amêndoa. Já no século XX, Völsch (1910 *apud* Petrovich, 1997) estabeleceu subdivisões à amígdala baseado na sua citoarquitetura, diferenciando um grupamento cortical de um segundo não-cortical, o qual denominou de principal e que ainda foi sub-dividido nos núcleos medial, central e lateral. Um pouco mais tarde, Johnston (1923 *apud* Petrovich, 1997) adicionou elementos ao estudo de Völsch, reconhecendo os núcleos basal e basal acessório, que foram incluídos no grupamento principal, e outros núcleos que foram adicionados ao grupamento cortical. O trabalho de Johnston (1923) abrangeu ainda uma análise comparativa da amígdala de mamíferos e de outros vertebrados, que o permitiu a distinguir um grupo primitivo que ele denominou de *corticomedial*, associado com o sistema olfativo (núcleos central, medial, cortical e núcleo do trato olfatório lateral), e um grupo filogeneticamente mais recente chamado por ele de *basolateral* (núcleos lateral e basal). Esse autor sugeriu que a amígdala é uma região contínua às estruturas olfativas nos vertebrados “mais inferiores”, mas devido a uma expansão do pallium durante a evolução, houve uma separação entre elas. Ele ainda sugeriu que a necessidade de processar novas informações sensoriais na passagem do ambiente aquático para o terrestre durante o processo evolutivo, isto é, de processar informações do tipo auditivas e visuais, em adição às olfativas e gustativas marcantes no ambiente aquático, foi um fator relevante para as mudanças na estrutura da amígdala ao longo da evolução dos vertebrados. Isso pode ser evidenciado por estudos comparativos do tamanho e da complexidade da amígdala nos diferentes grupos de vertebrados, que indicam que a amígdala de peixes é composta somente pelo grupamento corticomedial, enquanto que répteis já possuem o grupamento basolateral representado somente pelo núcleo basal, e que em mamíferos o grupamento basolateral passa a ser composto também pelo núcleo lateral.

Essa divisão funcional da amígdala em grupos corticomedial e basolateral aplicada por Johnston (1923) foi a primeira tentativa, apesar de simples sob a ótica atual, de se correlacionar a heterogeneidade estrutural da amígdala com sua heterogeneidade funcional. A

classificação funcional empregada por Johnston (1923) e a definição da extensão dos núcleos que compreendem a amígdala serviu de base para estudos neuroanatômicos posteriores; em 1988, Alheid e Heimer propuseram o conceito de *amígdala extendida*. Recentemente, Swanson e Petrovich (1998) também propuseram uma classificação funcional dos núcleos da amígdala, sugerindo que diferentes grupamentos celulares da amígdala são derivados de diferentes regiões do sistema nervoso, e que esses grupamentos podem ser distinguidos tanto por seu padrão de conectividade com outras estruturas quanto pela distribuição de neurotransmissores dentro de cada grupamento; por conseguinte, eles podem ser diferenciados funcionalmente. Diante dessas características, esses autores, ao contrário da visão tradicional e gerando uma certa polêmica, defendem que a amígdala não pode ser encarada como uma unidade estrutural nem funcional. Segundo Swanson e Petrovich (1998), os grupamentos celulares amigdalares derivam do estriado (núcleos central e medial), do córtex olfativo (núcleo do trato olfatório lateral, núcleo cortical e área piriforme-amigdalares e área de transição pós-piriforme) e do cláustro (núcleos lateral e basal), e pertencem funcionalmente aos sistemas olfativo acessório e principal, autonômico (núcleo central) e fronto-temporal cortical, respectivamente.

A partir do trabalho de Klüver e Bucy (1937; 1939), a amígdala passou a ser considerada importante para processamentos de ordem emocional. A ablação bilateral das porções anteriores do lobo temporal de macacos produziu um conjunto de comportamentos, denominado síndrome de Klüver-Bucy, cuja característica principal era o que os pesquisadores chamaram de *cegueira psíquica*, que compreendia a aparente perda da reação emocional a estímulos sensoriais, principalmente os visuais. Isso é, os animais podiam ver perfeitamente, mas os objetos pareciam ter perdido o seu significado “psicológico”; por exemplo, os macacos lesados levavam à boca objetos não comestíveis, tentavam copular com indivíduos do mesmo sexo ou de outras espécies, e perdiam o medo por cobras e pessoas. Mais tarde, outros estudos tentaram determinar que regiões específicas do lobo temporal tinham maior relevância na síndrome, e nesse sentido, o trabalho de Weiskrantz (1956) foi marcante por demonstrar que ablação bilateral da amígdala em macacos levou a uma série de

mudanças comportamentais que incluía mansidão, perda de responsividade emocional, exame excessivo de objetos, consumo de itens alimentares previamente rejeitados e aproximação de objetos previamente relacionados ao medo, que em muito se assemelhavam aos comportamentos observados por Klüver e Bucy. Weiskrantz (1956) também reportou que a ablação bilateral da amígdala em macacos resultou em prejuízo na aprendizagem da tarefa de esquiva ativa, onde o animal deve produzir uma resposta operante na presença de um estímulo condicionado, o qual consiste geralmente de uma luz ou um som, que sinaliza um choque. Baseado nessas e em outras observações, Weiskrantz (1956) foi um dos primeiros a sugerir que a amígdala seria fundamental para que as representações sensoriais de um estímulo fossem associadas a propriedades afetivas ou reforçadoras, ou seja, que a amígdala estaria envolvida na formação de associações entre um estímulo e um reforçador. Mais tarde, Jones e Mishkin (1972) sugeriram que muitos dos sintomas da síndrome de Klüver-Bucy seriam decorrentes do prejuízo na aprendizagem de associações estímulo-reforço.

Anatomia e hodologia amigdalar: uma breve síntese

A amígdala, em todos os mamíferos, é anatomicamente complexa, consistindo de numerosos núcleos, que ainda podem ser subdivididos em diferentes sub-regiões. Tradicionalmente são considerados dois grandes grupamentos amigdalares, segundo critérios anátomo-funcionais: o grupamento corticomédial (núcleo do trato olfatório lateral, núcleos cortical, medial e central, e córtex periamigdalóide) e o grupamento basolateral (núcleos lateral, basal e basal acessório), inicialmente classificados por Johnston (1923). Estudos mais recentes indicam que dentro do grupamento corticomédial, os núcleos central e medial apresentam características anatômicas e histoquímicas diferentes dos demais núcleos que fazem parte desse grupamento, resultando em uma nova classificação que considera três grandes grupos celulares: grupamento basolateral, cortical e centromédial (que inclui também o núcleo intersticial da estria terminal) (ver McDonald, 1998, para revisão). São considerados também o núcleo intercalado e as áreas amígdalo-hipocampal e amigdalóide anterior como

constituintes do complexo amigdalar. Ainda, cada núcleo amigdalar e mesmo cada subdivisão nuclear estabelecem conexões bastante distintas com outras estruturas do sistema nervoso e com outros núcleos da amígdala (ver Pitkänen, 2000, para revisão). A Figura 1 ilustra alguns núcleos amigdalares e suas principais conexões com outras estruturas do sistema nervoso.

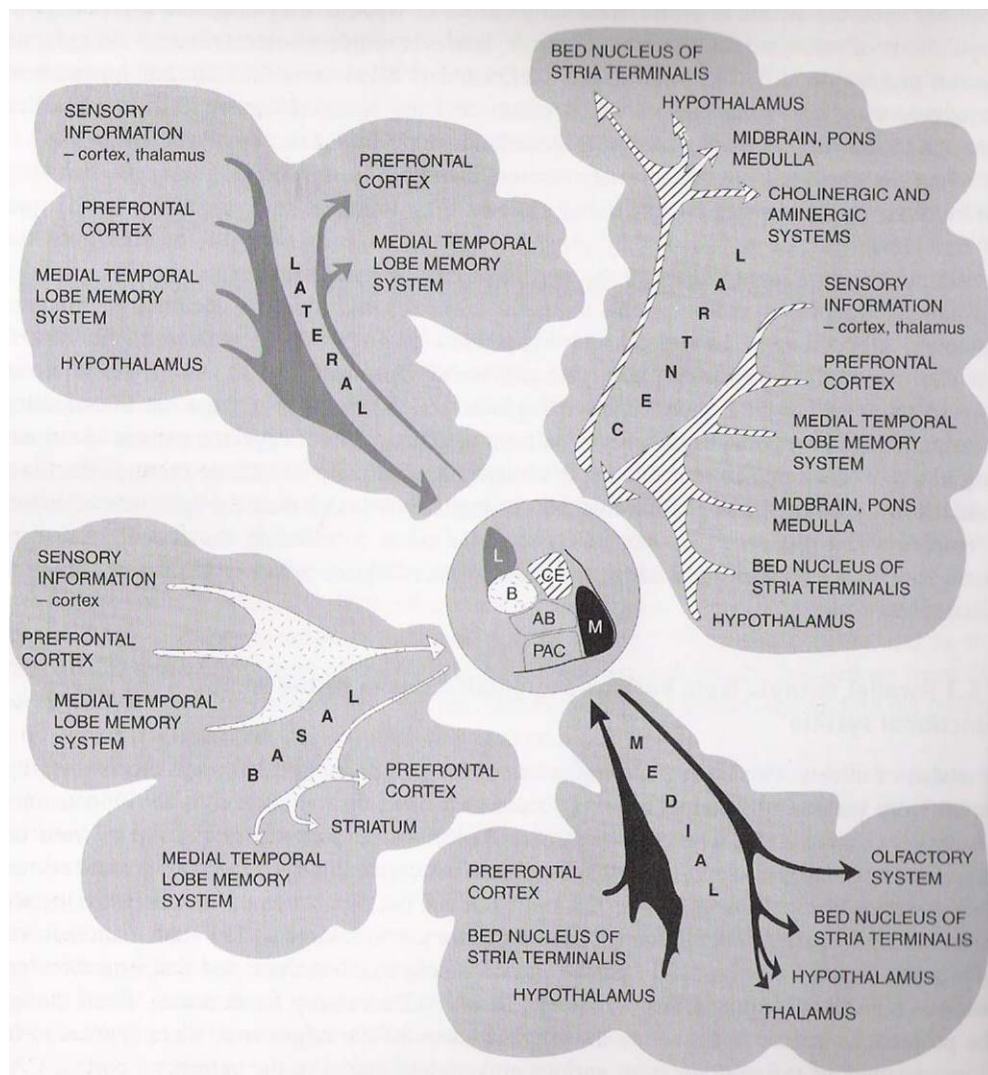


Figura 1. Representação das principais conexões dos núcleos lateral, basal, central e medial da amígdala com outras estruturas do sistema nervoso. Modificado a partir de Pitkänen, 2000.

Estimulação de diferentes regiões da amígdala resulta em diferentes respostas que incluem comportamentos maternos e de reprodução, comportamentos relativos à alimentação e ao ato de beber, respostas de luta e fuga, respostas de alerta e de orientação, e comportamentos relacionados a recompensas e punição (Kaada, 1972 *apud* McDonald, 1998). Numerosos estudos mostram, ainda, que a amígdala é uma estrutura crítica para a produção de comportamentos afetivos apropriados em resposta a estimulação sensorial proveniente do meio ambiente (ver Davis, 2000, para revisão). De fato, a hodologia da amígdala indica que ela está em condição de receber informação altamente processada do córtex e de influenciar os sistemas motor e neurovegetativo, e algumas áreas corticais das quais recebe projeções e outras estruturas límbicas, de modo a compreender uma interface entre o sistema sensorial e os sistemas executivos cerebrais para comportamentos emocionais, respostas neurovegetativas e endócrinas (ver Rolls, 1992, para revisão).

McDonald (1998), em uma revisão sobre as aferências corticais da amígdala de macacos, gatos e ratos, pontua que projeções do sistema olfativo principal (bulbo e córtex olfativo principal) atingem a amígdala através do núcleo cortical anterior, núcleo do trato olfatório lateral e do córtex periamigdalóide, enquanto que o sistema olfativo acessório envia projeções para os núcleos medial e cortical posterior, núcleo intersticial do trato olfatório acessório e para o núcleo intersticial da estria terminal. Por outro lado, o núcleo central e os núcleos do grupamento basolateral não recebem projeções do bulbo olfativo e são alvos de pequenas inervações do córtex olfativo (com excessão do núcleo basal acessório). Acredita-se que essas últimas áreas amigdalares recebem, indiretamente, informações de natureza olfativa através do núcleo cortical e do córtex periamigdalóide, o que explicaria por que neurônios dessas regiões também são responsivos a estímulos olfativos (Cain & Bindra, 1972 *apud* McDonald, 1998).

Enquanto informações de natureza olfativa atingem diretamente o grupamento cortical e parte do grupamento centromedial, o restante das informações sensoriais acessam a amígdala através, principalmente, do grupamento basolateral e do núcleo central. Por exemplo, informações somatosensoriais, incluindo as nociceptivas, provenientes

principalmente do córtex insular, do tálamo e do núcleo parabraquial da ponte, chegam à amígdala através dos núcleos lateral, basal e central. Informações gustativas e viscerais oriundas do córtex insular, tálamo e do núcleo parabraquial da ponte, por sua vez, alcançam a amígdala diretamente através do núcleo lateral e do núcleo central e de discretas porções dos núcleos basal e basal acessório. Adicionalmente, informações auditivas com origem principalmente nas áreas de associação auditivas terminam majoritariamente nos núcleos lateral e central. Projeções provenientes da área auditiva talâmica (núcleo geniculado medial) sobrepõem-se a essas projeções corticais auditivas no núcleo lateral. Já as informações de natureza visual (majoritariamente das áreas de associação visual) atingem a amígdala principalmente via núcleos lateral e central, e no rato também através do núcleo basal.

Por outro lado, informações polimodais originárias do córtex perirrinal (considerado como integrante do sistema de memória das porções mediais do lobo temporal medial) alcançam diretamente os núcleos do grupamento basolateral e o núcleo central. Além disso, em ratos, informações polimodais provenientes do córtex entorrinal atingem principalmente os núcleos lateral, basal, basal acessório e o córtex periamigdalóide; elas parecem ser resultado do processamento prévio pelo hipocampo, uma vez que são primordialmente oriundas das camadas profundas do córtex entorrinal, as quais recebem inervação do subículo, que é a principal via eferente do hipocampo. Interessantemente, as informações que partem da amígdala chegam às camadas superficiais do córtex entorrinal, as quais, por sua vez, aferentam o hipocampo, levando à sugestão de que informações de natureza emocional processadas na amígdala são também processadas pelo hipocampo e transmitidas de volta à amígdala através do córtex entorrinal. A amígdala também recebe informações processadas pelo hipocampo através do subículo ventral e do CA1. O primeiro envia projeções principalmente para os núcleos lateral, basal, basal acessório e central, enquanto que o campo CA1 inerva primordialmente o núcleo basal. Além disso, a amígdala é um dos principais alvos de informações polimodais originárias do córtex pré-frontal, sendo o núcleo basal a região amigdalár que recebe as maiores projeções da sua porção ventral, e em contrapartida, as regiões amigdalares relacionadas ao sistema olfativo são as áreas que recebem as maiores

inervações da porção dorsal do córtex pré-frontal (também relacionada com o sistema olfativo).

Mais especificamente, em ratos, as aferências corticais visuais e auditivas sobrepõem-se na porção dorsolateral posterior do núcleo lateral, enquanto que na porção dorsolateral anterior do núcleo lateral sobrepõem-se projeções que transmitem informações somatosensoriais, gustativas e viscerais. De fato, a porção dorsolateral do núcleo lateral representa a principal porta de entrada, na amígdala, de todas as informações sensoriais corticais que não as de natureza olfativa, e sua atividade não é influenciada por qualquer outro núcleo amigdalár. Além disso, as divisões ventrolateral e ventromedial do núcleo lateral (essa última também recebendo grandes projeções auditivas, visuais e polimodais) são inervadas pela porção dorsolateral do núcleo lateral, e ainda recebem informações olfativas do córtex periamigdalóide e informações polimodais do córtex perirrinal e da formação hipocampal. Os núcleos basal e basal acessório, que por sua vez compreendem importantes alvos de projeções polimodais na amígdala, inervam as divisões ventrolateral e ventromedial do núcleo lateral, respectivamente. Portanto, a porção ventromedial, e em menor grau, a ventrolateral do núcleo lateral, são importantes áreas da amígdala de convergência de todos os tipos de informações sensoriais corticais unimodais e polimodais. Essas regiões, por sua vez, enviam extensas projeções para os outros núcleos do grupamento basolateral, para a divisão capsular do núcleo central e para algumas regiões do grupamento cortical. Adicionalmente, os núcleos basal e basal acessório são importantes alvos de informações sensoriais polimodais dos córtices polimodais e do núcleo lateral, além de informações unimodais de natureza gustativa, visceral, somatosensorial (núcleo basal) e olfativa (núcleo basal acessório); porém, recebem pequenas projeções dos córtices auditivo e visual. Em particular, o núcleo basal é o maior alvo amigdalár de projeções da formação hipocampal e do córtex pré-frontal. O núcleo central, por sua vez, assim como o núcleo lateral, recebe informações visuais e auditivas principalmente através da sua porção capsular, enquanto informações gustativas, viscerais e somatosensoriais atingem esse núcleo pelas subdivisões medial e lateral, as quais também são inervadas pelos núcleos basal e basal acessório. A formação hipocampal e o córtex pré-frontal

também enviam importantes projeções para o núcleo central (ver McDonald, 1998 e Pitkänen, 2000, como revisões).

As aferências do complexo amigdalар compreendem ainda estruturas sub-corticais como o tálamo, hipotálamo, estriado, diversas regiões do tronco encefálico, entre outras. As maiores eferências talâmicas para a amígdala originam-se nos núcleos posteriores e da linha média do tálamo e atingem principalmente os núcleos lateral, basal, central, cortical anterior e medial. Diversos núcleos hipotalâmicos, por sua vez, inervam mais extensivamente os núcleos central e medial, mas também enviam grandes projeções para os núcleos lateral, cortical posterior e para a área amígdalo-hipocampal. Adicionalmente, o núcleo central representa o maior alvo na amígdala (quase um alvo exclusivo) de projeções oriundas do do prosencéfalo basal, mesencéfalo, ponte e medula, compreendendo estruturas como substância negra e área tegmental ventral (neurônios dopaminérgicos), núcleos da rafe (neurônios serotoninérgicos), locus coeruleus (neurônios noradrenérgicos), núcleos colinérgicos do prosencéfalo basal, núcleo do trato solitário, substância cinzenta periaquedutal, núcleo parabraquial da ponte, entre outras (Pitkänen, 2000).

As informações provenientes das regiões extra-amigdalares ao acessarem a amígdala por diferentes núcleos e sub-núcleos podem ser distribuídas para dentro do mesmo núcleo, através de conexões intra-nucleares, e para outros núcleos, através de conexões intra-amigdalares, e assim tornarem-se associadas (Pitkänen *et al.*, 1997). Por exemplo, o núcleo lateral, que representa a maior via de entrada de informações sensoriais não-olfativas na amígdala, e os núcleos basal, basal acessório e medial são as regiões que parecem prover as maiores inervações intra-amigdalares, sugerindo que as informações que chegam diretamente nesses núcleos a partir dos córtices sensoriais, formação hipocampal, córtex pré-frontal e hipotálamo, entre outros, podem ser distribuídas paralelamente para outras regiões da amígdala. Diferentemente, o núcleo central e a área amígdalo-hipocampal exibem poucas projeções para os demais núcleos amigdalares, mas em contrapartida recebem informações de muitos núcleos. Embora exista uma extensa rede de conexões intra-amigdalares, há pouca sobreposição de terminações de diferentes regiões amigdalares para áreas específicas dentro

da amígdala; somente o núcleo central e a área amígdalo-hipocampal parecem receber uma grande convergência de informações partindo de diferentes núcleos e sub-núcleos. De fato, sugere-se que estas últimas áreas compreendem estações críticas para a integração e a saída de informações para outras estruturas do sistema nervoso, as quais produziriam respostas adequadas aos estímulos que foram processados pela amígdala (Pitkänen, 2000).

Finalmente, uma importante característica anatômica da amígdala é que os núcleos diferenciam-se também por inervarem sistemas funcionais distintos. De uma forma geral, as eferências amigdalares transmitem as informações processadas na amígdala para 1) estruturas do sistema de memória do lobo temporal medial, como por exemplo, a formação hipocampal e o córtex perirrinal, 2) para muitas das áreas corticais das quais recebe aferências, 3) para regiões relacionadas com o sistema de recompensa, como o córtex pré-frontal e o estriado ventral, 4) para o hipotálamo e tronco encefálico, relacionados com a modulação de respostas endócrinas, autonômicas e somáticas e, finalmente, 5) para áreas importantes na produção de respostas motoras como o estriado. Por exemplo, as projeções do núcleo lateral terminam principalmente em algumas das áreas corticais das quais recebe aferências, e também incluem a formação hipocampal e o córtex pré-frontal. O núcleo basal, por sua vez, é a região amigdalare que provê as maiores projeções para o córtex pré-frontal, núcleo accumbens, caudado-putamen, e para a formação hipocampal. Essas regiões também são aferentadas pelo núcleo basal acessório, apesar de uma forma menos densa. Enquanto isso, o núcleo central emite projeções primordialmente para o hipotálamo, mesencéfalo, ponte e medula. Por fim, os núcleos medial e cortical anterior inervam principalmente o sistema olfatório, o núcleo intersticial da estria terminal e o hipotálamo. Assim, considera-se que a classificação funcional de cada núcleo se dá mais pelo seu padrão de eferências do que por suas aferências (Pitkänen, 2000).

Portanto, do ponto de vista hodológico, a amígdala encontra-se em condições de associar representações sensoriais de um dado estímulo com as propriedades afetivas de um reforçador primário, participando assim do estabelecimento de associações do tipo estímulo-reforço. Além de receber informações sensoriais auditivas e visuais, também é alvo de

informações sobre reforçadores primários, incluindo as de natureza gustativa, olfativa, somatosensorial e visceral (Rolls, 2000). Depois de processadas e associadas na amígdala, essas informações podem modificar adequadamente respostas autonômicas, endócrinas, somáticas e comportamentais por meio das diferentes áreas de projeção da amígdala.

A amígdala e a associação estímulo-reforço

Os trabalhos de Klüver e Bucy (1937; 1939), de Weiskrantz (1956) e de Jones e Mishkin (1972) inauguraram um dos importantes ramos de pesquisa envolvendo a amígdala, que compreende os estudos sobre sua participação nos processos de aprendizagem pelos quais as representações sensoriais um estímulo, inicialmente neutro, tornam-se associadas às propriedades afetivas e motivacionais de estímulos biologicamente significativos. Esse tipo de atividade foi denominado *associação estímulo-reforço*.

Numerosos estímulos ambientais são considerados biologicamente relevantes e eliciam respostas específicas, selecionadas ao longo do processo evolutivo; entre eles, alimento, água e parceiros sexuais. No condicionamento Pavloviano esses estímulos são denominados *incondicionados*, ao passo que no condicionamento operante eles são chamados de *reforçadores primários*. Embora o condicionamento Pavloviano (ou clássico) não envolva reforçamento, uma vez que a obtenção ou a apresentação dos estímulos incondicionados independe da resposta do animal, as associações chamadas estímulo-**reforço** são perfeitamente aplicáveis a este condicionamento Pavloviano. De fato, associações estímulo-reforço no condicionamento operante referem-se às associações Pavlovianas envolvidas nos processos que resultam nos comportamentos de direcionamento ao reforço (ver adiante).

Segundo Gaffan e Harrison (1987), a aspiração da amígdala de macacos provoca prejuízos no desempenho de tarefas de discriminação visual, as quais envolvem associação de um estímulo originalmente neutro com um reforço primário. Um ano mais tarde, esse mesmo grupo (Gaffan *et al.*, 1988) mostrou que desconexão entre a amígdala e a área cortical associativa visual em macacos também leva àqueles prejuízos anteriormente reportados.

Entretanto, mais recentemente, o trabalho de Malkova e colaboradores (1997) revelou que lesões neurotóxicas da amígdala, que previnem a perda de fibras de passagem na região, ao contrário das aspirações empregadas previamente, não levam aos resultados encontrados naqueles estudos mais antigos. Embora esse trabalho tenha mostrado que perdas dos corpos celulares amigdalares não resultam em prejuízo numa tarefa que envolve associações do tipo estímulo-reforço, sugere-se que esta tarefa comportamental poderia ser adquirida por uma associação do tipo estímulo-resposta na ausência de áreas implicadas com o sistema de formação de associações estímulo-reforço, como a amígdala. Ou seja, nessa situação comportamental, onde macacos são treinados a escolher entre dois objetos, sendo reforçada sempre a escolha de um deles e nunca reforçada a escolha do outro, é plausível pensar que animais lesados resolveram o problema através do aprendizado da associação entre a presença de um dado estímulo visual e a execução de uma determinada resposta, que é selecionada por levar à obtenção da recompensa (Baxter e Murray, 2002).

Entretanto, Schoenbaum e colaboradores (2003a) reportaram que, embora ratos lesados no complexo basolateral da amígdala (BLA)¹ exibam desempenho semelhante aos controles quanto à **acurácia** das respostas num teste de discriminação olfativa, eles não apresentam diferença entre as **latências** de respostas frente ao estímulo que prediz um evento aversivo (latência elevada) e frente ao estímulo que antecede uma recompensa (latência menor), típico em animais normais. Os autores sugerem que essas latências refletiriam o aprendizado sobre os valores motivacionais dos diferentes reforços, enquanto que a acurácia das respostas estaria mais relacionada com mecanismos como o aprendizado de associações estímulo-resposta.

Além das tarefas de discriminação visual e olfativa, outras situações que aparentemente envolvem o aprendizado de associações estímulo-reforço, mas que também podem ser desempenhadas através da aquisição de associações estímulo-resposta, também não são afetadas por danos amigdalares, como é o caso, por exemplo, da discriminação visual condicionada (Murray e Wise, 1996) e do condicionamento Pavloviano apetitivo (Hatfield *et*

¹ O complexo basolateral da amígdala (BLA) compreende os núcleos lateral, basal e basal acessório.

al., 1996). Nesta última situação, um estímulo inicialmente neutro, por exemplo uma luz, é pareado com a apresentação de alimento, e apesar de nenhuma resposta ser requerida, ou seja, de nenhuma contingência instrumental ter sido imposta, os sujeitos passam a exibir o comportamento de aproximação do local de liberação do alimento na presença da luz, considerado como uma resposta condicionada. Assim como no exemplo anterior, o condicionamento Pavloviano apetitivo pode ser desempenhado através de uma associação estímulo-reforço, mas também por associações entre estímulo e resposta, ou seja, a luz promoveria um contexto para uma ação, que no caso é a aproximação do local de liberação do alimento. Por outro lado, é interessante notar que ratos com lesão do BLA, apesar de desempenharem normalmente o condicionamento Pavloviano apetitivo, não adquirem o condicionamento de segunda ordem apetitivo, no qual é **fundamental** que os animais estabeleçam associações do tipo estímulo-reforço. Por exemplo, uma luz (estímulo condicionado - CS - de primeira ordem) é pareada com a apresentação de alimento, e passa a eliciar uma resposta de aproximação ao local de sua liberação. Posteriormente, um novo estímulo, por exemplo um som, é seguido pela apresentação da luz, mas na ausência do alimento. Apesar de o som nunca ter sido seguido pelo alimento, os animais passam a exibir o comportamento de se aproximar do local de liberação do mesmo na presença do som (CS de segunda ordem). Portanto, a luz parece ter adquirido ou parece acessar a representação sobre o valor motivacional do alimento ao qual foi pareado, tornando assim possível, o condicionamento de segunda ordem. Note que nesta situação, a estratégia comportamental por uma associação estímulo-resposta não é viável, mas parece ter sido fundamental a aquisição da associação entre o estímulo (luz), inicialmente neutro, e a representação motivacional do alimento.

Na mesma linha de raciocínio encontram-se alguns estudos compreendendo lesões amigdalares, especialmente do BLA, e seus efeitos sobre tarefas envolvendo reforçamento condicionado (Everitt e Robbins, 1992 e Everitt *et al.*, 1999, como revisões, e Parkinson *et al.*, 2001). Nesse sentido, estímulos condicionados Pavlovianos apetitivos, por adquirirem ou acessarem representações motivacionais dos reforçadores primários aos quais passam ser

associados, também podem controlar respostas operantes funcionando como reforçadores condicionados (Williams, 1994, para revisão). Inicialmente, nesse procedimento, um estímulo neutro é pareado com um reforçador primário, e a aquisição do condicionamento Pavloviano é acessada verificando as respostas condicionadas de aproximação ao CS. Posteriormente, duas novas barras são introduzidas na caixa de experimentação, e a resposta em uma delas leva à apresentação do CS, e a resposta na outra barra resulta em nenhuma consequência. Assim, acessa-se o valor motivacional adquirido ou evocado pelo CS através do seu poder de reforçar novas respostas operantes, obviamente, na ausência do reforçador primário. Nesse contexto, Cador e colaboradores (1989) verificaram que ratos com lesão do BLA tiveram o desempenho prejudicado nesse tipo de tarefa, exibindo uma significativa redução das respostas à barra que resultavam na apresentação do CS, em comparação com os controles. Os autores também mostraram que a infusão de d-anfetamina (agonista dopaminérgico) no núcleo accumbens potencializou essa resposta em animais controles e lesados.

Nesse mesmo sentido, Everitt e colaboradores (1989) avaliaram o desempenho de animais com lesão no BLA assim como os efeitos da injeção de d-anfetamina no núcleo accumbens, em uma tarefa de reforçamento condicionado utilizando um reforçamento sexual. Congruentemente com o trabalho anterior, os resultados mostraram que a lesão do BLA reduziu significativamente, e especificamente, as respostas operantes que levavam ao acesso ao estímulo previamente condicionado à apresentação da fêmea para cópula. Adicionalmente, injeções de d-anfetamina no núcleo accumbens potencializaram as respostas tanto em animais lesados como nos controles. Outro trabalho (Whitelaw *et al.*, 1996) reportou, consistentemente, que animais lesados no BLA também são prejudicados em manter respostas operantes num esquema de segunda-ordem quando o reforçamento envolve auto-administração de cocaína. É importante notar que, a aquisição da auto-administração da cocaína não foi alterada pela lesão do BLA. Ou seja, todos esses trabalhos sugerem que o comportamento de animais lesados na amígdala, mais especificamente no BLA, é afetado quando ele ocorre em função do valor motivacional de um evento reforçador adquirido ou evocado por um estímulo condicionado.

Por fim, Everitt e colaboradores (1991) avaliaram os efeitos de lesões isoladas e combinadas contralaterais do BLA e do estriado ventral no desempenho da tarefa de preferência condicionada a lugares. Os resultados indicaram que o BLA e o estriado ventral estão envolvidos nos processos subjacentes a esta tarefa comportamental e mais do que isso, interagem nesses processos.

Sugere-se, portanto, que o BLA seria importante para os mecanismos de associação entre um estímulo neutro e o valor do estímulo reforçador, que resultaria no poder do CS controlar respostas operantes, e mais ainda, que o núcleo accumbens, através de sua inervação dopaminérgica, exerceria uma amplificação das respostas comportamentais mediadas por esses processos associativos (Everitt e Robbins, 1992 e Everitt *et al.*, 1999, para revisões). As grandes projeções do núcleo basal da amígdala para o núcleo accumbens, e as inervações dos neurônios dopaminérgicos da área tegmental ventral também para o núcleo accumbens (Kelley *et al.*, 1982 e Johnson *et al.*, 1994 *apud* Hitchcott & Phillips, 1998; Swanson & Petrovich, 1998) representam um substrato neural para essas interações, assim como a facilitação ou a depressão da liberação de dopamina por neurônios do núcleo accumbens em função da atividade dos neurônios do BLA (Floresco *et al.*, 1998 ; Howland *et al.*, 2002).

Além disso, embora o BLA parecer ser importante para o aprendizado de associações estímulo-reforço, ele não é fundamental para a sua expressão. Por exemplo, Setlow e associados (2002) mostraram que ratos lesados no BLA, após terem adquirido previamente o condicionamento Pavloviano apetitivo de primeira-ordem, são capazes de aprender o condicionamento Pavloviano de segunda-ordem. Ademais, Lindgren e colaboradores (2003), em um interessante trabalho, condicionaram ratos a dois estímulos visuais diferentes numa situação de condicionamento Pavloviano apetitivo de primeira-ordem, e subsequente, submeteram os animais à lesão do BLA. Num teste imediatamente posterior, somente um dos estímulos condicionados foi sujeito a um esquema de extinção, e logo em seguida, os mesmos estímulos foram usados para o treino de condicionamento Pavloviano de segunda-ordem. Como esperado, ratos controles diminuíram significativamente as respostas condicionadas na presença do CS durante o teste de extinção, e também não eliciaram respostas condicionadas

de segunda-ordem envolvendo esse estímulo em especial. Interessantemente, a lesão do BLA realizada após o aprendizado do condicionamento de primeira-ordem, não impediu a extinção das respostas condicionadas ao CS de primeira-ordem, mas não levou, diferentemente dos controles, à diminuição das respostas condicionadas de segunda-ordem envolvendo o CS usado no esquema de extinção. Portanto, parece que de fato, os ratos lesados no BLA não extinguiram a associação estímulo-reforço aprendida antes da lesão, e por conseguinte, não aprenderam uma nova associação depois do dano amigdalár. Pelo fato de nesses animais, o CS evocar o valor emocional do US como foi aprendido antes da lesão, eles eliciaram respostas condicionadas de segunda-ordem envolvendo o mesmo CS, mesmo tendo ele sido sujeito à extinção depois da lesão. Além disso, faz sentido sugerir que os ratos lesados foram capazes de extinguir as respostas condicionadas de primeira-ordem pela mesma razão que foi possível, em outros estudos, de adquirirem respostas condicionadas de primeira-ordem apetitivas: através de um desempenho baseado em um sistema de aprendizagem de associação estímulo-resposta.

Adicionalmente, Balleine e colaboradores (2003) treinaram ratos lesados no BLA a pressionar uma barra tendo como consequência a apresentação de maltodextrina e a puxar uma corrente tendo como consequência a liberação de alimento, com o devido balanceamento dessas condições entre os grupos. Subseqüentemente, os ratos foram expostos à desvalorização de uma das consequências por meio da saciação específica com uma delas, uma hora antes da sessão de teste. Na sessão de teste, ambas as ações eram possíveis, mas nenhum reforço era liberado. Ratos normais apresentaram, durante o teste, um número significativamente menor da ação que havia sido associada à consequência desvalorizada, em comparação com a ação previamente associada ao reforço não desvalorizado. No entanto, ratos lesados no BLA não exibiram esse efeito, ou seja, para esses animais, ambas as ações foram realizadas a taxas similares ao longo do teste. Posteriormente, os mesmos animais receberam sessões adicionais do treino inicial e, subseqüentemente, foram submetidos a uma nova sessão de teste, a qual diferiu da primeira somente por envolver a liberação de reforço. Nesta situação, ratos normais continuaram mostrando um número menor da ação que havia

sido associada à conseqüência desvalorizada em comparação com a outra ação, ao longo de toda a sessão. Por outro lado, os ratos lesados apresentaram, no início da sessão de teste, ambas as ações a taxas similares, mas com o decorrer da sessão, um número maior da ação previamente associada com o reforço não desvalorizado; apesar de a discrepância entre as duas ações não atingir o nível dos animais normais. Esses resultados parecem indicar que ratos com lesão do BLA não são capazes de estabelecer associações entre uma resposta comportamental e o valor da sua conseqüência, isto é, o valor de incentivo do reforço. No entanto, ratos lesados ainda permanecem capazes de engajar um mecanismo que envolve associações do tipo estímulo-resposta, isto é, um processo de aprendizagem no qual estímulos discriminativos promovem um contexto para a efetuação de uma ação. Isso fica claro quando confrontamos os resultados obtidos nos dois testes. Note que a única diferença entre eles é que o primeiro consiste tipicamente em um teste de extinção (não há liberação de reforço), e o segundo envolve a apresentação dos reforços. No teste de extinção, após a desvalorização de um dos reforços, os ratos lesados dividem o seu comportamento de forma similar entre as duas ações ao longo de toda a sessão. Diferentemente, quando os reforços são liberados após cada ação, os ratos lesados apresentam uma curva de aprendizagem no sentido de efetuar mais a ação que é associada ao reforço não desvalorizado, em detrimento da outra ação. Portanto, parece que ratos com lesão do BLA são sensíveis ao valor do reforço somente quando têm experiência com ele, não sendo capazes de acessar a memória sobre a representação do valor corrente do reforço. De fato, um comportamento que é resultante exclusivamente de um mecanismo de aprendizagem envolvendo associação entre estímulo e resposta, só é alterado em função da mudança no valor de incentivo de um reforço quando as respostas efetuadas forem moduladas pela **experiência** com o novo valor do reforço, uma vez que, segundo as teorias vigentes, nesse tipo de aprendizagem os eventos reforçadores atuam meramente fortalecendo a conexão entre o estímulo discriminativo e a resposta, mas suas representações não são acessadas (ver Balleine e Dickinson, 1998 e Dayan e Balleine, 2002).

Congruentemente, existem fortes evidências de que o estriado dorsal estaria envolvido no aprendizado de tarefas nas quais uma resposta motora particular é reforçada na presença de

um estímulo discriminativo, ou seja, no aprendizado de associações estímulo-resposta. E de fato, sugere-se que a amígdala e o estriado dorsal funcionariam como sistemas independentes no que se refere aos mecanismos de associação estímulo-reforço e estímulo-resposta (McDonald e White, 1993; White e McDonald, 2002; McDonald e Hong, 2004).

Tarefas comportamentais envolvendo desvalorização do reforço, seja ela produzida por meio do pareamento do reforço com um mal-estar induzido ou por meio da saciação com o reforço, têm sido bastante utilizadas com a finalidade de se avaliar efeitos de danos amigdalares e de outras estruturas nervosas implicadas no processamento de ordem emocional, incluindo o córtex orbitofrontal, em aspectos específicos do aprendizado de associações estímulo-reforço, ou seja, na capacidade de um estímulo evocar a representação do valor corrente de um reforço (Hatfield *et al.*, 1996; Málková *et al.*, 1997; Pickens *et al.*, 2003; Blundell *et al.*, 2003; Balleine *et al.*, 2003). Por exemplo, no trabalho reportado acima, Hatfield e colaboradores (1996) expuseram ratos ao pareamento da ingestão de um alimento com um mal-estar (induzido pela administração de LiCl, i.p.); esses animais diminuíram a resposta condicionada ao CS que havia sido previamente associado à apresentação daquele alimento, em comparação com ratos que receberam pareamento do alimento com salina. Isto é, a redução do valor de incentivo do alimento, que ocorreu através de seu pareamento com um mal-estar, levou a uma redução das respostas condicionadas, indicando que o CS evoca a representação do valor motivacional **corrente** do estímulo (US) ao qual foi previamente associado. Ainda, ratos lesados no BLA não apresentaram essa diminuição das respostas condicionadas após a desvalorização do reforço, indicando, como já mencionado, que essa estrutura parece ser importante na formação de representações que associam pistas às propriedades motivacionais do reforço. É importante notar que ratos lesados diminuíram o consumo do alimento após a sua desvalorização de forma semelhante aos seus controles, ou seja, a lesão do BLA não interferiu sobre os processos de atribuição de valor hedônico ou de incentivo ao reforço.

Ainda, Blundell e colaboradores (2001), em um interessante trabalho, treinaram ratos lesados no BLA em uma tarefa especial de discriminação condicional. Para um grupo

denominado *consistente*, na presença de um estímulo sonoro A, a resposta operante de pressionar uma de duas barras (e.g., barra X) disponíveis ao animal, levava à apresentação de sacarose como recompensa, e por outro lado, a resposta à outra barra (barra Y) não era reforçada. Ainda para o mesmo grupo, a resposta à barra X não era reforçada diante de um estímulo sonoro B, mas pressionar a barra Y, diante desse estímulo, resultava na obtenção de ração alimentar. Para um segundo grupo, chamado pelos autores de *inconsistente*, pressionar a barra X diante do estímulo A, levava à obtenção de sacarose ou de ração, com iguais probabilidades, mas pressionar a outra barra não resultava em qualquer recompensa. Por outro lado, na presença do estímulo B, era a resposta à barra Y que promovia a obtenção das duas recompensas, mas a pressão na barra X não era reforçada. Os resultados indicaram que apesar de os ratos lesados no BLA não terem se mostrado prejudicados quanto à discriminação condicional, isto é, terem efetuado mais respostas nas barras corretas que nas incorretas, eles não mostraram um efeito esperado para animais normais de responderem mais na barra correta se pertencessem ao grupo consistente do que se ao grupo inconsistente. Os autores sugeriram que a lesão do BLA incapacitou ratos a fazerem uso das diferenças sensoriais entre as recompensas para tornar mais fácil o aprendizado da discriminação. Ou seja, que ratos lesados no BLA não formam associações entre eventos inicialmente neutros e as propriedades sensoriais específicas de estímulos motivacionalmente significantes.

Consistentemente com esses últimos achados, os mesmos autores, no mesmo trabalho, (Blundell *et al.*, 2001) avaliaram os efeitos de lesões do BLA sobre o desempenho de ratos em uma tarefa comportamental envolvendo transferência Pavloviana-instrumental ("Pavlovian-instrumental transfer", PIT) aversiva. O efeito de PIT é caracterizado por uma modulação do desempenho operante por um estímulo condicionado Pavloviano; por exemplo, quando um estímulo prediz a ocorrência de uma recompensa, a resposta operante do animal é aumentada na presença do estímulo condicionado, mesmo que ele esteja trabalhando por uma recompensa diferente. Sugere-se que esse efeito ocorre devido a uma alteração no estado motivacional provocada pela presença do estímulo condicionado (ver Cardinal *et al.*, 2002, para revisão). Blundell e colaboradores (2001) mostraram que ratos lesados no BLA quando

testados em relação ao efeito de PIT para um reforçamento específico, apresentaram desempenho normal quanto ao aumento **generalizado** das respostas operantes diante de estímulos condicionados Pavlovianos; porém, não aumentaram **especificamente** respostas operantes que previamente resultavam na mesma recompensa sinalizada pelo estímulo condicionado. Os autores sugeriram que a habilidade de o CS evocar representações sobre um aspecto motivacional mais genérico do US está intacta nos animais lesados no BLA, porém esses animais não seriam capazes de formar associações entre o CS e os aspectos sensoriais específicos do US (isso inclui os valores hedônicos e de incentivo do US); em outras palavras, e congruentemente com os dados reportados anteriormente, para os animais lesados, o CS promoveria uma expectativa mais genérica sobre as propriedades alertantes da recompensa, mas não sobre quais recompensas específicas ocorreriam. Mais ainda, os autores defendem que animais lesados no BLA não teriam seu desempenho baseado estritamente em associações do tipo estímulo-resposta, uma vez que foram capazes de aumentar suas respostas operantes durante a apresentação do CS.

A interpretação de que o BLA exerce um papel importante em associações que permitem um estímulo acessar representações específicas de um evento motivacionalmente significativo é consistente com numerosos estudos eletrofisiológicos. Um dos primeiros a reportar a presença de neurônios na amígdala responsivos a estímulos associados com eventos reforçadores foi um grupo de pesquisadores japoneses (Nishijo *et al.*, 1988; Muramoto *et al.*, 1993). Esse grupo também mostrou que neurônios responsivos a estímulos condicionados de diferentes naturezas sensoriais são organizados topograficamente na amígdala (Ono *et al.*, 1995). Por exemplo, neurônios amigdalares unimodais que respondem a estímulos auditivos ou somatosensoriais associados a um reforçador são encontrados majoritariamente no núcleo lateral, ao passo que neurônios unimodais responsivos a estímulos olfativos condicionados localizam-se na sua maioria no núcleo basal acessório. Além disso, mostraram que neurônios amigdalares que respondem à estimulação visual condicionada são primordialmente multimodais, e são encontrados principalmente nos núcleos basal e central. Também reportaram que a maioria dos neurônios multimodais amigdalares que respondem a

estímulo condicionada localizam-se nos núcleos basal e central da amígdala. Nota-se, portanto, que esses dados eletrofisiológicos são consistentes com aqueles reportados por estudos da hodologia amigdalar.

Congruentemente com os resultados relativos aos efeitos de danos amigdalares e do córtex orbitofrontal sobre tarefas envolvendo desvalorização de reforço (Hatfield *et al.*, 1996; Málková *et al.*, 1997; Gallagher *et al.*, 1999), Gottfried e associados (2003), em um estudo conduzido em humanos mostraram, através de ressonância magnética funcional, que a atividade da amígdala e do córtex orbitofrontal diminui frente a um estímulo condicionado, quando ele passa a prever a ocorrência de um evento reforçador que foi desvalorizado.

Além disso, Schoenbaum e colaboradores (1998; 1999) ao registrar a atividade eletrofisiológica de neurônios do BLA e do córtex orbitofrontal de ratos em uma tarefa de discriminação olfativa, na qual um dado estímulo olfativo era associado ao fornecimento de sacarose, enquanto que um segundo odor era pareado à liberação de uma solução aversiva de quinino, mostraram que populações de neurônios em ambas as estruturas desenvolvem, com o treino, uma atividade diferencial durante a experimentação do odor em função do seu significado (se apetitivo ou aversivo). Enquanto isso, outras populações de neurônios, bastante diferentes das primeiras, desenvolvem uma atividade diferencial em função do significado da pista durante o intervalo que precede a liberação do reforço; tal resposta foi considerada pelos autores como uma atividade de antecipação ao reforço específico. Ademais, especialmente no BLA, esses últimos neurônios exibem, durante o intervalo que precede a liberação do reforço, um padrão de atividade muito semelhante ao padrão de atividade durante o contato que o sujeito tem com o reforço; ou seja, se um neurônio tem uma taxa de disparo elevada durante o intervalo que antecede a apresentação de sacarose, ele também mostrará elevada taxa de disparos durante o intervalo do reforçamento.

Ainda, em relação ao BLA esses mesmos pesquisadores relataram que o aumento dos disparos dos neurônios relacionados com a expectativa pelo reforço está mais correlacionado com a fase inicial de aquisição da discriminação olfativa; no córtex orbitofrontal, ele se correlaciona mais com a fase de treino em que o critério de aprendizagem já foi atingido

(Schoenbaum *et al.*, 2000). Portanto, a “codificação” associativa ocorre primeiro na amígdala e emerge, subseqüentemente, no córtex orbitofrontal. Ademais, a atividade do BLA parece estar mais relacionada com a significância das pistas, enquanto que a do córtex orbitofrontal estaria mais ligada com a decisão comportamental durante a discriminação. Schoenbaum e colaboradores (2000) ainda notaram que num teste de reversão da discriminação olfativa, neurônios do córtex orbitofrontal mudam seu padrão de disparo, ao passo que no BLA, os neurônios mantêm suas respostas antigas. Portanto, em situações de mudança na contingência reforçadora, mesmo que associações originais não sejam expressas no comportamento, elas podem ser mantidas na rede neural enquanto novas associações são aprendidas.

Mais tarde, Schoenbaum e colaboradores (2003b) verificaram que após lesão do BLA, durante a mesma tarefa de discriminação olfativa, o número de neurônios no córtex orbitofrontal que mostram aumento da atividade durante a exposição ao odor em função do seu valor de incentivo diminui significativamente, ao passo que a quantidade de neurônios mais responsivos durante o intervalo que precede a liberação do reforço é semelhante ao de ratos normais. Além disso, após a lesão do BLA, os neurônios do córtex orbitofrontal que disparam seletivamente durante a apresentação dos odores são mais sensíveis às identidades desses estímulos do que ao valor de incentivo associado a eles. Esses dados indicam que a lesão do BLA preveniu a formação, no córtex orbitofrontal, de representações que correlacionam um estímulo com o valor de incentivo de um evento associado a ele. Isso gera fortes restrições a interpretações de que em animais lesados essas representações ficariam imunes a mudanças na contingência reforçadora ou até de que elas tornar-se-iam inacessíveis na memória deles. Ao contrário, isso fortalece a sugestão de que animais lesados no BLA, de fato, não estabelecem representações associativas do tipo estímulo-reforço (Schoenbaum *et al.*, 2003b).

Assim, diversos estudos referem-se ao BLA como uma região crítica, na amígdala, para aspectos específicos da formação de associações estímulo-reforço. Por outro lado, outros estudos mostram a participação de uma segunda região amigdalar, o núcleo central (Ce), em outras facetas da associação entre um dado estímulo e um evento motivacionalmente

significante. Por exemplo, Hatfield e associados (1996) reportaram, numa tarefa de condicionamento Pavloviano apetitivo de segunda-ordem, que ratos lesados no BLA não adquirem respostas condicionadas de segunda-ordem, mas adquirem respostas de orientação ao CS (considerada como uma resposta do tipo atencional ou de alerta). A lesão do núcleo central (Ce), por outro lado, levou a um padrão inverso de resultados. Além do mais, o mesmo trabalho mostra que lesão do Ce, diferentemente da perda do BLA, não teve efeito sobre a sensibilidade das respostas condicionadas de segunda-ordem frente à desvalorização do US. Assim, parece que o Ce, ao contrário do BLA, não é fundamental para que o CS evoque ou adquira o valor reforçador do US. Consistentemente com esses resultados, Parkinson e colaboradores (2000) também mostraram que lesão do Ce, mas não do BLA, leva a um prejuízo no desempenho de respostas de orientação ao CS num condicionamento Pavloviano apetitivo de primeira-ordem.

Congruentemente, Hitchcott e Phillips (1998) observaram dissociação de desempenho entre animais com infusão de um agonista dopaminérgico no BLA ou no Ce. Ratos com infusão do agonista dopaminérgico no BLA, mas não aqueles com infusão no Ce, passaram a apresentar prejuízo no desempenho de **respostas operantes** para a obtenção do estímulo reforçador condicionado, enquanto ratos com infusão do agonista no Ce mostraram prejuízo na eliciação de respostas condicionadas de **orientação** ao CS.

Além disso, Corbit e Balleine (2005) mostraram que lesão do BLA interfere no efeito de PIT **específico**, mas não o geral, e ao contrário, lesão do Ce prejudica o efeito **geral** de PIT, mas não o específico. Ou seja, a lesão do BLA, mas não do Ce, só prejudica o efeito de PIT quando uma resposta operante particular, que é reforçada por uma recompensa específica, é potencializada na presença de um determinado CS, que previamente havia sido associado àquela determinada recompensa. Entretanto, a lesão do Ce, mas não do BLA, só prejudica o efeito de PIT quando uma resposta operante particular, que é reforçada por uma recompensa específica, é aumentada na presença de um CS que previamente **não** havia sido associado àquela determinada recompensa, mas sim com um outro reforço. Assim, os autores sugeriram que o Ce parece ser importante quando um estímulo produz um aumento numa resposta

operante como resultado de efeitos alertantes daquele estímulo, por ter sido associado com aspectos mais genéricos do reforço. E diferentemente, o BLA parece ser crítico quando um estímulo gera um aumento de uma resposta operante particular como resultado da sua associação com as propriedades sensoriais específicas de um determinado reforço.

Portanto, sugere-se que, ao contrário do BLA que aparentemente estaria envolvido com a habilidade de um estímulo evocar representações sobre aspectos sensoriais específicos de um segundo estímulo, motivacionalmente significativo (incluindo seus valores hedônicos e de incentivo), o Ce supostamente estaria relacionado com os processos pelos quais um estímulo evoca as qualidades motivacionais mais genéricas de um estímulo significativo, como por exemplo suas propriedades atencionais ou de alerta. Consistentemente com as dissociações de desempenho entre animais com danos no BLA e no Ce, encontram-se as diferenças anatômicas e hodológicas desses núcleos amigdalares. Enquanto o Ce influenciaria os componentes autonômicos, endócrinos e reflexos das respostas emocionais através de suas amplas projeções para o hipotálamo e para o tronco encefálico, assim como influenciaria processos atencionais e alertantes através de suas projeções para os neurônios monoaminérgicos do tronco encefálico (área tegmental ventral) e para os neurônios colinérgicos do prosencéfalo basal, o BLA, através de sua particular interação com o córtex pré-frontal e com o estriado, proveria a base para respostas emocionais “voluntárias”, isto é, capacitando o animal a agir adequadamente em seu ambiente: direcionando-se ou esquivando-se de um dado evento biologicamente relevante.

A amígdala e a aquisição do condicionamento aversivo

Até o momento nos detivemos a uma área de estudo envolvendo a amígdala que, na prática, é segregada de um outro grande ramo de investigação, que compreende as pesquisas sobre o condicionamento aversivo. Surpreendentemente isso ocorre, apesar de essas duas áreas de estudo compartilharem a mesma base teórica. Segundo teorias mais influentes, o condicionamento aversivo também envolve processos associativos nos quais representações

de um estímulo motivacionalmente significativo são acessadas por representações de um segundo estímulo, o qual informa sobre a ocorrência do primeiro (ver Maren, 2001). Por exemplo, no condicionamento aversivo Pavloviano, a apresentação de um estímulo inicialmente neutro é pareada com um evento aversivo, tal como um choque nas patas, e com o treino passa a eliciar respostas que tipicamente ocorrem na presença de perigo, tais como comportamentos defensivos (e.g., respostas de congelamento), respostas autonômicas (e.g., mudança de pressão arterial e batimentos cardíacos), respostas neuroendócrinas (e.g., liberação de hormônios das glândulas adrenais e da pituitária), entre outras. De fato, é indiscutível o fato de ter-se dado, até o momento, mais atenção à investigação do envolvimento amigdalár e dos mecanismos celulares e moleculares subjacentes em tarefas comportamentais relacionadas ao medo, particularmente em tarefas de condicionamento clássico aversivas e de esquiva, do que em situações envolvendo reforçamento apetitivo.

Numerosos estudos fortemente sugerem o envolvimento da amígdala, e em especial do BLA, também na aquisição do medo condicionado (Miserendino *et al.*, 1990; Campeau *et al.*, 1992; Fanselow e Kim, 1994; Campeau e Davis, 1995; Maren *et al.*, 1996a; 1996b; Cousens e Otto, 1998; Lee e Kim, 1998; Wilensky *et al.*, 1999; 2000); essa estrutura seria um sítio importante de plasticidade neural responsável pela associação entre um estímulo previamente neutro com um outro de natureza aversiva (ver adiante). Portanto, o BLA parece não estar somente envolvido com a formação de associações entre um estímulo neutro e outro com significado apetitivo (como vimos até o momento), mas participaria da formação de associações estímulo-reforço de uma maneira mais abrangente, ou seja, também em situações aversivas.

Brady e colaboradores (1954; ver Maren, 2001, para revisão) possivelmente foram os primeiros a reportar o envolvimento da amígdala no medo condicionado. Mostraram que grandes aspirações da amígdala de gatos levam a um prejuízo na aquisição, mas não na retenção, de uma tarefa de esquiva. Mais tarde, Blanchard e Blanchard (1972) reportaram que ratos com lesões amigdalares perdem respostas condicionadas de congelamento ao contexto

no qual ocorreu o condicionamento aversivo Pavloviano, assim como respostas de medo inatas frente a um predador natural.

Mais recentemente, Campeau e Davis (1995) mostraram que lesão do BLA produz um prejuízo de aprendizagem da tarefa de sobressalto potencializado pelo medo. Nesta situação comportamental, a resposta de sobressalto perante a um dado estímulo sonoro é aumentada na presença de um CS que havia sido condicionado a um evento aversivo, como por exemplo, um choque nas patas. Maren e colaboradores (1996a) verificaram prejuízo no aprendizado do condicionamento clássico aversivo envolvendo som e contexto em ratos, após lesão neurotóxica do BLA. Além disso, Cousens e Otto (1998) demonstraram que ratos lesados no BLA também apresentam-se prejudicados quanto à aquisição do condicionamento aversivo a uma pista olfativa e ao contexto.

Outros estudos mostraram que a administração de um antagonista de receptores NMDA (AP5) no BLA leva a um prejuízo de aquisição da tarefa de sobressalto potencializado pelo medo (Miserendino *et al.*, 1990; Campeau *et al.*, 1992). Mais tarde, Fanselow e Kim (1994) verificaram que a infusão de AP5 no BLA, mas não no Ce, também resulta em prejuízo de aprendizagem do condicionamento clássico aversivo ao contexto. Maren e colaboradores (1996b) obtiveram resultados semelhantes. Enquanto isso, Lee e Kim (1998) reportaram diminuição de respostas condicionadas de congelamento frente a um estímulo sonoro, após infusão de AP5 no BLA. Esses dados são consistentes com a hipótese de que a indução de potenciação de longa-duração (LTP) dependente de receptores NMDA no BLA serviria como substrato neural para o condicionamento aversivo (ver Maren, 1999 e Blair *et al.*, 2001). Adicionalmente, Wilensky e colaboradores (1999; 2000) observaram que inativação do BLA por muscimol, logo antes do treino, leva a uma queda significativa da resposta de congelamento durante o teste de condicionamento clássico aversivo ao som.

Amoraphant e colaboradores (2000) sugerem que dentro do BLA, o núcleo lateral (LA) parece ser a estrutura crítica para os processos associativos subjacentes ao condicionamento aversivo, pelo menos para um estímulo auditivo. Esses autores mostraram que enquanto lesão eletrolítica do LA prejudica a eliciação de respostas condicionadas de

congelamento a um CS auditivo e a emissão de respostas operantes de esquiva na presença do mesmo CS, a lesão restrita ao núcleo basal (BL) só tem efeitos sobre o último tipo de resposta. Os autores defenderam a interpretação de que o LA seria o sítio da aprendizagem do condicionamento aversivo, e que informações sobre a associação CS-US seriam transmitidas para o BL, que por sua vez modularia a emissão de novas respostas operantes na presença do CS, através de suas projeções para o estriado.

Diferentemente do BLA, sugere-se que o Ce seria somente uma interface para a produção de respostas condicionadas de medo, e não uma região importante para a plasticidade neural envolvida no aprendizado do condicionamento Pavloviano (ver LeDoux, 1995; Rogan & LeDoux, 1996; Armony & LeDoux, 1997). Ou seja, que os processos associativos subjacentes ao condicionamento aversivo ocorreriam no BLA, talvez particularmente no LA (Amoraphant *et al.*, 2000), e que as informações processadas seriam enviadas para o Ce, que por sua vez funcionaria como uma porta de saída para a geração de respostas autonômicas, endócrinas e comportamentais através de suas projeções para o hipotálamo e tronco encefálico. Por exemplo, apesar de lesão do Ce resultar em prejuízo na aquisição de tarefas envolvendo condicionamento aversivo (Iwata *et al.*, 1986; Roozendaal *et al.*, 1991), infusão de antagonistas de receptores NMDA (e.g. AP5) no Ce não leva à diminuição de respostas condicionadas aversivas, ao contrário do que ocorre após infusão dessas drogas no BLA (Fanselow e Kim, 1994). Ademais, estimulação elétrica do Ce produz uma série de respostas similares àquelas resultantes de um condicionamento aversivo. Em ratos não anestesiados, estimulação elétrica do Ce leva a um aumento da pressão arterial e da taxa de batimentos cardíacos (provavelmete através de projeções diretas para o núcleo motor dorsal do vago, o núcleo do trato solitário e medula). A estimulação elétrica do Ce também resulta em aumento do estado de atenção e de alerta (por meio de projeções para locus coeruleus, área tegmental ventral e prosencéfalo basal), em imobilidade (por meio de projeções para a substância cinzenta periaquedutal), em facilitação do reflexo de sobressalto (núcleo reticular pontino caudal), entre outros. Assim, uma vez que a estimulação da amígdala resulta em uma variedade de respostas encontradas durante um estado de medo, mesmo na

ausência de um condicionamento aversivo prévio, parece que as bases neurais para a eliciação de tais respostas já estariam formadas em um indivíduo adulto, ou seja, que essas redes neurais já estariam prontas e teriam sido selecionadas pelo processo evolutivo. Então, parece que, para um dado estímulo eliciar um conjunto de respostas de medo seria necessário que ele simplesmente ativasse a amígdala, a qual engajaria um conjunto de mudanças comportamentais em virtude de suas conexões com outras estruturas do sistema nervoso. Portanto, a plasticidade envolvida num condicionamento aversivo resultaria de mudanças sinápticas que ocorreriam dentro da amígdala ou em uma estação anterior, e não de mudanças sinápticas nas áreas que a amígdala aferenta (ver Davis, 2000, para revisão).

Em contrapartida com a visão de que o Ce receberia informação já processada pelo BLA, e funcionaria somente como uma interface para a produção de respostas de medo, encontra-se o trabalho de Killcross e colaboradores (1997). Ao testarem animais numa situação de condicionamento aversivo a uma pista, onde podiam simultaneamente avaliar respostas do tipo operantes e Pavlovianas, os autores mostraram que ratos com lesão do BLA foram incapazes de se esquivar do estímulo condicionado aversivo por comportamento operante “voluntário”, mas exibiram supressão do comportamento de aproximação ao estímulo condicionado aversivo de forma semelhante aos controles. Enquanto isso, a lesão do Ce levou ao padrão inverso de resultados. Portanto, parece que o BLA não transmite informações aversivas para o Ce no que se refere à produção de respostas de supressão; ou seja, o Ce poderia mediar processos **associativos** subjacentes a alguma forma de condicionamento aversivo.

Concluindo, de acordo com o modelo vigente sobre as bases neurais do condicionamento aversivo Pavloviano proposto pelo grupo de Joseph LeDoux, a convergência de informações a respeito do CS e do US aumentaria a eficiência de sinapses que carregam informação sobre o CS no LA. Como resultado, apresentações subseqüentes do CS na ausência do US evocariam grandes respostas no LA. O LA, por sua vez, evocaria respostas condicionadas através de suas projeções para o Ce, o qual é uma das principais portas de saída da amígdala para o hipotálamo e o tronco encefálico. Assim, de acordo com o modelo

vigente, o LA seria o principal sítio de plasticidade para o condicionamento aversivo, enquanto que o Ce seria visto como uma simples interface para a modulação de respostas condicionadas. Recentemente este modelo foi revisto, levando em conta dados pertinentes indicando que os neurônios do LA não inervam diretamente neurônios do Ce que se projetam para fora da amígdala, e ainda considerando estudos sugerindo que o Ce é também um sítio de plasticidade independente do LA. Atualmente, sugere-se que a ativação do Ce pelo LA é intermediada por duas populações de células GABA-érgicas da *massa de células intercaladas* (localizada entre o BLA e o Ce), e que o Ce poderia também mediar processos associativos subjacentes ao condicionamento aversivo (ver Paré *et al.*, 2004, para revisão). Apesar de algumas evidências favorecerem a interpretação contrária, esses pesquisadores não consideram o núcleo basal (BL) como um importante sítio de plasticidade para o medo condicionado (ver adiante).

Os núcleos lateral e basal do BLA processariam dimensões sensoriais distintas?

Estudos eletrofisiológicos e hodológicos envolvendo a amígdala sugerem que diferentes representações sensoriais de um estímulo poderiam ser processadas paralelamente na amígdala, sendo o BL importante na codificação multimodal dos estímulos, e o LA na codificação unimodal (Pitkänen *et al.*, 1997; Ono *et al.*, 1995; Toyomitsu *et al.*, 2002).

Como mencionado anteriormente, estudos sobre a hodologia amigdalar mostram que o BL é um dos principais alvos amigdalares de informações polimodais originárias do córtex pré-frontal, do córtex perirrinal e da formação hipocampal, além de receber informações unimodais de natureza gustativa, visceral e somatosensorial. Por outro lado, o LA é a principal via de entrada, na amígdala, de informações unimodais de todas as naturezas sensoriais. Por exemplo, informações auditivas que acessam a amígdala têm origem nas áreas de associação auditivas e no núcleo geniculado medial do tálamo, e terminam majoritariamente no LA (McDonald, 1998 e Pitkänen, 2000, para revisões).

Estudos neurofisiológicos mostram que os neurônios multimodais amigdalares responsivos a estímulos condicionados encontram-se primordialmente no BL, enquanto que neurônios unimodais que respondem a estimulação condicionada encontram-se principalmente no LA (Toyomitsu *et al.*, 2002; Ono *et al.*, 1995). Mais especificamente, Toyomitsu e colaboradores (2002) reportaram que a maioria dos neurônios responsivos a estímulos condicionados auditivos na amígdala encontra-se no LA e no BL. Desses neurônios, os unimodais localizam-se majoritariamente no LA e os multimodais no BL. Além disso, observaram que a grande maioria de neurônios responsivos a estímulos condicionados visuais são multimodais, e localizam-se principalmente no BL.

Ademais, a estimulação elétrica do tálamo auditivo induz LTP em neurônios do LA, mas não do BL, ao passo que a estimulação elétrica do córtex perirrinal resulta em LTP em neurônios do BL, mas não do LA (Yaniv *et al.*, 2001). Isso indica que representações unimodais de um estímulo (ao menos auditivas) seriam processadas no LA, enquanto que representações polimodais (ao menos as provenientes do córtex perirrinal) atingiriam o BL, e mais do que isso, induziriam plasticidade sináptica nessas diferentes regiões da amígdala.

Portanto, a organização das conexões amigdalares, em conjunto com dados eletrofisiológicos, sugere que diferentes representações de um estímulo poderiam estar ocorrendo em paralelo dentro da amígdala (Pitkänen *et al.*, 1997), e mais ainda, que processos associativos envolvendo representações unimodais ou polimodais poderiam ocorrer em diferentes núcleos amigdalares. Isso implicaria que diferentes circuitos intra-amigdalares poderiam estar sendo usados no condicionamento de estímulos de diferentes modalidades.

Alguns estudos mostram que informações sobre um CS auditivo e um US aversivo convergem em um mesmo neurônio, no LA (Romanski *et al.*, 1993). Ademais, registros eletrofisiológicos da atividade neural do LA apóiam a idéia de que associações entre um CS auditivo e um US aversivo ocorrem nessa região da amígdala, em particular (Blair *et al.*, 2001, para revisão). Quirk e colaboradores (1995) reportaram, através de registro neuronal unitário, que o condicionamento clássico aversivo a um som induz mudanças na atividade neural do LA, ou seja, que a experiência com um CS auditivo leva a um aumento do padrão

de disparos de neurônios nessa região. Os autores, baseados em latências de disparo, sugerem ainda que essa plasticidade neural no LA seria mediada por projeções provenientes do tálamo (núcleo geniculado medial) e não por aferência cortical (Quirk *et al.*, 1997). Finalmente, existem fortes evidências de que o condicionamento clássico aversivo a um som induz LTP, dependente de receptores NMDA, em neurônios do LA (ver Blair *et al.*, 2001).

Animais também exibem respostas condicionadas de medo ao ambiente no qual são submetidos ao condicionamento aversivo, e não só a um CS discreto associado ao evento aversivo. A esse tipo de condicionamento dá-se o nome de condicionamento aversivo ao contexto. Diferentemente do condicionamento aversivo a um som, no qual a informação sobre um estímulo sonoro discreto parece atingir a amígdala (talvez particularmente o LA) através de projeções diretas do tálamo e do córtex auditivo, acredita-se que o condicionamento aversivo ao contexto requer a transmissão, para a amígdala, de representações sobre uma configuração unificada de múltiplos estímulos, possivelmente dependentes do funcionamento da formação hipocampal (ver Anagnostaras *et al.*, 2001 e Maren, 2001).

O aprendizado sobre um contexto parece envolver a integração de uma multiplicidade de estímulos elementares, de uma variedade de modalidades, em uma única representação. Por exemplo, após o condicionamento a um contexto, as respostas condicionadas não são eliciadas por componentes únicos do contexto, mas somente pela configuração completa dos elementos (ver Pickens e Holland, 2004, para revisão). Ademais, se um animal recebe um choque nas patas **imediatamente** depois que é colocado no aparelho de condicionamento, posteriormente ele não exibirá respostas condicionadas de medo àquele contexto — fenômeno que leva o nome de *prejuízo do choque imediato* — o que não ocorre no condicionamento aversivo a um CS discreto. Segundo Fanselow (1990), a resposta condicionada de congelamento aumenta linearmente com o aumento do intervalo entre a introdução do animal no aparelho de treino e a liberação do choque nas patas (até dois minutos). Além disso, a pré-exposição ao contexto um dia antes do imediato condicionamento aversivo também resulta em aumento da resposta condicionada de congelamento ao contexto (*efeito de facilitação pela pré-exposição ao contexto*). E ainda, a pré-exposição a todos os elementos do contexto, em

separado, não melhora o condicionamento ao contexto (ver Rudy *et al.*, 2004, para revisão). Fanselow (1990) propôs, então, que para que um ambiente ou contexto pudesse ser condicionado aversivamente, seria necessário a formação de uma representação configuracional dos vários elementos do ambiente, a qual seria então associada com a representação do US. Defendeu, ainda, que um certo período de tempo seria imprescindível para a construção dessa representação.

Nesse sentido, a aquisição do condicionamento clássico aversivo ao contexto parece também envolver o aprendizado configuracional sobre os múltiplos elementos constituintes do contexto em questão. Existem fortes evidências de que a integridade funcional do hipocampo é crítica para a aquisição e a consolidação de uma representação unificada de um contexto (O'Keefe e Nadel, 1978; Nadel *et al.*, 1985; Sutherland e Rudy, 1989). Parece ser esse o papel desempenhado pelo hipocampo durante o aprendizado do condicionamento clássico aversivo a um contexto, ao invés da formação da associação entre o CS contextual e o US, a qual, possivelmente, é dependente da amígdala. Por exemplo, lesão hipocampal prejudica a aquisição do condicionamento aversivo ao contexto, mas não ao som, quando é realizada antes do treino (Phillips e LeDoux, 1992; Kim *et al.*, 1993; Young *et al.*, 1994; Maren e Fanselow, 1997; Maren *et al.*, 1998; Selden *et al.*, 1991) ou alguns dias depois do treino (Kim e Fanselow, 1992; Anagnostaras *et al.*, 1999). Ademais, enquanto lesões hipocampais realizadas antes do condicionamento ao contexto resultam em prejuízos comportamentais moderados, lesões produzidas após o treino levam a profundos prejuízos das respostas condicionadas. Isso sugere que durante o condicionamento, em animais normais, múltiplas representações elementares de um contexto competiriam com uma representação unificada e configuracional do mesmo contexto pela associação com o US. E também indica que animais com lesões hipocampais utilizar-se-iam de representações elementares durante a aquisição do condicionamento aversivo ao contexto; daí os prejuízos de desempenho moderados quando o treino ocorre após a lesão (ver Anagnostaras *et al.*, 2001).

Em um elegante trabalho de Anagnostaras e colaboradores (1999), envolvendo investigação intra-sujeitos, ratos foram pré-expostos a um dado contexto e, após 35 dias,

receberam condicionamento aversivo a esse mesmo contexto e a um contexto totalmente distinto. Subseqüentemente, os sujeitos foram submetidos à lesão do hipocampo dorsal e, então, testados quanto ao medo condicionado aos dois contextos diferentes. Interessantemente, apesar do desempenho de ratos controles não ter diferido nos testes de medo condicionado ao contexto pré-exposto e ao contexto não pré-exposto, animais com lesões do hipocampo exibiram acentuado prejuízo na eliciação de respostas condicionadas ao contexto não pré-exposto, e nenhuma perda significativa no teste realizado no contexto pré-exposto. Portanto, parece que ratos lesados no hipocampo se beneficiaram da pré-exposição ao contexto, 35 dias antes do treino de condicionamento, para o estabelecimento de representações configuracionais sobre o contexto.

A representação contextual de um dado ambiente parece compartilhar propriedades semelhantes com a representação configuracional que permeia algumas tarefas de discriminação, tais como a discriminação de padrão negativo (“negative patterning discrimination”). Nessa tarefa comportamental, o sujeito deve aprender que respostas a um estímulo discreto A (e.g., visual) ou a um estímulo discreto B (e.g., sonoro) são recompensadas, enquanto que respostas aos estímulos A e B quando aparecem juntos, não são reforçadas. Esse problema de discriminação não poderia ser resolvido por uma simples somação das representações dos estímulos A e B, uma vez que essa estratégia levaria à produção de respostas para a obtenção do reforço, como na presença de A ou B isolados. Diferentemente, espera-se que seja formada uma representação única e configuracional sobre AB, a qual, apesar de ser “composta” por A e B, é diferente e pode ser discriminada de seus constituintes individuais A e B (Sutherland e Rudy, 1989, Rudy e Sutherland, 1989; Rudy *et al.*, 1995).

Alguns estudos mostram que lesão do hipocampo leva a um prejuízo de desempenho na tarefa de discriminação de padrão negativo (Sutherland e Rudy, 1989, Rudy e Sutherland, 1989; Rudy *et al.*, 1995), apoiando a hipótese de que o hipocampo seria crítico para a formação de representações contextuais ou configuracionais. Por outro lado, a amígdala parece não exercer qualquer papel na formação desse tipo de representação (Sutherland e

McDonald, 1990), a não ser, possivelmente, na modulação de um estado de alerta, o qual favoreceria o processamento de informações sensoriais (uni e multimodais), na ocorrência de eventos de relevância emocional (Phelps, 2004).

Com base nesses estudos, hipotetizamos que o LA pode estar envolvido especialmente no condicionamento aversivo de estímulos discretos (ou unimodais), enquanto que o condicionamento aversivo a um contexto (ou estimulação multimodal) poderia requerer o funcionamento do BL, em particular.

Em contrapartida à grande quantidade de trabalhos que investigaram os efeitos de lesões relativamente extensas do **BLA** sobre a aquisição do medo condicionado, pouco se sabe sobre os efeitos de lesões restritas aos seus constituintes isoladamente (**LA, BL e basal acessório - BM**), tanto sobre o medo condicionado quanto sobre tarefas envolvendo reforçamento apetitivo.

Recentemente, Nader e colaboradores (2001) objetivando elucidar a contribuição de diferentes núcleos amigdalares para a aquisição do medo condicionado a um estímulo sonoro, verificaram que lesões **eletrolíticas** do LA ou do Ce resultaram em severos prejuízos na eliciação de respostas condicionadas de congelamento a um CS auditivo; porém, lesões eletrolíticas restritas ao BL, BM ou ao núcleo medial não produziram qualquer efeito sobre esse condicionamento. Amorphant e colaboradores (2000) descreveram resultados similares. Entretanto, Goosens e Maren (2001) obtiveram resultados distintos; lesões seletivas do LA, do Ce, ou do BL em conjunção com o BM, resultaram em prejuízo de aquisição do medo condicionado, tanto auditivo quanto contextual. Entretanto, estes últimos autores, a fim de obter lesões seletivas desses núcleos amigdalares, produziram grandes lesões eletrolíticas de todo o complexo amigdalare em um hemisfério em associação a lesões neurotóxicas seletivas contralaterais em núcleos específicos da amígdala. A diferença metodológica para a produção das lesões seletivas nesses trabalhos pode ter causado as discrepâncias nos resultados comportamentais.

Por outro lado, Yaniv e colaboradores (2004) observaram que **inativação reversível** do BL com lidocaína, 24 horas após a fase de aquisição do condicionamento aversivo, leva a

um prejuízo de desempenho no teste de medo condicionado ao contexto, mas não ao som, em concordância com a hipótese delineada acima.

Portanto, face aos sugestivos dados hodológicos e neurofisiológicos sobre o possível envolvimento diferencial dos núcleos constituintes do BLA no condicionamento aversivo de estímulos discretos ou contextuais, e diante do quadro pouco conclusivo a respeito dos efeitos comportamentais resultantes de intervenções, reversíveis ou irreversíveis, sobre essas diferentes estruturas, um dos objetivos do presente trabalho foi exatamente avaliar os efeitos de lesões **neurotóxicas e seletivas** do BL sobre o desempenho de ratos na tarefa de condicionamento clássico aversivo a um estímulo sonoro e a um contexto. Lesões neurotóxicas pela aplicação múltipla e tópica de diminutas quantidades de neurotoxina, ao contrário das eletrolíticas, restringem-se aos neurônios da estrutura em questão, e não danificam fibras de passagem provenientes de outras áreas. Desta forma, diferentemente dos trabalhos que investigaram a participação isolada dos diferentes núcleos do BLA sobre o condicionamento aversivo, os quais empregaram lesões eletrolíticas ou inativações por uso de lidocaína (que também age sobre fibras de passagem), o presente trabalho pretende restringir os danos aos corpos celulares dos neurônios do BL, em particular. Desta maneira, será possível avaliar a participação desse núcleo amigdalár nos processos subjacentes ao medo condicionado. E diante de todo esse contexto, hipotetizamos que a lesão neurotóxica e seletiva do BL levará ao prejuízo na aquisição do medo condicionado ao contexto, mas não ao som, ao tomarmos a resposta condicionada de congelamento como parâmetro de aprendizagem.

Contraste antecipatório de incentivo: seria a amígdala importante para a sua aquisição?

O contraste de incentivo refere-se à exaltação da diferença evidente entre recompensas, quando elas são experienciadas sob contigüidade temporal (Flaherty, 1982). Isto é, a exposição a duas ou mais recompensas, apresentadas sob certa proximidade temporal, leva o animal acentuar ou deprimir o comportamento que teria perante uma daquelas recompensas se a mesma fosse apresentada isolada, não pareada com outra(s) recompensa(s)

ou pareada com recompensa(s) de igual valor de incentivo. A acentuação ou a diminuição do comportamento perante uma das recompensas seria o reflexo da relativização, produzida pelo animal, entre os valores de incentivo de cada recompensa experienciada.

Por exemplo, numa situação que recebeu o nome de *contraste sucessivo negativo*, diferentes grupos de animais foram expostos por vários dias à solução de sacarina a uma concentração de 0,15%. Subseqüentemente, numa fase de teste, cada grupo recebeu solução de sacarina em uma das seguintes concentrações: 0,125%, 0,100%, 0,075% ou 0,05%. Grupos controles correspondentes receberam essas últimas concentrações tanto na fase de treino quanto na fase de teste. Os grupos experimentais exibiram diminuição do consumo da solução de sacarina na fase de teste, e tal diminuição, que caracteriza o fenômeno de contraste de incentivo sucessivo, variou em função da discrepância das concentrações no treino e no teste, tornando-se significativa nas duas maiores diferenças de concentração, ou seja, quando as concentrações no teste foram de 0,075% e de 0,05% (Flaherty e Rowan, 1986). Portanto, nessa situação, pareceu ter ocorrido relativização do valor de incentivo das recompensas, uma vez que as diferenças no comportamento consumatório apareceram em função da disparidade entre os valores das recompensas experienciadas.

Usando um delineamento experimental distinto, Flaherty e Checke (1982) mostraram que animais expostos diariamente à solução de sacarina 0,15% seguida de sacarose 32%, reduzem o consumo da solução de sacarina em comparação com animais controles, que receberam sacarina 0,15% seguida também de sacarina 0,15%; estes últimos exibem aumento no consumo de sacarina, ao longo dos dias de treino, em função da familiaridade com tal solução. Essa redução relativa do consumo da solução de sacarina, quando seguida de sacarose, consiste no efeito de *contraste antecipatório de incentivo*.

Assim, o fenômeno de contraste antecipatório de incentivo é evidenciado quando o animal experiencia diariamente uma recompensa de determinado valor de incentivo seguido por outra de valor de incentivo superior, com um pequeno intervalo de tempo entre suas apresentações. Acredita-se que o efeito de contraste antecipatório dependa da antecipação da pendência do estímulo preferido, sinalizada pela apresentação do primeiro estímulo.

Como a resposta de contraste antecipatório desenvolve-se lentamente, ao longo de várias sessões de treino, e como o intervalo de tempo entre a apresentação pareada da primeira e da segunda recompensas deve ser pequeno para o desenvolvimento do efeito de contraste, é de se supôr que processos associativos sirvam de substrato para este tipo de contraste (Flaherty e Rowan, 1986). Além disso, drogas ansiolíticas, que afetam o contraste sucessivo negativo, não interferem no efeito de contraste antecipatório (Flaherty, 1996), sugerindo que fatores como ansiedade e frustração não estão envolvidos na gênese desse fenômeno.

Tanto o contraste sucessivo quanto o contraste antecipatório parecem envolver memória e antecipação, porém, em diferentes instâncias. No teste de contraste sucessivo negativo, o animal experiencia um mesmo estímulo sob um padrão regular de apresentação. Ao tomar contato com um estímulo novo, compararia o conteúdo de sua memória com o estímulo presente, de menor valor de incentivo. Esta comparação poderia resultar num efeito de frustração, o que levaria a um menor consumo. O conceito de frustração, no entanto, implica em antecipação, isto é, o animal, tendo a expectativa da ocorrência do evento outrora experienciado, constataria a ocorrência de um evento “pior”, e então consumiria menos.

Na situação de contraste antecipatório, a geração de previsões com base em memória sobre regularidades passadas também é possível, porém, de maneira diferente. O evento regular a ser arquivado na memória refere-se à relação de contingência entre os estímulos, isto é, à apresentação do primeiro estímulo segue-se um outro, de maior valor de incentivo. Assim, a presença do primeiro estímulo, como no condicionamento Pavloviano, informa sobre a pendência do segundo estímulo. Tendo, este último, maior valor de incentivo, o animal evita o primeiro estímulo.

Portanto, embora os fenômenos de contraste sucessivo e de contraste antecipatório envolvam memória e, supostamente antecipação, este último processo parece inequívoco apenas na situação de contraste antecipatório. Isto é, o efeito de contraste sucessivo pode ser produzido pela comparação do estímulo novo com o conteúdo da memória do animal, que pode levar à expectativa da ocorrência do estímulo original. Por outro lado, o efeito de

contraste antecipatório é produzido, diretamente, pela antecipação, também com base em memória, da ocorrência do segundo estímulo quando da presença do primeiro.

O efeito de contraste antecipatório também é baseado na relativização dos valores de incentivo das diferentes recompensas, e conseqüentemente, na preferência relativa à segunda recompensa quando comparada à primeira. Flaherty e Rowan (1986) ofereceram, a diferentes grupos de animais, sacarina em diferentes concentrações como primeira solução e mantiveram constante a concentração da segunda solução, também de sacarina e sempre de concentração superior à primeira. Os autores constataram que o grau de supressão do consumo da primeira solução dependia do nível de disparidade entre as concentrações da primeira e segunda soluções. Ou seja, quanto maior a diferença de concentração entre a primeira e a segunda soluções, maior era a supressão do consumo da primeira solução.

Uma das interpretações mais aceitas sobre o fenômeno de contraste antecipatório de incentivo sugere que, o efeito de contraste, nesta situação, resulta da aprendizagem da antecipação da pendência do segundo estímulo, o qual é preferido em relação ao primeiro. Assim, os animais comparariam o estímulo corrente com a representação do estímulo preferido que irá ocorrer em seguida (Flaherty e Rowan, 1985). Entretanto, esse fenômeno comportamental poderia ser interpretado como um caso particular de contraste sucessivo. Isto é, como o contraste antecipatório depende do pareamento das duas recompensas ao longo de vários dias, é possível pensar que os animais comparariam a sacarina recebida a cada dia com a memória da sacarose recebida no dia anterior. No entanto, essa idéia foi logo refutada, através de um engenhoso experimento idealizado por Flaherty e Rowan (1985). Um mesmo conjunto de animais foi treinado sob duas condições de pareamento em dias alternados: sacarina-sacarina e sacarina-sacarose, sendo cada condição antecedida por um estímulo discriminativo. As previsões geradas pelas interpretações de contraste sucessivo e contraste antecipatório a este arranjo experimental **intra-sujeitos** eram distintas, o que permitia, portanto, avaliar qual interpretação melhor explica o fenômeno original. Se o efeito de contraste fosse baseado na lembrança de ter recebido sacarose no dia anterior, portanto, um fenômeno de contraste sucessivo negativo, o consumo de sacarina seria suprimido nos dias de

condição sacarina-sacarina, porque é nesta condição que o animal tem a possibilidade de provar a mudança de um dado estímulo (no caso, a sacarose recebida no dia anterior) para um outro de menor valor de incentivo (no caso, a sacarina oferecida no momento corrente). Por outro lado, se o efeito de contraste fosse resultado da efetiva antecipação diária da solução preferida, portanto um fenômeno de contraste antecipatório, o consumo de sacarina seria suprimido nos dias de condição sacarina-sacarose, pois é nesta condição que o animal experiencia dois estímulos diferentes pareados, e pode refrear o consumo da primeira solução devido à antecipação do futuro oferecimento da solução preferida; além disso, a resposta a esta condição exclui a possibilidade de contraste sucessivo pelo fato de a última solução apresentada no dia anterior também ter sido sacarina. De fato, os resultados experimentais foram inequívocos: o efeito de contraste nesta situação experimental decorre de antecipação e não da lembrança sobre a solução recebida 24 horas antes.

Essa comparação diária de um estímulo corrente com a representação de um outro, preferido, que ocorrerá logo em seguida, pode resultar em três processos diferentes: (1) *desvalorização* do primeiro estímulo, (2) produção de resposta à pendência do segundo estímulo, a qual *compete* com a resposta ao primeiro, ou (3) *inibição* da resposta ao primeiro estímulo.

A interpretação de desvalorização foi testada por Flaherty e colaboradores (1995) através de experimentos intra-sujeitos, onde as soluções de sacarina 0,15% que antecederiam a solução de sacarose 32% e a de sacarina 0,15% eram sinalizadas por pistas distintas. Após o desenvolvimento do efeito de contraste antecipatório, aplicou-se um teste de preferência, o qual consistia em apresentar duas soluções de sacarina sinalizadas por estas pistas. No entanto, não foi observada qualquer diminuição do consumo da sacarina sinalizada pela pista que indicava a pendência da sacarose, em comparação com a outra solução de sacarina. Ou seja, não foi constatado qualquer indício de desvalorização da sacarina que antecedia a solução preferida.

Por outro lado, quando as apresentações da primeira e da segunda soluções são dadas em locais diferentes, aproximações frequentes do local de ocorrência da solução preferida

poderiam ser as responsáveis pela diminuição do consumo da primeira solução. No entanto, Flaherty e Checke (1982) mostraram que o efeito de contraste antecipatório ocorre mesmo quando as duas soluções são apresentadas num mesmo local do aparelho, indicando que a competição de respostas não é o fator fundamental para o desenvolvimento do contraste antecipatório de incentivo.

A interpretação de inibição de resposta ao primeiro estímulo, mesmo sendo ele agradável para o animal, é a que parece ser a mais aceita. Manipulando diferentes concentrações de soluções de sacarina e de sacarose apresentadas como primeira solução, antecedendo uma solução de sacarose 32%, foi observado que, nos casos em que a primeira solução consistia de sacarina 0,15% ou de sacarose 2%, isto é, nas situações onde ocorriam os maiores efeitos de contraste, também ocorriam os maiores índices de consumo da segunda solução (ver Flaherty, 1996). Este resultado apóia a interpretação de inibição da resposta ao primeiro estímulo porque o aumento do consumo da segunda solução pode tratar-se de um “efeito rebote”, característico de um processo de inibição comportamental.

Outro aspecto teórico importante para o contraste antecipatório refere-se à possível implicação de uma *contingência instrumental* durante o desempenho da tarefa. No entanto, se uma aprendizagem instrumental permeasse esse fenômeno, esperar-se-ia encontrar um efeito reforçador da solução preferida sobre a primeira solução, e conseqüentemente, o consumo da primeira solução seria aumentado em relação à condição controle. E isso não é o que realmente ocorre. Ademais, se o modelo experimental de contraste antecipatório envolvesse aprendizagem instrumental, o aumento da disparidade entre os valores de incentivo das duas recompensas refletir-se-ia no aumento do efeito reforçador da segunda solução em relação à primeira, resultando num aumento do consumo da primeira solução. Todavia, também não é o que se verifica sob estas condições experimentais (Flaherty e Grigson, 1988).

Portanto, a aprendizagem associativa, a capacidade de discriminação e a relativização dos valores de incentivo são fundamentais para a produção do efeito de contraste antecipatório. Naturalmente, estes processos antecedem qualquer tipo de previsão, já que a antecipação requer reconstrução representacional do evento regular, a qual só pode ser

realizada com base nesses últimos mecanismos. Então, a geração de previsão com base em memória sobre as regularidades passadas ocorreria a cada sessão do teste, quando o animal experencia a primeira recompensa e/ou quando é exposto ao contexto experimental. Isto é, a presença desses estímulos evocaria a representação da segunda recompensa, que é preferida. A comparação do valor do estímulo corrente com o valor de incentivo do estímulo preferido produziria, então, uma resposta de inibição a este estímulo e/ou comportamentos que competiriam com a resposta favorável a ele. O resultado da antecipação da pendência do estímulo preferido, promoveria, então, a diminuição da resposta à primeira recompensa, o que consiste no efeito de contraste antecipatório (ver Flaherty, 1996 para revisão).

A tarefa de contraste antecipatório de incentivo, então, compartilha algumas características com o condicionamento Pavloviano, já que ambas as tarefas requerem o aprendizado e memória sobre a contigüidade e contingência entre um determinado estímulo e um segundo estímulo, de forma que o primeiro informa sobre a pendência do estímulo seguinte. No entanto, no caso do condicionamento Pavloviano, o primeiro estímulo (CS) inicialmente tem valor neutro, ao passo que o outro estímulo (US) apresenta relevância motivacional intrínseca, ou em outras palavras, significado emocional. Com o treino, sugere-se que o CS passa a acessar a representação (incluindo a do valor de incentivo) do US. No contraste antecipatório, por outro lado, ambos os estímulos possuem valor reforçador intrínseco e a associação temporal entre eles leva à supressão do consumo da primeira solução, uma vez que ela indica a pendência de um estímulo preferido, ou seja, com maior valor de incentivo.

Pode-se pensar, então, que durante o desempenho na tarefa de contraste antecipatório, determinados estímulos exerceriam a função de estímulos condicionados, através dos quais o animal seria capaz de evocar a representação emocional da recompensa que ocorrerá num futuro próximo. A representação emocional da segunda recompensa, evocada por um CS, seria então comparada com o valor corrente da primeira recompensa, levando à supressão do seu consumo, uma vez que o valor de incentivo do evento pendente é maior que o do estímulo

corrente. O contexto experimental ou mesmo a própria primeira recompensa *per se* poderiam exercer a função de CS.

Esta idéia recebe de alguns experimentos que usam uma situação de contraste antecipatório não-consumatório, onde os sujeitos tinham experiência com duas condições de treino envolvendo múltiplos esquemas de reforçamento, A-X e B-Y, sendo cada componente sinalizado por diferentes estímulos discriminativos. O mesmo esquema de reforçamento era empregado durante A e B, porém cada um deles era seguido por esquemas distintos: X ou Y, onde X compreendia um esquema de extinção, e Y, um esquema no qual ocorria uma taxa maior de reforçamento. Apesar de a taxa de respostas em A ser maior do que em B quando as duas condições eram apresentadas **isoladamente**, a taxa de respostas em B tornou-se maior do que em A quando os animais tiveram a oportunidade de **escolha** de trabalharem em A ou em B (ver Williams, 2002, para revisão). Uma interpretação plausível para esses resultados seria de que as pistas que indicavam a pendência do melhor esquema foram capazes de servir como reforçadores condicionados mais poderosos, levando a uma taxa de respostas maior no esquema correspondente.

Além do mais, numa situação de contraste antecipatório consumatório onde a primeira e a segunda soluções são apresentadas em locais diferentes do aparelho de teste, os animais exibem respostas de aproximação ao local de apresentação da segunda solução preferida durante o período de oferecimento da primeira solução (ver Flaherty, 1996). Essas respostas poderiam ser consideradas como condicionadas, eliciadas por um CS que informa sobre a pendência do evento preferido, já que ocorrem durante a fase de apresentação da primeira solução e, portanto, na ausência do segundo evento, e também porque ocorrem somente quando a solução pendente apresenta o maior valor de incentivo.

Assim, diante desse contexto, é possível hipotetizar que o contraste antecipatório pode envolver o aprendizado de associações do tipo estímulo-reforço. Isso facultaria a um estímulo, ou conjunto de estímulos, a capacidade de evocar a representação emocional da recompensa pendente, a qual por sua vez, seria então comparada com a representação da recompensa corrente, tornando assim possível, a supressão do comportamento consumatório da primeira

recompensa diante da eminência do evento preferido, ou seja, o efeito de contraste antecipatório de incentivo.

E é com base nesta idéia que o presente trabalho se propõe a avaliar se a aquisição do efeito de contraste antecipatório de incentivo depende do estabelecimento de associações do tipo estímulo-reforço. E mais ainda, investigar os efeitos de lesões **neurotóxicas e seletivas** do BL sobre esse fenômeno comportamental. Caso se confirme que o contraste antecipatório envolve esse tipo de aprendizagem, e sendo essa estrutura provável sítio de plasticidade neural subjacente à aquisição de associações estímulo-reforço, é de se esperar que dano nessa área levaria ao prejuízo de aquisição do efeito de contraste antecipatório.

Se o valor de incentivo da solução preferida fosse diminuído após o estabelecimento normal do efeito de contraste antecipatório, seria possível avaliar o envolvimento de associações do tipo estímulo-reforço no desempenho da tarefa de contraste. Ou seja, se o aprendizado desse tipo de associação for fundamental para o efeito de contraste antecipatório ocorrer, esperamos que ratos normais exibam uma redução do efeito de contraste após a desvalorização da solução preferida (por injeção de LiCl, i.p.), uma vez que esta solução passaria a exibir menor valor de incentivo. E mais ainda, poderemos avaliar se ratos com lesão seletiva do BL exibirão prejuízo específico quanto a esse tipo de aprendizagem. Se os ratos lesados forem incapazes de acessar o valor de incentivo corrente da solução antes preferida, deverão manter inalterado o efeito de contraste.

Ademais, diante das fortes evidências de que o BL participaria do aprendizado de associações estímulo-reforço em função da natureza sensorial do estímulo, ou seja, que o BL seria importante para o estabelecimento de associações entre estímulos contextuais (ou representações configuracionais) e o valor de incentivo de um segundo estímulo, mas não em se tratando de estímulos discretos (ou representações elementais), parece fundamental controlar a natureza sensorial dos estímulos que funcionariam como pistas no teste de contraste antecipatório intra-sujeitos envolvendo desvalorização da solução preferida. Ou seja, se de fato ratos com lesão do BL forem capazes de desempenhar a tarefa de contraste através da formação de associações entre pistas discretas e o valor de incentivo da segunda solução,

será essencial que controlemos essa variável. Portanto, dividiremos os grupos dos animais lesados no BL e controle-operados em sub-grupos de forma que metade dos sujeitos receberá um conjunto de pistas que permitirá uma estratégia de discriminação elemental das condições experimentais (sacarina-sacarina ou sacarina-sacarose), e a outra metade receberá um conjunto de pistas arranjadas de forma a requerir uma estratégia de discriminação configuracional das condições de treino. De acordo com a nossa interpretação, esperamos que, diferentemente dos controle-operados, ratos com lesão do BL mantenham inalterado o efeito de contraste após a desvalorização da sacarose somente quando a tarefa envolver a representação configuracional, mas não elemental, das pistas discriminativas.

A situação de contraste envolvendo a discriminação elemental das condições de treino será associada a um “arranjo elemental” das pistas, onde a presença de uma pista sonora ou uma pista visual (dependendo do grupo) sinalizará a condição A (e.g., sacarina-sacarina), enquanto que a ausência dessas pistas indicará a condição B (e.g., sacarina-sacarose). Já a situação de contraste envolvendo a discriminação configuracional das condições de treino será associada a um “arranjo configuracional” das pistas, onde a pista sonora e a pista visual, quando apresentadas sozinhas, sinalizarão a condição A, enquanto que quando apresentadas em conjunto, sinalizarão a outra condição. Essas condições experimentais serão, certamente, contrabalanceadas dentro de diferentes grupos.

Assim, parece razoável pensar que, ao se submeter os animais lesados no BL a essa situação comportamental, com o devido controle de todas essas variáveis, poder-se-á avaliar de uma forma mais assertiva, se de fato, (1) a tarefa de contraste antecipatório de incentivo envolve um mecanismo de aprendizagem de associação do tipo estímulo-reforço; (2) o funcionamento do BL é importante durante o desempenho na tarefa de contraste por esse núcleo participar da formação de associações estímulo-reforço quando o estímulo em questão envolve representação configuracional, mas não elemental.

A realização dos experimentos propostos permitirá avaliar se o BL participaria do processamento de representações configuracionais de estímulos, mas não elementais, no que se refere às associações do tipo estímulo-reforço, tanto em uma tarefa apetitiva quanto em

outra aversiva. E além disso, contribuirá para a avaliação da implicação dos diferentes núcleos do BLA em processamentos paralelos de representações de estímulos com diferentes dimensões sensoriais envolvendo o estabelecimento de associações estímulo-reforço.

2. Objetivos

O presente trabalho teve por objetivo avaliar o possível envolvimento diferencial do núcleo basal da amígdala sobre a aprendizagem de associações estímulo-reforço quando a representação do estímulo em questão é elemental (ou discreta) ou configuracional (ou contextual). Para tanto, o trabalho avaliou os efeitos de lesões neurotóxicas e seletivas do núcleo basal da amígdala sobre 1) a aquisição do medo condicionado ao som e ao contexto; 2) a aquisição da tarefa de contraste antecipatório de incentivo em uma versão inter-sujeitos; e 3) a aquisição da tarefa de contraste antecipatório de incentivo em uma versão intra-sujeitos envolvendo discriminação configuracional ou elemental das condições de treino. Ademais, diferentemente do condicionamento clássico aversivo, onde parece claro a aprendizagem de associações estímulo-reforço, não é certo que esse tipo de processo se faz necessário durante o desempenho na tarefa de contraste antecipatório de incentivo. Portanto, o trabalho também teve por objetivo avaliar se a aquisição do efeito de contraste antecipatório de incentivo, de fato, envolve associações estímulo-reforço.

3. Experimento 1

EXPERIMENTO 1.

Efeitos da lesão seletiva e excitotóxica do BL sobre o desempenho de ratos numa tarefa de condicionamento clássico aversivo ao som e ao contexto

Baseado em estudos hodológicos e neurofisiológicos, é possível hipotetizar que os núcleos BL e LA, constituintes do BLA, estariam envolvidos no processamento de distintas dimensões sensoriais de um estímulo ou conjunto de estímulos no estabelecimento de associações do tipo estímulo-reforço – o BL participaria do processamento de representações configuracionais (ou contextuais) de um estímulo, e o LA do processamento de representações elementais (ou discretas). Neste sentido, o objetivo deste experimento foi avaliar os efeitos da lesão seletiva e neurotóxica do BL sobre o desempenho de ratos nos testes de medo condicionado ao som e ao contexto. Diante da hipótese delineada acima, seria natural pensar que danos restritos ao BL resultariam em prejuízo de desempenho na tarefa de condicionamento clássico aversivo ao contexto, mas não ao som, exatamente pelo fato de a primeira envolver o aprendizado de associações entre a representação contextual de um conjunto de estímulos e o valor afetivo de um evento aversivo, e a última envolver este mesmo tipo de associações em se tratando de um estímulo discreto.

3.1. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1.1. Cirurgias-piloto para o estabelecimento das coordenadas estereotáxicas para a produção de lesões seletivas e excitotóxicas do BL

Sujeitos

Foram utilizados no total 44 ratos Wistar, machos, provenientes do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia (CEDEME/UNIFESP), com idade de aproximadamente três meses. Grupos de até três

animais foram mantidos em gaiolas de plástico, em ambiente sob temperatura em torno de 22°C, e ciclo luz/escuro de 12 horas (luz das 7h00min às 19h00min).

Procedimento Cirúrgico

Foram realizadas cirurgias-piloto objetivando estabelecer as coordenadas estereotáticas ideais para a produção de lesões seletivas do BL por injeção múltipla e tópica de ácido ibotênico (10 mg/ml em tampão fosfato-salina, com pH 7,4). As cirurgias-piloto diferiram entre si pelas coordenadas estereotáticas empregadas. Ao final de cada cirurgia-piloto seguia-se o processamento histológico (ver adiante) dos encéfalos dos animais utilizados e a avaliação histológica da localização e da dimensão das lesões produzidas.

A etapa inicial do procedimento cirúrgico para produção de lesão seletiva por injeção múltipla e tópica de ácido ibotênico consistia em fixar o animal no aparelho estereotático, depois de anestesiado com equitesina (0,3 ml/100 g de peso do animal). Logo em seguida, era efetuada uma incisão longitudinal da pele sobre o crânio. As bordas da pele eram rebatidas e o perióstio removido. Então, efetuava-se a abertura do crânio, com o auxílio de uma broca odontológica e um escareador, de tamanho suficiente para a passagem da micropipeta que permitia realizar a injeção da neurotoxina nos pontos almeçados.

A droga era injetada através de uma micropipeta de vidro estirado, com diâmetro externo de aproximadamente 160 µm, colada à agulha de uma microseringa Hamilton (5 µl). Procedimentos usuais de estereotaxia eram empregados. O ponto zero em relação às coordenadas médio-laterais era tomado a partir do ponto mediano do seio sagital; o ponto zero em relação às coordenadas antero-posteriores era tomado através de uma "correção" do bregma, ou seja, através do cruzamento do ponto zero médio-lateral com a linha reta que passa pelos pontos medianos de cada uma das suturas coronais; e finalmente o ponto zero dorso-ventral era tomado na dura-mater em cada ponto de injeção. As coordenadas estereotáticas empregadas para a aplicação da neurotoxina no BL diferiram entre cada teste piloto realizado. Após o posicionamento da micropipeta em cada sítio de injeção, era injetado um volume de ácido ibotênico que variou entre 0,02 e 0,03 µl, dependendo do teste.

Terminada cada injeção da neurotoxina, a micropipeta era mantida na mesma posição por 2 minutos para evitar refluxo do volume injetado, e a superfície cortical exposta era lavada com solução fisiológica para minimizar danos. Terminadas as injeções, as bordas da pele eram, então, suturadas.

As coordenadas estereotáxicas que produziram as melhores lesões foram as seguintes: **(1)** -2,0 AP; -4,6 ML; -7,6 DV; **(2)** -2,5 AP; -4,7 ML; -7,7 DV; **(3)** -2,9 AP; -4,7 ML; -7,8 DV; **(4)** -2,0 AP; +5,3 ML; -7,4 DV; **(5)** -2,5 AP; +5,4 ML; -7,5 DV; **(6)** -2,9 AP; +5,4 ML; -7,6 DV; com injeção de 0,03 µl de ácido ibotênico em cada ponto de injeção.

Processamento Histológico

No dia seguinte à realização de cada cirurgia-piloto realizava-se o processamento histológico dos encéfalos dos animais.

Os animais eram anestesiados profundamente com éter sulfúrico e seus encéfalos removidos das caixas cranianas. Os encéfalos eram, então, imediatamente congelados, e secções frontais eram tomadas no nível da amígdala, cada uma com 30 µm de espessura, a intervalos de 150 µm. Posteriormente, as secções eram coradas com violeta de cresila, para a evidenciação dos corpúsculos de Nissl, e conseqüentemente, para a avaliação da localização e da extensão das perdas celulares produzidas pelas injeções neurotóxicas.

3.1.2. Cirurgias para a produção de lesões seletivas e excitotóxicas do BL

Sujeitos

Foram utilizados 52 ratos machos Wistar procedentes do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia (CEDEME/UNIFESP), com idade de aproximadamente três meses. Grupos de até três animais foram mantidos em gaiolas de plástico, em ambiente sob temperatura em torno de 22°C, e ciclo luz/escuro de 12 horas (luz das 7h00min às 19h00min).

Procedimento Cirúrgico

O procedimento cirúrgico anteriormente descrito para as cirurgias-piloto foi o mesmo utilizado nesta etapa. Foram empregadas as coordenadas estereotáxicas que produziram as melhores lesões seletivas do BL nas cirurgias-piloto, descritas acima. Aplicou-se 0,03 µl de ácido ibotênico em cada ponto de injeção.

Os animais controles foram submetidos ao mesmo tratamento cirúrgico, porém receberam injeção de tampão fosfato-salina ao invés do ácido ibotênico.

No total, foram operados 52 animais, dentre os quais 30 pertenciam ao grupo dos lesados (BL) e os 22 restantes ao grupo dos controle-operados (SHAM). Dos 52 ratos operados, seis morreram antes da conclusão de todas as tarefas comportamentais. Os 46 ratos restantes passaram por todos os testes comportamentais e pertenciam a dois grupos distintos: 25 ao grupo BL, e 21 ao grupo SHAM.

3.1.3. Condicionamento Clássico Aversivo

Treino de Condicionamento Clássico Aversivo

O aparelho utilizado no treino de condicionamento clássico aversivo (Figura 2) consistiu de uma típica caixa de esQUIVA inibitória, a qual compreendeu dois compartimentos de acrílico de dimensões 30 x 28 x 40 cm, conectados por uma portinhola do tipo “guilhotina” de 10 x 10 cm distante 10 cm das paredes laterais. Um dos compartimentos tinha paredes brancas (compartimento A), enquanto o outro compartimento possuía duas paredes pretas (paredes laterais) e duas paredes brancas com figuras geométricas pretas (paredes anterior e posterior; compartimento B). O assoalho do aparelho consistia de barras de aço de 0,32 cm de diâmetro distando cerca de 1,5 cm entre si. As barras de aço do assoalho do compartimento B eram conectadas a um gerador de choque sem “scrambler”². Às paredes do compartimento B foram instaladas três caixas de som, as quais, quando acionadas por computador, liberavam

um som de 550 Hz e 80 dB. O treino de condicionamento aversivo foi conduzido somente no compartimento B da caixa, o qual era fechado por uma tampa, onde encontrava-se um orifício através do qual todo o procedimento era filmado por uma câmera de vídeo ligada a um vídeo cassete e a uma televisão, sendo possível, então, a gravação do treinamento de cada animal.

Para o treinamento dos animais na situação de condicionamento clássico aversivo, dividimos os animais submetidos aos diferentes tratamentos cirúrgicos em dois sub-grupos distintos: um grupo recebeu pareamento de som com choque (grupos CHQ), enquanto o outro grupo recebeu estimulação sonora na ausência de choque (grupos Ñ-CHQ). Como os animais também haviam sido divididos quanto ao tipo de cirurgia empregada (grupo BL e grupo SHAM), passaram a existir 4 grupos de animais: animais lesados que receberam choque (grupo BL/CHQ; N = 14), animais lesados que não receberam choque (grupo BL/Ñ-CHQ; N = 11), animais controle-operados que receberam choque (grupo SHAM/CHQ; N = 12) e animais controle-operados que não receberam choque (grupo SHAM/Ñ-CHQ; N = 9).

Cada animal foi submetido ao treino na tarefa de condicionamento clássico aversivo 10 dias após a realização do procedimento cirúrgico.

Cada sujeito do grupo CHQ era inicialmente retirado individualmente de sua gaiola no biotério, colocado em uma outra gaiola e transportado para a sala de experimentação. Em seguida, o rato era introduzido no compartimento B do aparelho. Passados dois minutos, o animal recebia o primeiro pareamento som-choque, tendo o som duração de cinco segundos, e o choque sendo liberado durante o último segundo da apresentação do som (som: 5 s, 550 Hz, 80 dB; choque: 1 s, 1 mA). Foram administrados cinco pareamentos de som e choque, com intervalos de 30 segundos entre eles. Após o último pareamento, aguardava-se 30 segundos para a retirada do animal do aparelho. Findo o treinamento, o animal era transportado de volta para a sua gaiola. O treino na situação de condicionamento clássico aversivo tinha, portanto, duração total de quatro minutos e meio. O mesmo procedimento foi empregado com os animais do grupo Ñ-CHQ, com a única diferença de que não recebiam choque em nenhum momento do treino.

² No sistema de geração de choques sem “scrambler” utilizado neste experimento, as barras de aço do assoalho



Figura 2. Fotografias do aparelho utilizado no treino da tarefa de condicionamento clássico aversivo e no teste de medo condicionado ao contexto.

Teste de Medo Condicionado ao Contexto

O teste de medo condicionado ao contexto foi executado no mesmo aparelho utilizado para o treino de condicionamento aversivo (Figura 2), descrito acima.

Todos os animais foram submetidos ao teste de condicionamento aversivo ao contexto 24 horas após o treino. O procedimento de teste consistia em, inicialmente, transportar o animal individualmente da sua gaiola para a sala de experimentação. Em seguida, o animal era introduzido no compartimento B do aparelho, onde permanecia por um período de quatro minutos; nenhum estímulo sonoro nem tampouco o choque eram apresentados ao animal. Findo esse período, o animal era retirado do aparelho experimental e transportado de volta à sua gaiola. A sessão do teste foi filmada e gravada em fitas de vídeo.

A duração das respostas de congelamento foi medida durante o teste de condicionamento aversivo ao contexto, e analisada em quatro blocos de um minuto.

Teste de Medo Condicionado ao Som

O teste de medo condicionado ao som foi realizado em uma sala experimental diferente da sala onde foram realizados o treino e o teste de condicionamento ao contexto. Ademais, o aparelho de teste (Figura 3) também foi diferente, consistindo de um cilindro de acrílico cinza, de 40 cm de altura e 37 cm de diâmetro. Diferentemente do aparelho de treino, o assoalho não possuía grades metálicas, mas era de acrílico preto. Três caixas de som foram conectadas à parede do aparelho, de modo que quando acionadas por computador, produziam um som idêntico (550 Hz, 80 dB, 5s) ao empregado durante o treino de condicionamento aversivo.



Figura 3. Fotografias do aparelho utilizado no teste de medo condicionado ao som.

Todos os animais foram submetidos ao teste de condicionamento aversivo ao som após 24 horas da realização do teste de condicionamento ao contexto, e portanto, 48 horas após o treino. Depois de ter sido transportado individualmente para a sala de experimentação, o animal era introduzido ao aparelho, onde, após três minutos, iniciava-se cinco apresentações

do som, cada qual por um período de cinco segundos, com intervalos de 30 segundos entre elas. O animal permanecia no aparelho até o término do oitavo minuto, quando então, era retirado e transportado de volta à gaiola. Em nenhum momento o choque era apresentado ao animal. A sessão do teste foi filmada e gravada em fitas de vídeo.

A duração das respostas de congelamento foi medida durante o teste de condicionamento aversivo ao som, e analisada posteriormente em oito blocos de um minuto cada.

3.1.4. Processamento Histológico

Ao término das tarefas comportamentais, os animais foram sacrificados e seus encéfalos processados histologicamente. Os animais foram anestesiados profundamente com equitesina, perfundidos com 200 ml de solução salina seguida por mais 200 ml de formalina-salina 10%, e seus encéfalos, então, removidos das caixas cranianas. Em seguida, os encéfalos receberam tratamento para a inclusão em parafina. Secções coronais de 10 μm de espessura foram tomadas a intervalos de 100 μm no nível da amígdala, e posteriormente foram coradas com Violeta de Cresila, para a evidenciação de corpúsculos de Nissl. Seguiu-se, então, a análise qualitativa da extensão e da seletividade das perdas celulares decorrentes das lesões neurotóxicas produzidas.

3.1.5. Análise Estatística

Os dados comportamentais referentes aos testes de medo condicionado ao som e ao contexto foram analisados estatisticamente através de uma Análise de Variância (ANOVA) para medidas repetidas pelo pacote STATISTICA. Os detalhes de cada análise serão descritos, a seguir, na seção dos Resultados.

3.2. RESULTADOS

3.2.1. Resultados Histológicos: Cirurgias-Piloto

A Figura 4 mostra fotomicrografias de lesões bilaterais e seletivas do BL, produzidas pela aplicação múltipla e tópica de ácido ibotênico nas coordenadas estereotáxicas descritas anteriormente. Para efeitos comparativos, a Figura 4 também mostra fotomicrografias de secções histológicas do encéfalo de um animal normal que não foi submetido a qualquer intervenção cirúrgica.

3.2.2. Resultados Histológicos

A Figura 5 ilustra esquematicamente as dimensões das lesões observadas nos ratos com maiores e menores danos, incluídos neste experimento. Dos 25 ratos submetidos à cirurgia para a produção da lesão do BL, cinco sujeitos não foram incluídos na análise dos dados comportamentais; um deles por exibir extensa lesão unilateral do LA, e quatro deles por apresentarem lesões muito pequenas do BL. Os 20 ratos lesados incluídos na análise apresentaram lesão da porção anterior do BL (segundo critérios adotados por Swanson, 1992). A grande maioria dos sujeitos teve lesada parte da porção posterior do BL, sendo unilateral em nove animais, e bilateral em 13 animais. Em alguns casos houve lesão de pequenas porções rostrais do LA (unilateralmente em dez sujeitos e bilateralmente em quatro sujeitos). Além disso, alguns animais apresentaram pequena lesão do núcleo endopiriforme e do córtex piriforme adjacentes, sendo unilateral em oito ratos e bilateral em mais oito ratos. Ademais, alguns sujeitos também exibiram lesão de pequenas porções do núcleo basal acessório posterior, sendo unilateral em cinco animais e bilateral em sete animais. Em nenhum caso houve lesão do núcleo central ou do núcleo basal acessório anterior.

Ademais, não foi observado qualquer dano nos encéfalos dos ratos do grupo SHAM, a não ser aqueles produzidos pela passagem da micropipeta no procedimento cirúrgico, que por sua vez se apresentaram muito pequenos.

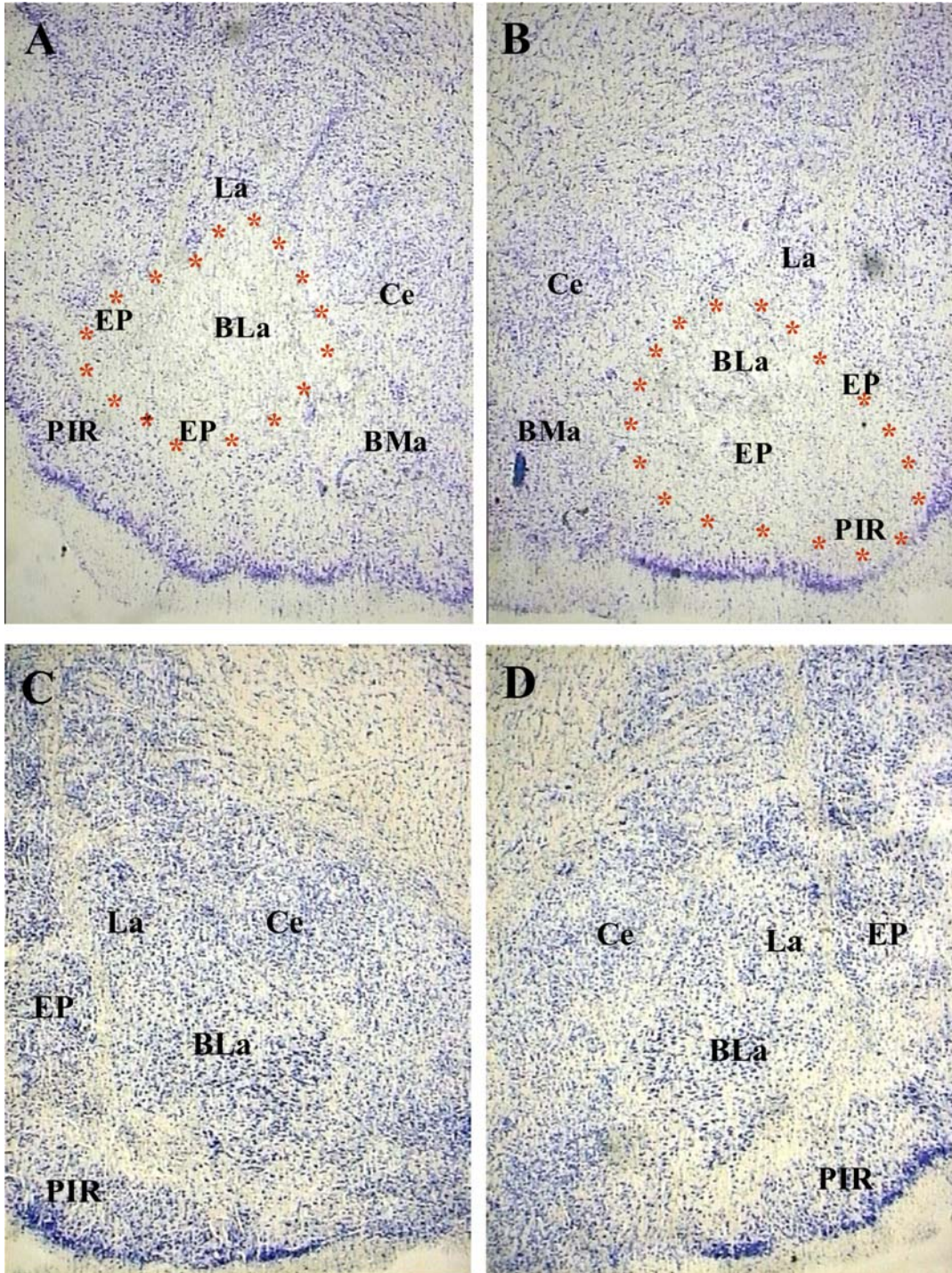


Figura 4. Fotomicrografias de secções coronais de encéfalo de um rato no nível da amígdala (aumento de 40x), coradas com violeta de cresila. (A) e (B) indicam hemisfério direito e esquerdo, respectivamente, de um animal que apresentou a melhor lesão do BL numa cirurgia-piloto; (C) e (D) indicam hemisfério direito e esquerdo, respectivamente, de um animal que não foi submetido a qualquer procedimento cirúrgico. A lesão (delimitada pelos asteriscos) foi bilateral e atingiu o BL bilateralmente e parte do córtex piriforme e do núcleo endopiriforme. *BLa*, núcleo basal anterior; *BMa*, núcleo basal acessório anterior; *Ce*, núcleo central; *EP*, núcleo endopiriforme; *La*, núcleo lateral da amígdala; *PIR*, córtex piriforme.



Figura 5. Representações de secções coronais no nível da amígdala ilustrando esquematicamente a abrangência das lesões mais extensas (preenchimento em cinza claro) e menos extensas (preenchimento em cinza escuro) dos animais incluídos na análise do Experimento 1. As legendas dos diferentes núcleos da amígdala e das áreas adjacentes são mostradas no Apêndice A (ver adiante).

3.2.3. Condicionamento Clássico Aversivo

O treino de condicionamento clássico aversivo, neste primeiro experimento, foi realizado na ausência de um “scrambler”, o que parece ter ocasionado alguma variabilidade nas reações dos animais aos choques administrados durante o treino. Isto é, observamos que alguns animais exibiam intensa reação à administração dos choques enquanto outros reagiam pouco e outros, ainda, exibiam reações intermediárias. Essas reações foram registradas como de sobressalto, tentativa de fuga e de congelamento. A análise dos dados comportamentais referentes aos testes de medo condicionado levou em consideração essa variabilidade de reações. Os animais do grupo CHQ foram sub-divididos em duas categorias: os que exibiram reações de baixa intensidade e os que apresentaram reações de média a alta intensidade à administração dos choques, de acordo com a intensidade das respostas aversivas mencionadas acima. Animais que apresentaram (1) pouco ou nenhum sobressalto diante dos choques, (2) pouco ou nenhum tempo em congelamento e (3) nenhuma resposta de tentativa de fuga, foram classificados como sujeitos com reações de baixa intensidade diante dos choques administrados. Animais que apresentaram respostas aversivas mais intensas, foram então reunidos dentro de um mesmo grupo, cujas reações diante dos choques administrados foram classificadas como de média-alta intensidade. De fato, as reações dos animais classificados em apresentar reações de baixa intensidade no treino de condicionamento foram bastante similares às reações de ratos que não foram expostos aos choques durante o treino (grupo Ñ-CHQ). É importante ressaltar que essa classificação quanto às reações dos animais frente aos choques administrados durante o treino foi feita antes de qualquer conhecimento a respeito do desempenho dos ratos nos testes comportamentais.

O número total de sujeitos incluídos na análise dos dados comportamentais referentes ao condicionamento clássico aversivo, após a avaliação histológica das lesões, foi o seguinte: nove sujeitos no grupo dos lesados que receberam choque durante o treino (BL / CHQ), sendo três animais classificados com reações de baixa intensidade (BL / BAIXA INTENSIDADE; N = 3) e seis animais com reações de média a alta intensidade (BL / MÉDIA-ALTA INTENSIDADE; N = 6); 11 sujeitos no grupo dos lesados que não foram expostos ao choque

(BL / Ñ-CHQ; N = 11); 12 sujeitos no grupo dos controle-operados que receberam choque durante o treino (SHAM / CHQ; N = 12), sendo sete animais classificados com reações de baixa intensidade (SHAM / BAIXA INTENSIDADE; N = 7) e cinco animais com reações de média a alta intensidade (SHAM / MÉDIA-ALTA INTENSIDADE; N = 5); e finalmente, nove sujeitos no grupo dos controle-operados que não receberam choque (SHAM / Ñ-CHQ; N = 9).

Teste de Medo Condicionado ao Contexto

Foi aplicado o teste ANOVA de três vias para medidas repetidas na análise dos dados. A análise incluiu, como variáveis independentes, dois fatores inter-sujeitos – 1) o tipo de lesão (SHAM ou BL), e 2) o tipo de treino (BAIXA INTENSIDADE, MÉDIA-ALTA INTENSIDADE ou Ñ-CHQ) – e um fator intra-sujeitos, que consistiu nos blocos de tempo nos quais o teste foi dividido (quatro blocos de um minuto cada). A porcentagem de tempo em congelamento exibido pelos animais durante o teste foi tomada como a variável dependente. Os resultados são mostrados nas Figuras 6 e 7.

O teste ANOVA revelou a existência de efeito significativo em relação ao tipo de Treino (Efeito de Treino: $F_{2,35} = 68,41 - p < 0,0001$); isto é, ratos dos grupos Ñ-CHQ, BAIXA-INTENSIDADE E MÉDIA-ALTA INTENSIDADE exibiram diferenças significantes entre si no tempo em congelamento durante o teste de medo condicionado ao contexto. A análise *post hoc* de Newman-Keuls revelou que o tempo em congelamento exibido por sujeitos do grupo BAIXA-INTENSIDADE não diferiu daquele apresentado por sujeitos do grupo Ñ-CHQ ($p = 0,72$), e ainda, que o desempenho de ratos do grupo MÉDIA-ALTA INTENSIDADE diferiu significativamente dos desempenhos dos ratos pertencentes aos outros dois grupos ($p < 0,0001$), como pode ser visualizado na Figura 6. Além disso, a ANOVA revelou ausência de efeito significativo da Lesão (Efeito de Lesão: $F_{1,35} = 2,29 - p = 0,14$) e da interação Lesão x Treino ($F_{2,35} = 1,15 - p = 0,32$). E mais especificamente, o teste *post hoc* de Newman-Keuls (Lesão x Treino) indicou que ratos do grupo BL ou do grupo SHAM classificados em exibir reações de BAIXA-INTENSIDADE não apresentaram, no teste ao contexto, diferenças

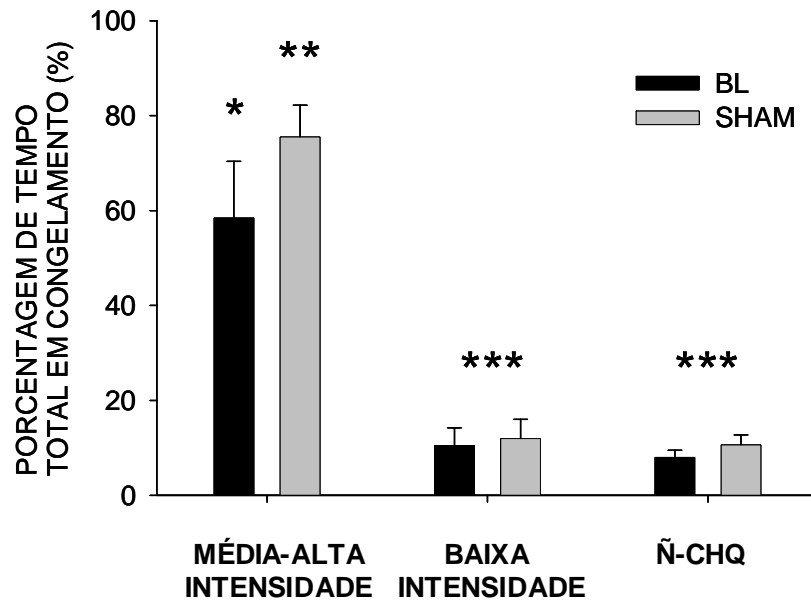


Figura 6. Porcentagem do tempo total em congelamento (média \pm erro padrão) durante o teste de medo condicionado ao contexto. **MÉDIA-ALTA INTENSIDADE**, ratos que foram expostos ao choque durante o treino de condicionamento, e que foram classificados em exibir reações de média a alta intensidade frente aos choques; **BAIXA INTENSIDADE**, ratos que foram expostos ao choque durante o treino de condicionamento, e que foram classificados em exibir reações de baixa intensidade frente aos choques; **Ñ-CHQ**, ratos que não receberam o estímulo aversivo durante o treino; **BL**, sujeitos lesados seletivamente no BL; **SHAM**, sujeitos controle-operados.

significantes quanto ao tempo em congelamento em relação aos animais BL ou SHAM do grupo Ñ-CHQ (BL: $p=0,76$; SHAM: $p=0,86$), como pode ser observado na Figura 6. E ainda, o teste *post-hoc* mostrou que tanto sujeitos do grupo BL quanto os do grupo SHAM classificados em exibir reações de MÉDIA-ALTA INTENSIDADE apresentaram tempo em congelamento significativamente maior que os BL ou SHAM sub-divididos nos outros dois grupos ($p<0,0001$ – Figura 6). Ademais, o teste *post hoc* mostrou que ratos dos grupos BL / Ñ-CHQ ou BL / BAIXA INTENSIDADE não exibiram, no teste de medo condicionado ao contexto, diferenças significativas no tempo em congelamento em comparação com os SHAM

/ Ñ-CHQ ou os SHAM / BAIXA INTENSIDADE (CON: $p=0,94$; CHQ – BAIXA: $p=0,98$; Figura 6). E ainda, que animais do grupo BL / MÉDIA-ALTA INTENSIDADE apresentaram, no teste de medo condicionado ao contexto, tempo em congelamento significativamente menor que os SHAM / MÉDIA-ALTA INTENSIDADE ($p<0,05$), como pode ser visualizado na Figura 6.

Adicionalmente, o teste ANOVA revelou ausência de efeito significativo em relação ao fator Bloco ($F_{3,105} = 1,06 - p=0,32$), à interação Lesão x Bloco ($F_{3,105} = 0,46 - p=0,70$) e à interação Treino x Bloco ($F_{6,105} = 0,64 - p=0,69$), como mostra a Figura 7. Mais especificamente, o teste *post hoc* de Newman-Keuls (Lesão x Treino x Bloco) mostrou que o tempo em congelamento exibido tanto por ratos do grupo BL quanto do grupo SHAM classificados em apresentar reações de BAIXA INTENSIDADE não diferiu significativamente daquele exibido pelos animais BL ou SHAM incluídos no grupo Ñ-CHQ, ao longo de todos os quatro blocos do teste ($p>0,05$), como pode ser visualizado na Figura 7. Além disso, o tempo em congelamento exibido por ratos dos grupos BL / Ñ-CHQ ou BL / BAIXA INTENSIDADE não diferiu significativamente daquele apresentado pelos animais dos grupos SHAM / Ñ-CHQ ou SHAM / BAIXA INTENSIDADE, ao longo de todos os quatro blocos do teste ($p>0,05$ – Figura 7). Ademais, o teste de Newman-Keuls também mostrou que ratos do grupo BL / MÉDIA-ALTA INTENSIDADE exibiram tempo em congelamento significativamente menor que os do grupo SHAM / MÉDIA-ALTA INTENSIDADE somente no terceiro bloco do teste ($p<0,001$ – Figura 7). E finalmente, o teste *post hoc* indicou que o tempo em congelamento exibido tanto por animais do grupo BL quanto do grupo SHAM classificados em exibir reações de MÉDIA-ALTA INTENSIDADE foi significativamente maior que o de animais dos grupos BL ou SHAM incluídos no grupo Ñ-CHQ ou BAIXA-INTENSIDADE, ao longo de todos os quatro blocos do teste de medo condicionado ao contexto ($p<0,0001$), como pode ser observado na Figura 7.

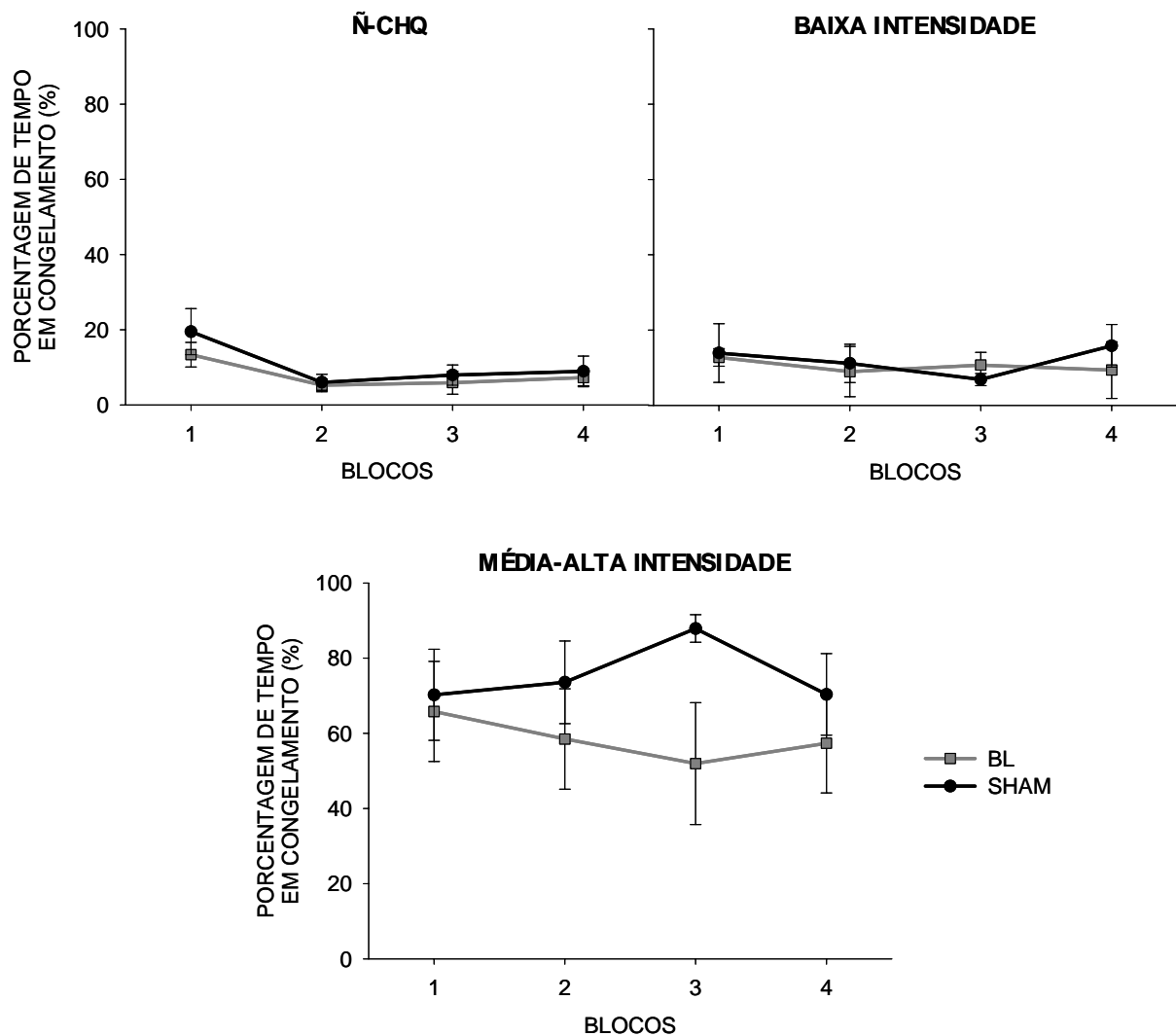


Figura 7. Porcentagem de tempo em congelamento (média \pm erro padrão) ao longo dos quatro blocos de tempo (de 1 min cada) no teste de medo condicionado ao contexto. **MÉDIA-ALTA INTENSIDADE**, ratos que foram expostos ao choque durante o treino de condicionamento, e que foram classificados em exibir reações de média a alta intensidade frente aos choques; **BAIXA INTENSIDADE**, ratos que foram expostos ao choque durante o treino de condicionamento, e que foram classificados em exibir reações de baixa intensidade frente aos choques; **N-CHQ**, ratos que não receberam o estímulo aversivo durante o treino; **BL**, sujeitos lesados seletivamente no BL; **SHAM**, sujeitos controle-operados.

Teste de Medo Condicionado ao Som

O teste ANOVA de três vias para medidas repetidas e as variáveis utilizadas para a análise do teste de medo condicionado ao contexto também foram empregados para a análise dos dados deste teste comportamental. Os resultados são mostrados nas Figuras 8 e 9.

O teste ANOVA revelou a existência de diferenças significativas em relação ao fator Treino ($F_{2,35} = 37,94 - p < 0,0001$), indicando que ratos dos grupos Ñ-CHQ, BAIXA INTENSIDADE E MÉDIA-ALTA INTENSIDADE apresentaram diferenças entre si quanto ao tempo em congelamento no teste de medo condicionado ao som (Figura 8). A análise *post hoc* de Newman-Keuls (Treino) revelou que o tempo em congelamento exibido por sujeitos do grupo BAIXA INTENSIDADE não diferiu daquele apresentado por sujeitos do grupo Ñ-CHQ ($p = 0,52$), e ainda, que o desempenho dos ratos do grupo MÉDIA-ALTA INTENSIDADE diferiu dos desempenhos dos ratos pertencentes aos outros dois grupos ($p < 0,0001$), como pode ser observado na Figura 8. Além disso, a ANOVA revelou ausência de efeito significativo em relação ao fator Lesão ($F_{1,35} = 0,48 - p = 0,49$) e em relação à interação Lesão x Treino ($F_{2,35} = 0,26 - p = 0,77$). O teste *post hoc* de Newman-Keuls (Lesão x Treino) revelou que tanto ratos do grupo BL quanto do grupo SHAM classificados em exibir reações de BAIXA INTENSIDADE não exibiram, no teste ao som, diferenças significativas no tempo em congelamento em relação aos animais BL ou SHAM incluídos no grupo Ñ-CHQ (BL: $p = 0,99$; SHAM: $p = 0,80$), como pode ser visualizado na Figura 8. E ainda, que sujeitos dos grupos BL ou SHAM classificados em exibir reações de MÉDIA-ALTA INTENSIDADE apresentaram tempo em congelamento significativamente maior que animais BL ou SHAM incluídos nos outros dois grupos ($p < 0,001 -$ Figura 8). Ademais, o teste *post hoc* também mostrou que ratos do grupo BL / Ñ-CHQ ou BL / BAIXA INTENSIDADE não exibiram, no teste de medo condicionado ao som, diferenças significativas no tempo em congelamento em relação aos SHAM / Ñ-CHQ ou SHAM / BAIXA INTENSIDADE (Ñ-CHQ: $p = 0,99$; CHQ – BAIXA INTENSIDADE: $p = 0,71 -$ Figura 8). E ainda, que animais do grupo BL / MÉDIA-ALTA INTENSIDADE não apresentaram, no teste de medo condicionado ao som, diferenças significativas no tempo em congelamento em relação aos SHAM / MÉDIA-ALTA INTENSIDADE ($p = 0,60$), como pode ser observado na Figura 8.

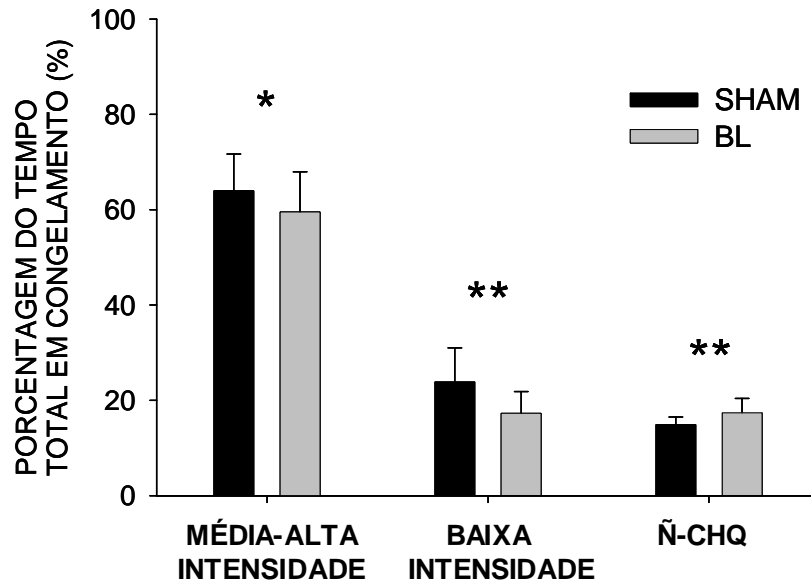


Figura 8. Porcentagem do tempo total em congelamento (média \pm erro padrão) durante todo o teste de medo condicionado ao som. **MÉDIA-ALTA INTENSIDADE**, ratos que foram expostos ao choque durante o treino de condicionamento, e que foram classificados em exibir reações de média a alta intensidade frente aos choques; **BAIXA INTENSIDADE**, ratos que foram expostos ao choque durante o treino de condicionamento, e que foram classificados em exibir reações de baixa intensidade frente aos choques; **Ñ-CHQ**, ratos que não receberam o estímulo aversivo durante o treino; **BL**, sujeitos lesados seletivamente no BL; **SHAM**, sujeitos controle-operados.

Adicionalmente, o teste ANOVA revelou efeito significativo em relação ao fator Bloco ($F_{7,245} = 31,31 - p < 0,0001$) e à interação Treino x Bloco ($F_{14,245} = 7,24 - p < 0,0001$), mas ausência de efeito significativo na interação Lesão x Bloco ($F_{7,245} = 0,35 - p = 0,93$), como mostra a Figura 9. Mais especificamente, o teste *post hoc* de Newman-Keuls mostrou que o tempo em congelamento exibido tanto por ratos do grupo BL quanto do grupo SHAM classificados em apresentar reações de BAIXA INTENSIDADE não diferiu significativamente dos animais BL ou SHAM incluídos no grupo Ñ-CHQ, ao longo de todos os oito blocos do teste ($p > 0,05$ – Figura 9). Além disso, o tempo em congelamento exibido por sujeitos dos grupos BL / Ñ-CHQ ou BL / BAIXA INTENSIDADE não diferiu significativamente daquele

exibido por ratos dos grupos SHAM / \tilde{N} -CHQ ou SHAM / BAIXA INTENSIDADE, ao longo de todos os oito blocos do teste ($p>0,05$ – Figura 9). Ademais, o teste de Newman-Keuls também mostrou que ratos do grupo BL / MÉDIA-ALTA INTENSIDADE exibiram tempo em congelamento que não diferiu significativamente daquele apresentado por ratos do grupo SHAM / MÉDIA-ALTA INTENSIDADE, em todos os blocos do teste ($p>0,05$ – Figura 9). E finalmente, o teste *post hoc* indicou que o tempo em congelamento exibido por animais dos grupos BL ou SHAM classificados em exibir reações de MÉDIA-ALTA INTENSIDADE aos choques não diferiu significativamente daquele apresentado por ratos BL ou SHAM incluídos nos outros dois grupos ao longo dos três primeiros blocos do teste ao som (bloco inicial, na ausência dos estímulos sonoros – $p>0,05$), mas foi significativamente maior ao longo dos outros cinco blocos do teste de medo condicionado ao som ($p<0,05$), como pode ser observado na Figura 9.

Em síntese, os resultados deste experimento indicam que ratos lesados no BL apresentaram prejuízo de desempenho quanto ao tempo em congelamento no teste de medo condicionado ao contexto, mas não ao som. Uma discussão mais detalhada desses resultados será apresentada adiante, na seção da Discussão.

Face à diversidade de intensidades das reações aversivas dos animais aos choques administrados durante o treino de condicionamento aversivo observado no presente experimento, um novo lote de animais (lesados no BL e controle-operados) foi submetido à mesma tarefa comportamental, agora utilizando fontes de choques equipadas com “scrambler”, com a finalidade de eliminar essa variabilidade, como será descrito a seguir na seção do Experimento 2.

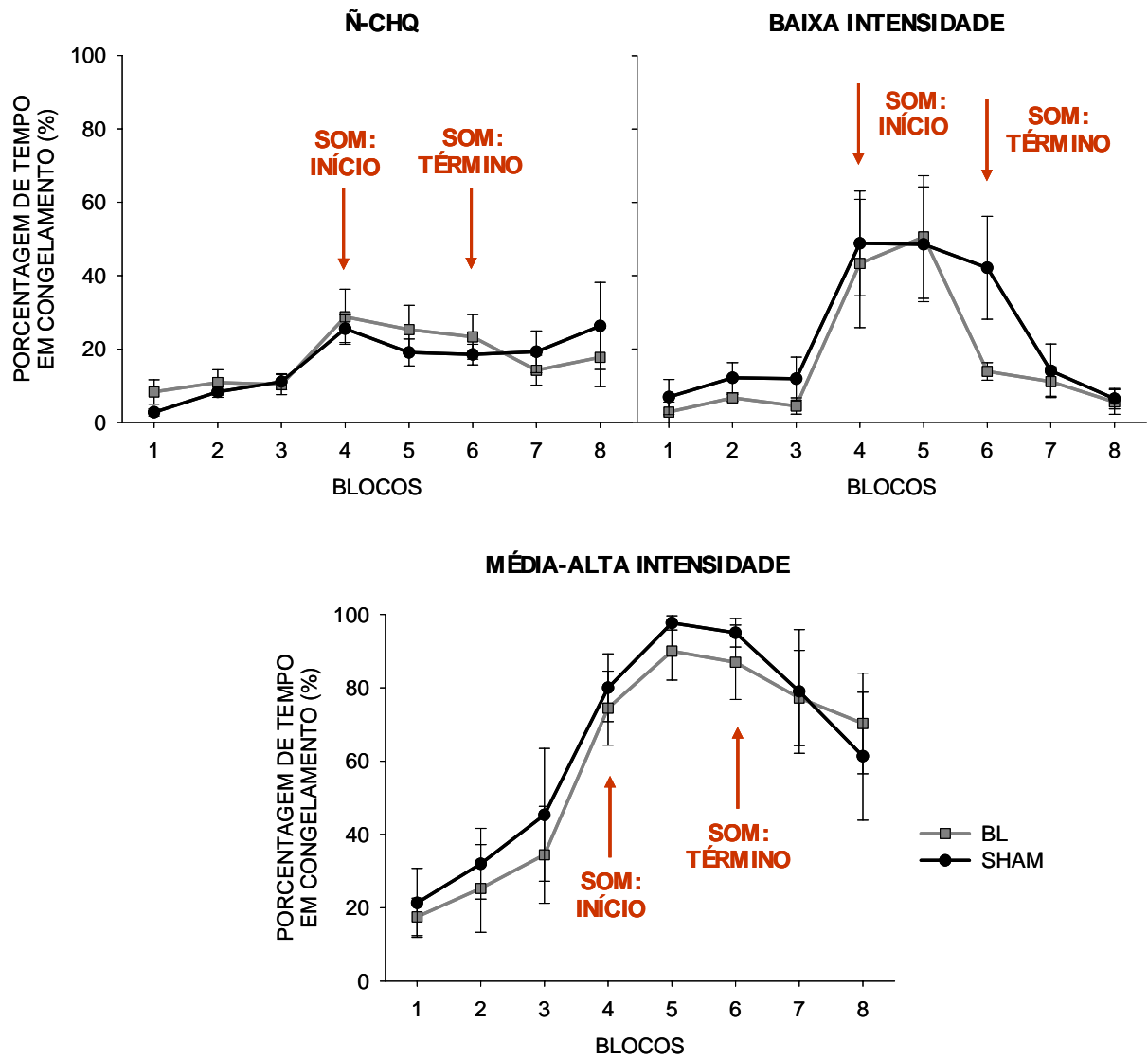


Figura 9. Porcentagem de tempo em congelamento (média \pm erro padrão) ao longo dos oito blocos de tempo (de 1 min cada) no teste de medo condicionado ao som. **MÉDIA-ALTA INTENSIDADE**, ratos que foram expostos ao choque durante o treino de condicionamento, e que foram classificados em exibir reações de média a alta intensidade frente aos choques; **BAIXA INTENSIDADE**, ratos que foram expostos ao choque durante o treino de condicionamento, e que foram classificados em exibir reações de baixa intensidade frente aos choques; **Ñ-CHQ**, ratos que não receberam o estímulo aversivo durante o treino; **BL**, sujeitos lesados seletivamente no BL; **SHAM**, sujeitos controle-operados.

4. Experimento 2

EXPERIMENTO 2.

Efeitos da lesão seletiva e neurotóxica do BL sobre (1) o desempenho de ratos numa tarefa de condicionamento clássico aversivo ao som e ao contexto e (2) sobre o desempenho de ratos numa versão intra-sujeitos da tarefa de contraste antecipatório de incentivo

Diante da variabilidade das reações dos animais aos choques nas patas aplicados durante o treino de condicionamento clássico aversivo observada no Experimento 1, realizamos um novo experimento objetivando avaliar os efeitos de lesões seletivas do BL sobre a aquisição do medo condicionado ao som e ao contexto. A fim de evitar o que parece ter sido uma variabilidade na produção dos choques, pelo que se depreende do experimento anterior, introduzimos uma nova fonte de choques equipada com um “scrambler” no aparelho de treino do condicionamento clássico aversivo (ver adiante).

Além de objetivar a avaliação dos efeitos da lesão seletiva do BL sobre o desempenho de ratos nos testes de medo condicionado ao som e ao contexto, este experimento também objetivou avaliar os efeitos da mesma lesão sobre o desempenho numa versão intra-sujeitos da tarefa de contraste antecipatório de incentivo envolvendo uma discriminação elemental das condições de treino (sacarina-sacarina e sacarina-sacarose).

É possível que a tarefa de contraste antecipatório de incentivo envolva o aprendizado de associações do tipo estímulo-reforço, no sentido de que estímulos ambientais poderiam acessar o valor de incentivo da solução pendente, o qual seria então comparado com o valor corrente da primeira solução. Como resultado dessa comparação ocorreria a supressão do consumo da primeira solução, que consiste no efeito de contraste antecipatório de incentivo. Ademais, diante da hipótese de que o BL participaria do processamento de representações configuracionais (ou contextuais), mas não de representações elementais (ou discretas) de um estímulo na formação de associações do tipo estímulo-reforço, é de se supôr que danos restritos ao BL resultariam em prejuízo de desempenho numa versão intra-sujeitos da tarefa

de contraste antecipatório envolvendo discriminação configuracional, mas não elemental, das condições de treino.

4.1. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1.1. Cirurgias-piloto para o estabelecimento das coordenadas estereotáxicas para a produção de lesões seletivas e excitotóxicas do BL

Sujeitos

Foram utilizados no total 8 ratos machos Wistar provenientes do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina – USP, com aproximadamente três meses de idade. Grupos de até três animais foram mantidos em gaiolas de plástico, em ambiente sob temperatura em torno de 22°C, e ciclo luz/escuro de 12 horas (luz das 7h00min às 19h00min).

Procedimento Cirúrgico

Os procedimentos básicos foram os mesmos já descritos anteriormente (ver Materiais e Métodos, Experimento 1).

Foi utilizado ácido ibotênico para a produção das lesões excitotóxicas, conforme descrito no Experimento 1.

As coordenadas estereotáxicas que produziram as melhores lesões do BL, neste lote de animais, foram as seguintes: **(1)** -2,7 AP; -5,1 ML; -7,6 DV, **(2)** -3,2 AP; -5,2 ML; -7,7 DV, **(3)** -3,6 AP; -5,2 ML; -7,8 DV, **(4)** -2,8 AP; +5,0 ML; -7,6 DV, **(5)** -3,3 AP; +5,1 ML; -7,7 DV, **(6)** -3,7 AP; +5,1 ML; -7,8 DV; com aplicação de 0,02 µl de ácido ibotênico (10 mg/ml) em cada ponto de injeção.

Processamento Histológico

Os procedimentos foram os mesmos daqueles utilizados no Experimento 1.

4.1.2. Cirurgias para a produção de lesões seletivas e excitotóxicas do BL

Sujeitos

Foram utilizados 60 ratos Wistar machos provenientes do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da USP, com aproximadamente três meses de idade. Grupos de até 3 animais foram mantidos em gaiolas de plástico, em ambiente sob temperatura em torno de 22°C, e ciclo luz/escuro de 12 horas (luzes acesas das 7h00min às 19h00min).

Procedimento Cirúrgico

Utilizou-se o mesmo procedimento cirúrgico básico descrito no Experimento 1.

As coordenadas estereotáxicas empregadas foram aquelas que apresentaram as melhores lesões seletivas do BL nas cirurgias-piloto, descritas acima. Aplicou-se 0,02µl de ácido ibotênico em cada ponto de injeção. Terminado o procedimento cirúrgico, os animais receberam injeção intra-muscular de ketoprofeno (anti-inflamatório; Ketofen[®]; 2mg/kg de massa corpórea; 12-12h por 48h).

Os animais controle-operados foram submetidos ao mesmo tratamento cirúrgico, porém receberam injeção de tampão fosfato-salina ao invés da neurotoxina.

Dos 60 ratos operados, 17 sujeitos morreram antes da conclusão de todas as tarefas comportamentais. Os 43 ratos restantes pertenceram a dois grupos distintos: 18 ao grupo dos lesados (BL), e 25 ao grupo dos controle-operados (SHAM).

4.1.3. Condicionamento Clássico Aversivo

Treino de Condicionamento Clássico Aversivo

O aparelho utilizado neste experimento foi o mesmo empregado durante o Experimento 1, com a exceção da introdução de uma nova fonte de choques equipada com um “scrambler”.

O procedimento comportamental também foi o mesmo já descrito para o Experimento 1, com a exceção de que os choques empregados foram de **0,50 mA**, ao invés de 1 mA como no experimento anterior (ver Materiais e Métodos, Experimento 1).

Os animais foram divididos em dois grupos distintos: um grupo recebeu pareamento de som com choque (grupo CHQ) enquanto o outro grupo recebeu estimulação sonora na ausência de choque (grupo Ñ-CHQ). Como os animais também haviam sido divididos quanto ao tipo de cirurgia empregada (BL e SHAM), passaram a existir 4 grupos de animais: animais lesados que receberam choque (grupo BL/CHQ; N = 10), animais lesados que não receberam choque (grupo BL/Ñ-CHQ; N = 8), animais controle-operados que receberam choque (grupo SHAM/CHQ; N = 13) e animais controle-operados que não receberam choque (grupo SHAM/Ñ-CHQ; N = 12).

Teste de Medo Condicionado ao Contexto

O teste de medo condicionado ao contexto foi executado no mesmo aparelho utilizado para o treino do condicionamento aversivo (ver Materiais e Métodos, Experimento 1).

Os sujeitos foram submetidos ao teste de medo condicionado ao contexto 24 horas após o treino de condicionamento clássico aversivo. O procedimento de teste consistia em inicialmente transportar o animal individualmente da sua gaiola para a sala de experimentação. Em seguida, o animal era introduzido no compartimento B do aparelho, onde permanecia por um período de 10 minutos; nenhum estímulo sonoro nem tampouco o choque eram apresentados ao animal. Todo o procedimento era filmado e gravado por uma câmera de

vídeo. Findo esse período, o animal era retirado do aparelho experimental e transportado de volta à sua gaiola.

A duração das respostas em congelamento foi medida durante o teste de medo condicionado ao contexto, e analisada em dez blocos de um minuto cada.

Teste de Medo Condicionado ao Som

O aparelho de teste de medo condicionado ao som foi o mesmo utilizado durante o Experimento 1 (ver Materiais e Métodos, Experimento 1).

O teste de medo condicionado ao som foi realizado uma hora após o término do teste de medo condicionado ao contexto. Depois do transporte individual do animal para a sala de experimentação, o mesmo era introduzido no aparelho de teste. Após dois minutos iniciais sem apresentação de som, iniciava-se 20 apresentações do som (idêntico ao empregado durante o treino), cada qual com 5 segundos de duração a intervalos de 30 segundos. Depois da última apresentação do estímulo sonoro, o animal permanecia no aparelho por mais 30 segundos, quando então, era retirado e transportado de volta à gaiola. Em nenhum momento o choque era apresentado ao animal. Todo o procedimento de teste era filmado e gravado em fitas de vídeo.

A duração das respostas de congelamento foi medida durante o teste, e analisada posteriormente em doze blocos de tempo de um minuto cada.

4.1.4. Tarefa de Contraste Antecipatório de Incentivo Intra-Sujeitos

Seis dias depois do término dos testes de medo condicionado, os animais foram submetidos ao treinamento na tarefa de contraste antecipatório de incentivo, numa versão intra-sujeitos, como descrito a seguir.

Privação Alimentar

A privação alimentar teve duração de 21 horas diárias, iniciou-se três dias antes do início do treino dos animais na tarefa de contraste antecipatório de incentivo e perdurou até o final do treinamento. Os animais tinham livre acesso ao alimento, por um período de três horas, 30 minutos depois do término de cada sessão de treino.

Aparelho e Procedimento

O aparelho utilizado na tarefa de contraste antecipatório de incentivo (Figura 10) consistiu de uma caixa de acrílico branco de 27 x 34 x 30 cm, que continha dois orifícios na parede frontal, 7cm acima do assoalho e distantes 15cm um do outro. Em cada um desses orifícios era introduzido, em momentos diferentes, um bebedouro de aço inoxidável preso a um tubo de ensaio que continha solução de sacarina 0,15% ou de sacarose 32%. O assoalho do aparelho era formado por barras de aço inoxidável paralelas, conectadas a um fio terra. Ao lamber no bebedouro, o rato estabelecia contato elétrico entre o bebedouro e o assoalho (a corrente que passa pelo animal é da ordem de 4 μ A, portanto, indetectável pelo animal), permitindo registrar a ocorrência de uma lambida. Cada bebedouro conectava-se por uma interface a um microcomputador, o qual registrava o número de lambidas em cada bebedouro. Tínhamos disponíveis, no total, seis aparelhos, sendo possível o treino de seis ratos simultaneamente.

O procedimento básico de cada sessão na tarefa de contraste antecipatório de incentivo utilizado no presente experimento consistiu em introduzir um primeiro bico de bebedouro em um dos orifícios da parede frontal do aparelho, que permitia ao animal consumir uma solução de sacarina 0,15%. O bico de bebedouro ficava disponível ao animal durante 3 minutos, contados a partir da primeira lambida no bebedouro. Ao término desse período, o bico do bebedouro era retirado do orifício e iniciava-se um intervalo de 15 segundos. Após esse intervalo, novamente introduzia-se um segundo bico de bebedouro (contendo sacarina 0,15% ou sacarose 32%, dependendo do dia de treino), agora no outro orifício da parede da caixa, por 5 minutos contados também a partir da primeira lambida do animal. Após esse período, o

bico do bebedouro era retirado do orifício e os animais eram, então, colocados de volta nas suas gaiolas. Um mesmo sujeito era exposto a duas condições experimentais distintas, em dias diferentes: sacarina 0,15% seguida por sacarina 0,15% (condição 15/15) num dia ou sacarina 0,15% seguida por sacarose 32% (condição 15/32) em outro dia. Cada condição experimental era apresentada num dia diferente, alternando-se as condições a cada dia, sendo o primeiro dia de treino na condição 15/15. Os animais receberam um total de 12 sessões de treino em cada uma das condições experimentais, e portanto foram submetidos a um total de 24 sessões, uma por dia. As condições 15/15 e 15/32 eram sinalizadas por pistas discriminativas visuais no interior do aparelho de treino, as quais consistiam de duas paredes de acrílico pretas ou, alternativamente, de duas paredes de acrílico brancas com figuras geométricas pretas. Para a metade dos sujeitos, a condição 15/15 era sinalizada pelas paredes pretas e a condição 15/32 era sinalizada pelas paredes brancas; o inverso ocorria para a outra metade dos animais. A Figura 11 mostra as pistas visuais utilizadas.



Figura 10. Fotografia do aparelho de treino na tarefa de contraste antecipatório de incentivo

Ao término das 24 sessões do treinamento inicial, os sujeitos foram submetidos a 10 sessões de teste, após um intervalo de dois dias. A fase de teste consistiu em randomizar os dias de apresentação das condições 15/15 e 15/32, cada qual sinalizada pelas suas correspondentes pistas discriminativas visuais. A seqüência de sessões realizada durante essa fase de teste na tarefa de contraste antecipatório de incentivo foi a seguinte: **(1)** 15/32, **(2)** 15/32, **(3)** 15/15, **(4)** 15/15, **(5)** 15/15, **(6)** 15/32, **(7)** 15/15, **(8)** 15/32, **(9)** 15/32, **(10)** 15/15. Essa fase de teste permitiu avaliar se o desempenho dos sujeitos estava sob o controle das pistas ambientais empregadas para a sinalização de cada condição, e não sob o controle da alternância temporal existente entre as duas condições experimentais.

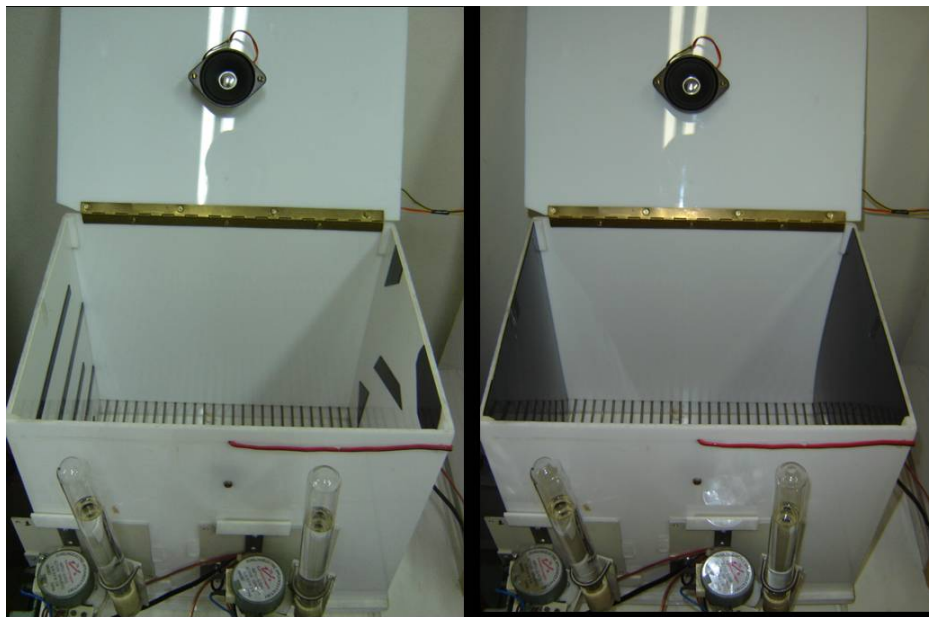


Figura 11. Fotografia do aparelho de teste na tarefa de contraste antecipatório de incentivo e das pistas visuais discriminativas utilizadas para a sinalização das duas condições experimentais empregadas.

4.1.5. Processamento Histológico

O processamento histológico dos encéfalos dos animais foi o mesmo empregado no Experimento 1 (ver Materiais e Métodos, Experimento 1).

4.1.6. Análise Estatística

Os dados comportamentais referentes às tarefas de condicionamento clássico aversivo e de contraste antecipatório de incentivo foram analisados estatisticamente através do teste de Análise de Variância (ANOVA) para medidas repetidas pelo pacote STATISTICA. Os detalhes de cada análise serão descritos, a seguir, na seção dos Resultados.

4.2. RESULTADOS

4.2.1. Resultados Histológicos: Cirurgias-Piloto

A Figura 12 mostra fotomicrografias de uma lesão bilateral do BL, produzida com a aplicação do conjunto de coordenadas estereotáxicas que apresentou os melhores resultados nas cirurgias-piloto, através da injeção múltipla e tópica de ácido ibotênico. Para efeitos comparativos, a Figura 4 (ver Resultados, Experimento 1) mostra fotomicrografias do encéfalo de um rato normal que não foi submetido a qualquer procedimento cirúrgico.

4.2.2. Resultados Histológicos

A Figura 13 ilustra esquematicamente as dimensões das lesões observadas nos ratos com maiores e menores danos, incluídos neste experimento. Dos 18 ratos submetidos à cirurgia para a produção da lesão do BL, dois sujeitos não foram incluídos na análise dos dados comportamentais, por apresentarem lesões muito pequenas da porção anterior do BL (segundo critérios adotados por Swanson, 1992). Dos 16 ratos lesados incluídos na análise, 14 apresentaram lesão de, no mínimo, 70% da porção anterior do BL. Somente dois deles exibiram lesões menores compreendendo cerca de 40% dessa região em um dos hemisférios, e praticamente toda a região no outro hemisfério. A grande maioria dos sujeitos não teve danificada a porção posterior do BL, e quando isso ocorreu, a lesão foi unilateral e abrangeu pequenas porções rostrais dessa região (em cinco sujeitos). Em alguns casos houve lesão de

pequenas porções rostrais do LA (unilateralmente em três sujeitos e bilateralmente em um sujeito). Além disso, um animal apresentou pequena lesão do núcleo endopiriforme, e outro sujeito do córtex piriforme adjacente. Em nenhum caso houve lesão do núcleo central ou do núcleo basal acessório, ou de quaisquer dos restantes núcleos da amígdala.

Ademais, não foi observado qualquer dano nos encéfalos dos ratos do grupo SHAM, a não ser aqueles produzidos pela passagem da micropipeta no procedimento cirúrgico, que por sua vez se apresentaram muito pequenos.

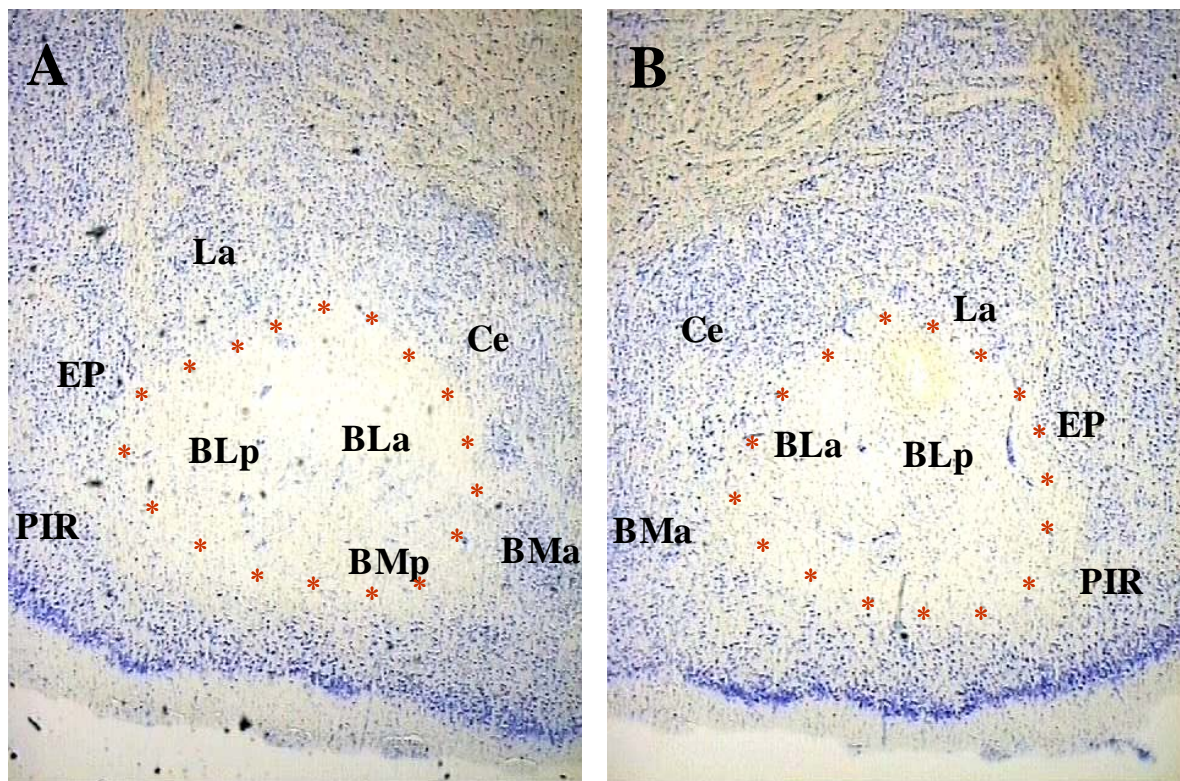


Figura 12. Fotomicrografias de secções coronais de encéfalo de rato no nível da amígdala (aumento de 40x), coradas com violeta de cresila. (A) e (B) indicam hemisfério direito e esquerdo, respectivamente, de um animal que apresentou a melhor lesão do BL numa cirurgia-piloto. A lesão (delimitada pelos asteriscos) atingiu o BL bilateralmente, e parte do córtex piriforme e do núcleo basal acessório posterior. *BLa*, núcleo basal anterior; *BLp*, núcleo basal posterior; *BMa*, núcleo basal acessório anterior; *BMp*, núcleo basal acessório posterior; *Ce*, núcleo central; *EP*, núcleo endopiriforme; *La*, núcleo lateral da amígdala e *PIR*, córtex piriforme.



Figura 13. Representações de secções coronais no nível da amígdala ilustrando esquematicamente a abrangência das lesões mais extensas (preenchimento em cinza claro) e menos extensas (preenchimento em cinza escuro) dos animais incluídos na análise do Experimento 2. As legendas dos diferentes núcleos da amígdala e das áreas adjacentes são mostradas no Apêndice A (ver adiante).

4.2.3. Condicionamento Clássico Aversivo

Teste de Medo Condicionado ao Contexto

O número total de sujeitos incluídos na análise dos dados comportamentais referentes ao condicionamento clássico aversivo, após a avaliação histológica das lesões, foi o seguinte: nove sujeitos no grupo dos lesados que receberam choque durante o treino (BL/CHQ; N = 9); sete sujeitos no grupo dos lesados que não foram expostos ao choque (BL/Ñ-CHQ; N = 7); 13 sujeitos no grupo dos controle-operados que receberam choque durante o treino (SHAM/CHQ; N = 13), e finalmente, 12 sujeitos no grupo dos controle-operados que não receberam choque (SHAM/Ñ-CHQ; N = 12).

Foi aplicado o teste ANOVA de três vias para medidas repetidas, para a análise dos dados. As variáveis independentes da análise compreenderam o tipo de lesão (SHAM ou BL), o grupo quanto ao procedimento experimental (CHQ ou Ñ-CHQ) e os blocos de tempo nos quais o teste foi dividido (dez blocos de um minuto cada, sendo considerado como medida repetida). A porcentagem de tempo exibido pelos animais com respostas de congelamento durante o teste foi tomada como a variável dependente. Os resultados são mostrados nas Figuras 14 e 15.

A ANOVA revelou que tanto animais SHAM quanto animais BL (do grupo CHQ) adquiriram o medo condicionado ao contexto, uma vez que ambos os grupos exibiram aumento significativo das respostas de congelamento em relação aos grupos correspondentes Ñ-CHQ (Efeito de Treino, $F_{1,37} = 22,83 - p < 0,0001$). Embora os animais do grupo BL/CHQ tenham exibido ligeira redução do tempo em congelamento (Figura 14), esse efeito não foi estatisticamente significativo (Efeito de Lesão: $F_{1,37} = 2,45 - p = 0,12$ e Efeito de interação Lesão x Treino, $F_{1,37} = 0,70 - p = 0,40$). A análise de *post hoc* de Newman-Keuls revelou, mais especificamente, que o tempo em congelamento de ratos do grupo SHAM/CHQ foi significativamente maior que o dos ratos do grupo SHAM/Ñ-CHQ ($p < 0,001$ – Figura 14). O mesmo ocorreu para os animais do grupo BL/CHQ, cujo tempo em congelamento foi significativamente maior que o do grupo BL/Ñ-CHQ ($p < 0,02$ – Figura 14). Além disso, o teste

post hoc indicou que o tempo em congelamento de ratos do grupo BL/CHQ não diferiu significativamente daquele apresentado pelos animais do grupo SHAM/CHQ ($p=0,09$), porém, parece existir uma tendência de os ratos BL mostrarem um menor tempo em congelamento em relação aos SHAM (Figura 14). Finalmente, o desempenho dos animais do grupo BL/Ñ-CHQ também não diferiu significativamente em relação ao desempenho dos ratos do grupo BL/Ñ-CHQ ($p=0,60$), como pode ser observado na Figura 14.

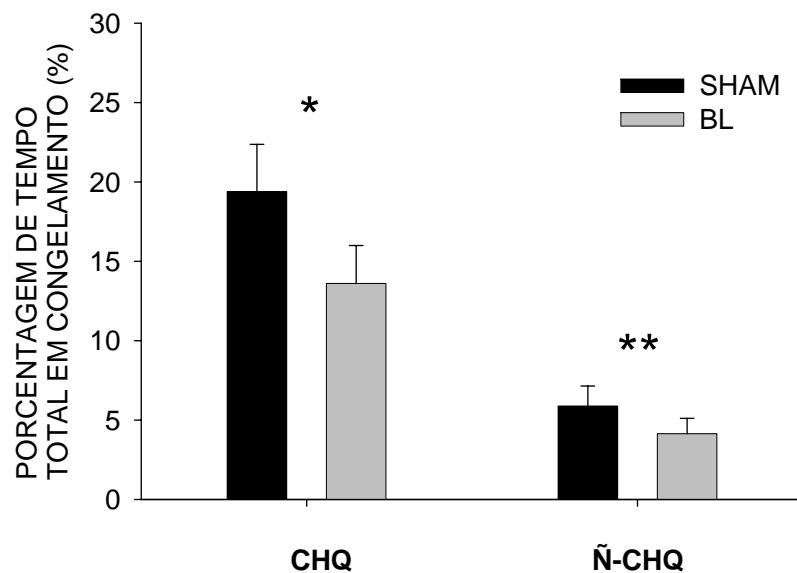


Figura 14. Porcentagem do tempo total em congelamento (média \pm erro padrão) no teste de medo condicionado ao contexto. **CHQ**, ratos que foram expostos ao choque durante o treino de condicionamento; **Ñ-CHQ**, ratos que não receberam o estímulo aversivo durante o treino; **BL**, sujeitos lesados seletivamente no BL; **SHAM**, sujeitos controle-operados.

Adicionalmente, as respostas de medo condicionado ao contexto dos ratos dos grupos SHAM/CHQ e BL/CHQ não diferiram significativamente entre si ao longo dos dez minutos do teste, pode ser visto na Figura 15 (Efeito de Bloco, $F_{9,333} = 8,14 - p < 0,0001$; Efeito de interação Treino x Bloco, $F_{9,333} = 5,89 - p < 0,0001$, e Efeito de interação Lesão x Bloco, $F_{9,333}$

= 0,52 – $p=0,85$). O teste *post hoc* de Newman-Keuls (Lesão x Treino x Bloco) mostrou que os tempos em congelamento exibido por ratos BL/CHQ e SHAM/CHQ não diferiram significativamente entre si ao longo de todos os blocos do teste de medo condicionado ao contexto ($p>0,05$), assim como os dos animais BL/Ñ-CHQ e SHAM/Ñ-CHQ ($p>0,05$), como mostra a Figura 15.

O teste de Newman-Keuls também indicou que o tempo em congelamento exibido pelos animais dos grupos BL/CHQ e SHAM/CHQ não diferiu significativamente daquele exibido pelos sujeitos dos grupos BL/Ñ-CHQ e SHAM/Ñ-CHQ a partir do terceiro bloco do teste (quando o $p>0,05$), como pode ser observado na Figura 15.

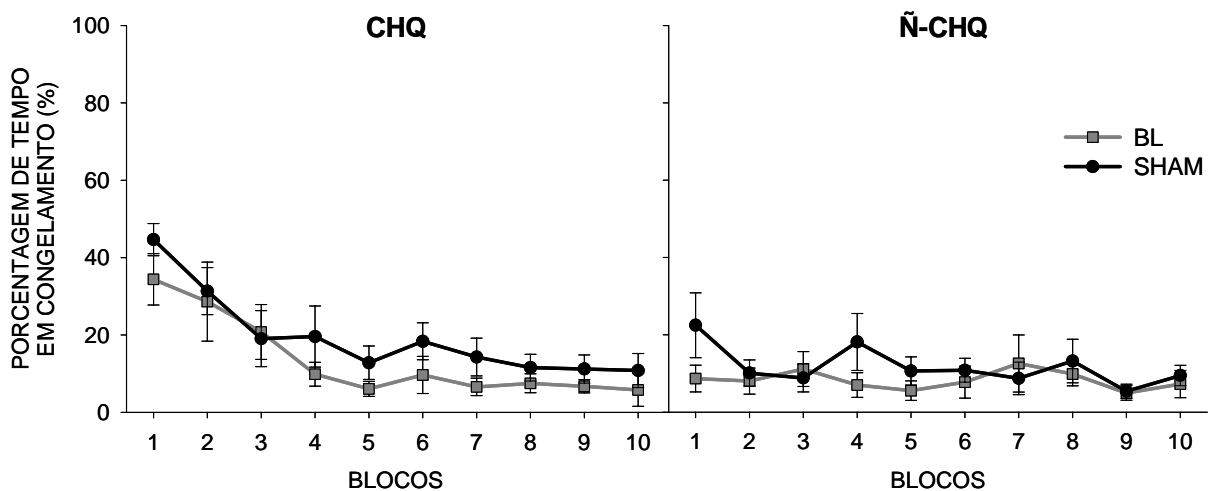


Figura 15. Porcentagem de tempo em congelamento (média \pm erro padrão) ao longo dos dez blocos de tempo (de 1 min cada) no teste de medo condicionado ao contexto. **CHQ**, ratos que foram expostos ao choque durante o treino de condicionamento; **Ñ-CHQ**, ratos que não receberam o estímulo aversivo durante o treino; **BL**, sujeitos lesados seletivamente no BL; **SHAM**, sujeitos controle-operados.

Teste de Medo Condicionado ao Som

O teste ANOVA de três vias para medidas repetidas e as variáveis utilizadas para a análise do teste de medo condicionado ao contexto também foram empregadas para a análise dos dados deste teste comportamental. Os resultados são mostrados nas Figuras 16 e 17.

A ANOVA mostrou que os animais BL e SHAM (do grupo CHQ) adquiriram o medo condicionado ao som, já que seus tempos em congelamento foram significativamente maiores do que aqueles exibidos pelos ratos dos grupos correspondentes Ñ-CHQ, como pode ser observado na Figura 16. O teste revelou também que o desempenho de ratos do grupo BL não diferiu significativamente daquele apresentado pelos ratos do grupo SHAM, independentemente do tipo de treino (Efeito de Treino, $F_{1,37} = 34,15 - p < 0,0001$; Efeito de Lesão, $F_{1,37} = 0,18 - p = 0,67$, e Efeito de interação Lesão x Treino, $F_{1,37} = 0,60 - p = 0,44$). Como esperado, a análise *post hoc* de Newman-Keuls revelou, mais especificamente, que o tempo em congelamento de ratos do grupo SHAM/CHQ foi significativamente maior do que o de ratos do grupo SHAM/Ñ-CHQ ($p < 0,001$), como mostra a Figura 16. O mesmo ocorreu para os ratos do grupo BL/CHQ, cujo desempenho não diferiu significativamente daquele apresentado por animais do grupo BL/CON ($p < 0,001 -$ Figura 16). Além disso, o teste *post hoc* indicou que o tempo em congelamento dos ratos do grupo BL/CHQ não diferiu estatisticamente daquele exibido pelos animais SHAM/CHQ ($p = 0,40 -$ Figura 16). O mesmo ocorreu para ratos BL/CON em relação aos BL/CHQ ($p = 0,80$), como mostra a Figura 16.

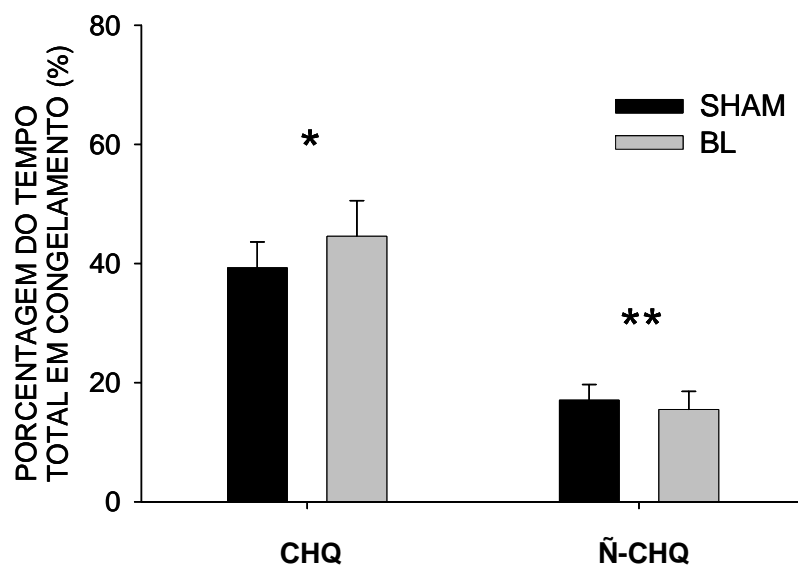


Figura 16. Porcentagem do tempo total em congelamento (média \pm erro padrão) no teste de medo condicionado ao som. **CHQ**, ratos

que foram expostos ao choque durante o treino de condicionamento; \tilde{N} -CHQ, ratos que não receberam o estímulo aversivo durante o treino; BL, sujeitos lesados seletivamente no BL; SHAM, sujeitos controle-operados.

Ademais, as respostas de medo condicionado ao som dos ratos dos grupos SHAM/CHQ e BL/CHQ não diferiram significativamente entre si ao longo dos doze minutos do teste, pode ser visto na Figura 17 (Efeito de Bloco, $F_{11,407} = 22,65 - p < 0,0001$; Efeito de interação Treino x Bloco, $F_{11,407} = 10,17 - p < 0,0001$, e Efeito de interação Lesão x Bloco, $F_{11,407} = 0,82 - p = 0,62$).

A análise *post hoc* de Newman-Keuls (Lesão x Treino x Bloco) mostrou que durante os dois primeiros blocos do teste, isto é, na ausência de qualquer estímulo sonoro, o tempo em congelamento de ratos BL/CHQ e SHAM/CHQ não diferiu significativamente daquele exibido pelos animais dos grupos BL/ \tilde{N} -CHQ e SHAM/ \tilde{N} -CHQ ($p > 0,05$ - Figura 17).

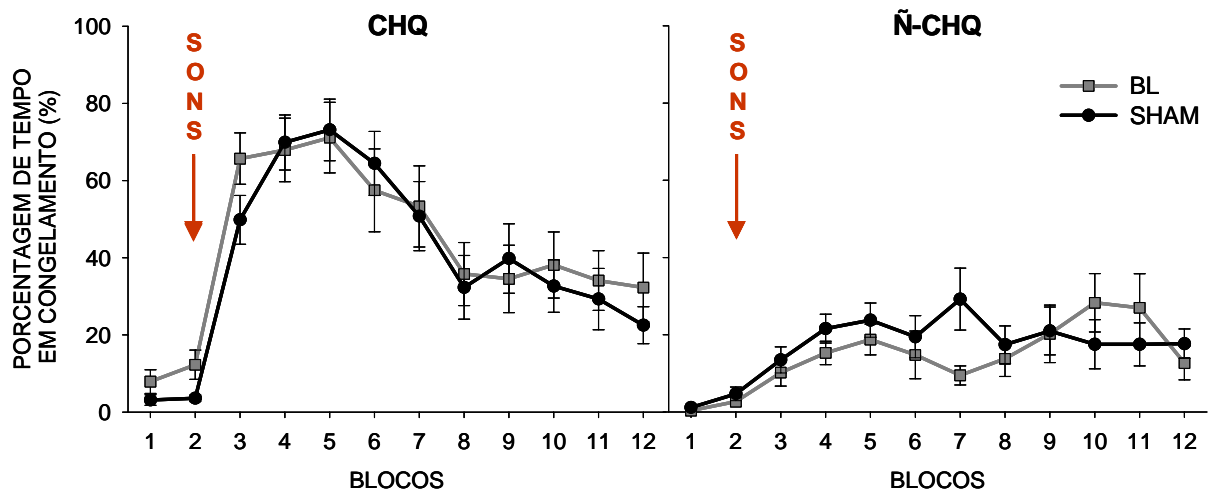


Figura 17. Porcentagem de tempo em congelamento (média \pm erro padrão) ao longo dos doze blocos de tempo (de 1 min cada) no teste de medo condicionado ao som. CHQ, ratos que foram expostos ao choque durante o treino de condicionamento; \tilde{N} -CHQ, ratos que não receberam o estímulo aversivo durante o treino; BL, sujeitos lesados seletivamente no BL; SHAM, sujeitos controle-operados.

O teste de Newman-Keuls também indicou que, tanto para ratos BL quanto para ratos SHAM do grupo CHQ, o tempo em congelamento aumentou significativamente a partir do terceiro bloco do teste, isto é, quando se iniciou a apresentação dos estímulos sonoros ($p < 0,05$

- Figura 17). E ainda, que o tempo em congelamento dos animais do grupo CHQ não atingiu diferença estatística em relação àquele exibido pelos ratos do grupo Ñ-CHQ a partir do sétimo bloco do teste para os SHAM e a partir do oitavo bloco para os BL (quando o $p > 0,05$ - Figura 17. Adicionalmente, o teste mostrou que o desempenho dos ratos BL/CHQ ou BL/Ñ-CHQ foi semelhante ao dos seus respectivos SHAM ao longo de todos os 12 blocos do teste de medo condicionado ao som ($p > 0,05$), como mostra a Figura 17.

4.2.4. Tarefa de Contraste Antecipatório de Incentivo – Intra-sujeitos

Fase 1 – Condições 15/15 e 15/32 apresentadas em dias alternados

Foram incluídos na análise dos dados comportamentais da tarefa de contraste antecipatório de incentivo apenas ratos cujas lesões foram consideradas satisfatórias, conforme descrito anteriormente. Assim, incluiu-se um total de 16 sujeitos no grupo dos lesados (BL) e 25 sujeitos no grupo dos controle-operados (SHAM), tendo cada um deles recebido as duas condições de treino (sacarina-sacarina – 15/15, e sacarina-sacrose – 15/32) em dias alternados e sinalizadas por pistas discriminativas visuais distintas.

Como parte desses animais havia previamente recebido choque na tarefa de condicionamento clássico aversivo e a outra parte não havia recebido choque, inicialmente foi aplicado um teste ANOVA de quatro vias para medidas repetidas objetivando avaliar se esses tratamentos prévios produziram diferenças comportamentais na tarefa de contraste antecipatório. Para isso, foram tomadas como variáveis independentes, (1) o tipo de lesão (SHAM ou BL), (2) o tipo de tratamento prévio (CHQ ou Ñ-CHQ), (3) as condições experimentais no contraste antecipatório (15/15 ou 15/32), e (4) as sessões de treino (doze sessões para cada condição experimental; sendo considerada como medida repetida). A frequência de lambidas (número de lambidas/minuto) em cada solução realizada pelos animais foi tomada como a variável dependente.

A ANOVA revelou que o treino de condicionamento aversivo prévio não promoveu qualquer interferência sobre o desempenho dos animais na tarefa de contraste antecipatório de incentivo, que ocorreu logo a seguir. Isso porque o teste mostrou que a frequência de lambidas na primeira solução (sacarina, independentemente da condição) de animais SHAM e BL que haviam sido condicionados aversivamente no teste anterior (CHQ) não diferiu significativamente daquela de ratos que não haviam recebido choque (Ñ-CHQ), tanto em dias de condição 15/15 quanto em dias de condição 15/32 (Efeito de Treino Prévio, $F_{1,37} = 1,37 - p=0,25$; Efeito de interação Treino Prévio x Lesão, $F_{1,37} = 0,11 - p=0,74$; Efeito de interação Treino Prévio x Condição, $F_{1,37} = 0,62 - p=0,44$, e Efeito de interação Treino Prévio x Lesão x Condição, $F_{1,37} = 0,11 - p=0,74$). Ademais, o mesmo ocorreu ao considerarmos a frequência de lambidas na segunda solução (sacarina ou sacarose, dependendo da condição) – Efeito de Treino Prévio, $F_{1,37} = 1,10 - p=0,30$; Efeito de interação Treino Prévio x Lesão, $F_{1,37} = 2,70 - p=0,11$; Efeito de interação Treino Prévio x Condição, $F_{1,37} = 0,10 - p=0,76$, e Efeito de interação Treino Prévio x Lesão x Condição, $F_{1,37} = 1,50 - p=0,22$.

Diante desses resultados, foi aplicado um segundo teste ANOVA (de três vias para medidas repetidas), para a análise dos dados, desconsiderando a existência de sub-grupos quanto ao condicionamento aversivo prévio. Para efeito de análise, dividimos as 12 sessões de treino em cada condição experimental em 4 blocos de 3 sessões cada. Assim, neste segundo teste estatístico, foram tomadas como variáveis independentes: (1) o tipo de lesão (SHAM ou BL), (2) as condições experimentais da tarefa de contraste (15/15 ou 15/32), e (3) os blocos de sessões de treino (quatro blocos no total para cada uma das condições, sendo considerado como medida repetida). A frequência de lambidas em cada solução durante a tarefa foi tomada como a variável dependente.

Ao analisarmos os dados referentes ao consumo da primeira solução durante o teste, os resultados da análise estatística indicaram que a lesão seletiva do BL não interferiu na aquisição do efeito de contraste antecipatório de incentivo na versão intra-sujeitos da tarefa, ao menos nessa primeira fase do teste (Figura 18).

A ANOVA revelou, como esperado, a existência de efeito significativo em relação ao tipo de Condição ($F_{1,39} = 6,04 - p < 0,01$) e à interação Condição x Bloco ($F_{3,117} = 34,85 - p < 0,0001$). Indicando que, independentemente da lesão, os animais consumiram, em média, significativamente menos da primeira solução (sacarina) em dias em que ocorreu sinalização da condição 15/32 do que em dias que houve sinalização da ocorrência da condição 15/15, evidenciando o efeito de contraste.

O teste ANOVA revelou ainda ausência de efeito significativo da Lesão ($F_{1,39} = 1,51 - p = 0,23$), da interação Lesão x Condição ($F_{1,39} = 0,38 - p = 0,54$) e da interação Lesão x Condição x Bloco ($F_{3,117} = 1,85 - p = 0,14$), indicando que o efeito de contraste foi semelhante entre ratos BL e SHAM nessa primeira fase do treino.

Ao analisarmos os dados sobre o consumo da primeira solução no último bloco do treino, o teste *post hoc* de Newman-Keuls indicou que, tanto para ratos SHAM quanto para os ratos BL, o consumo da primeira solução na condição 15/32 foi significativamente menor que na condição 15/15 ($p < 0,001$), sugerindo que ratos lesados no BL e seus respectivos SHAM adquiriram o efeito de contraste antecipatório de incentivo, numa versão intra-sujeitos, quando as diferentes condições de treino foram apresentadas em dias alternados e sinalizadas por pistas discriminativas visuais, como pode ser visualizado na Figura 18.

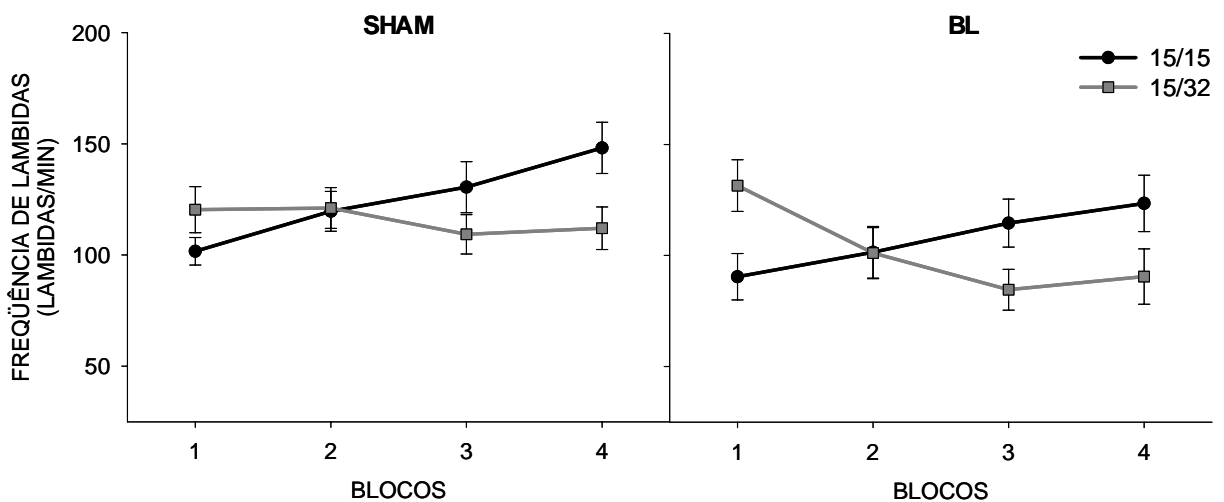


Figura 18. Frequência de lambidas (média ± erro padrão) na primeira solução (sacarina 0,15%)

durante os blocos de sessões de treino da primeira fase da tarefa de contraste antecipatório de incentivo intra-sujeitos realizado por ratos lesados seletivamente no BL (**BL**) e por seus respectivos controle-operados (**SHAM**) sob as condições sacarina-sacarina (**15/15**) ou sacarina-sacarose (**15/32**).

Além disso, os resultados referentes ao consumo da segunda solução (sacarina ou sacarose, dependendo da condição, 15/15 ou 15/32) indicaram que a lesão seletiva do BL pareceu não interferiu na preferência da solução de sacarose sobre a solução de sacarina, como pode ser visto na Figura 19. Isto é, ratos com lesão seletiva do BL, assim como seus respectivos SHAM, apresentaram o consumo da solução de sacarose significativamente maior que o consumo da solução de sacarina (Figura 19). Além disso, a análise dos dados também indicou que ratos lesados seletivamente no BL apresentaram o consumo da segunda solução diminuído frente aos seus SHAM, independentemente se era sacarina ou sacarose.

Como esperado, a ANOVA revelou a existência de efeito significativo em relação ao tipo de Condição ($F_{1,39} = 2493,7 - p < 0,0001$) e à interação Condição x Bloco ($F_{3,117} = 29,6 - p < 0,0001$), indicando que independentemente das lesões, sujeitos expostos à condição 15/32 consumiram mais da segunda solução que aqueles submetidos à condição 15/15.

Ademais, não houve efeito significativo na interação entre os fatores Condição e Lesão ($F_{1,39} = 0,01 - p = 0,92$). Embora o teste de Newman-Keuls (Condição x Lesão) tenha indicado que para os ratos do grupo BL e do grupo SHAM, o consumo da segunda solução de sacarose foi significativamente maior que o de sacarina ($p < 0,0001$), também revelou que no geral ratos do grupo BL consumiram menos da segunda solução, sendo ela sacarina ou sacarose, que os ratos do grupo SHAM ($p < 0,01$). Este último resultado também pôde ser evidenciado pelos significativos Efeitos de Lesão ($F_{1,39} = 7,50 - p < 0,01$) e de interação Lesão x Bloco ($F_{3,117} = 4,40 - p < 0,01$).

Fase 2 – Condições 15/15 e 15/32 apresentadas em dias randomizados

A análise pelo teste ANOVA da frequência de lambidas na primeira solução durante a segunda fase da tarefa de contraste antecipatório intra-sujeitos (tendo como variáveis

independentes: Lesão, Condição e Bloco) revelou um efeito significativo quanto ao tipo de Lesão ($F_{1,39} = 3,92 - p < 0,05$), indicando que os ratos do grupo BL apresentaram o consumo da primeira solução diminuído, independentemente da condição, em relação ao grupo SHAM.

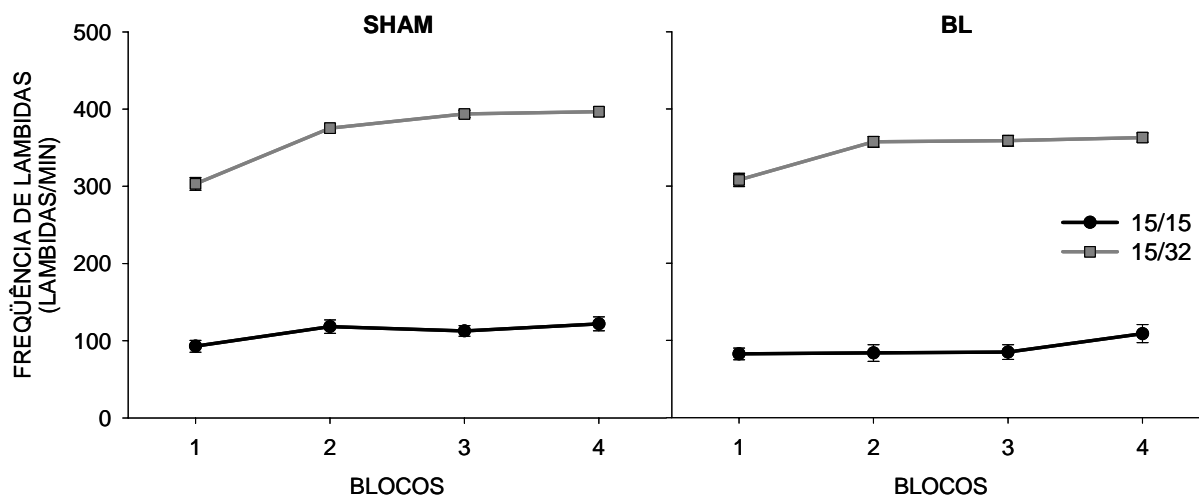


Figura 19. Frequência de lambidas (média \pm erro padrão) na segunda solução durante os blocos de sessões de treino da primeira fase da tarefa de contraste antecipatório de incentivo intra-sujeitos realizado por ratos lesados seletivamente no BL (**BL**) e por seus respectivos controle-operados (**SHAM**) sob as condições sacarina-sacarina (**15/15**) ou sacarina-sacarose (**15/32**).

A ANOVA também revelou a existência de um efeito significativo de Condição ($F_{1,39} = 96,71 - p < 0,0001$), indicando que, independentemente da lesão, os animais consumiram, em média, significativamente menos da primeira solução (sacarina) em dias que ocorreu sinalização da condição 15/32 do que em dias que houve sinalização da ocorrência da condição 15/15.

Além disso, não houve efeito significativo na interação entre os fatores Lesão e Condição ($F_{1,39} = 0,13 - p = 0,72$), e o respectivo teste *post hoc* de Newman-Keuls mostrou que o consumo da primeira solução para a condição 15/32 foi significativamente menor do que para a condição 15/15 para os ratos do grupo BL ($p < 0,0001$) e para os do grupo SHAM ($p < 0,0001$), ou seja, que ratos BL e SHAM apresentaram o efeito de contraste antecipatório

também nessa fase da tarefa, como mostra a Figura 20. Adicionalmente, o teste *post hoc* revelou que animais do grupo BL consumiram menos da primeira solução que seus respectivos SHAM tanto na condição 15/15 como na condição 15/32 (condição 15/15 – $p < 0,001$; e condição 15/32 – $p < 0,002$ – Figura 20).

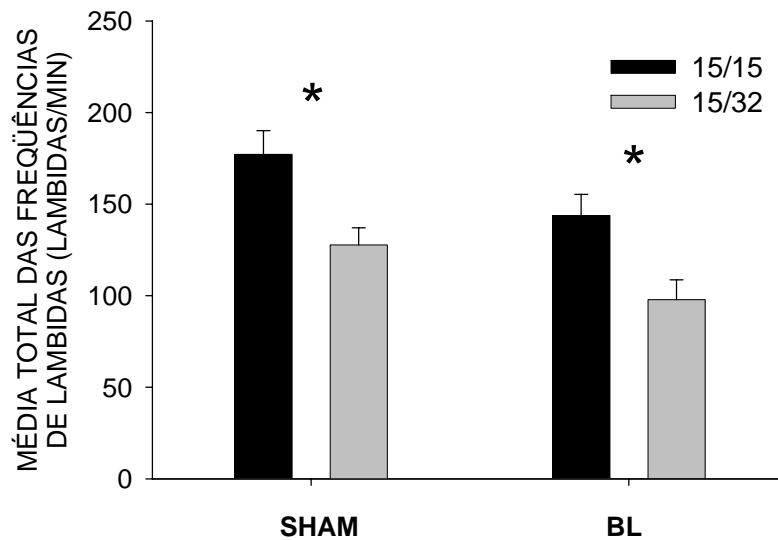


Figura 20. Frequência média de lambidas (média \pm erro padrão) na primeira solução (sacarina 0,15%) durante a segunda fase da tarefa de contraste antecipatório de incentivo intra-sujeitos (dias randomizados) realizado por ratos lesados seletivamente no BL (**BL**) e por seus respectivos controle-operados (**SHAM**) sob as condições sacarina-sacarina (**15/15**) ou sacarina-sacarose (**15/32**).

A ANOVA também constatou efeito significativo de Sessão ($F_{4,156} = 6,26 - p < 0,0001$), mas não na interação Condição x Sessão ($F_{4,156} = 1,47 - p = 0,22$). O teste *post hoc* de Newman-Keuls revelou que o consumo da primeira solução na condição 15/32 não se alterou ao longo das quatro sessões de treino nesta fase da tarefa. No entanto, na condição 15/15, o consumo da primeira solução pareceu se alterar em função da seqüência de apresentação das sessões de treino (Figura 21). Lembrando que a seqüência de apresentação das condições nesta fase da tarefa foi: (1^a) 15/32 - (2^a) 15/32 - (3^a) **15/15** - (4^a) **15/15** - (5^a) **15/15** - (6^a) 15/32 - (7^a) **15/15** - (8^a) 15/32 - (9^a) 15/32 - (10^a) **15/15**, detectou-se diferença entre os consumos da (1) primeira e terceira, (2) primeira e quarta, (3) primeira e quinta, (4) segunda e

terceira, (5) segunda e quarta, e (6) a quarta e a quinta sessões da condição 15/15, mas não entre (1) a primeira e a segunda, (2) a segunda e a quinta, (3) a terceira e a quarta, e (4) a terceira e a quinta sessões da condição 15/15. Ou seja, parece que o consumo da primeira solução na condição 15/15 tendeu a aumentar quando essa condição foi apresentada em dias consecutivos, mas voltou a um nível mais baixo depois da experiência com a condição 15/32, como se pode ver na Figura 21. A análise de Newman-Keuls (Lesão x Condição x Sessão) também mostrou que esse padrão de desempenho ocorreu para os ratos do grupo SHAM, mas apesar de uma tendência, não foi significativo para os ratos do grupo BL (Figura 21).

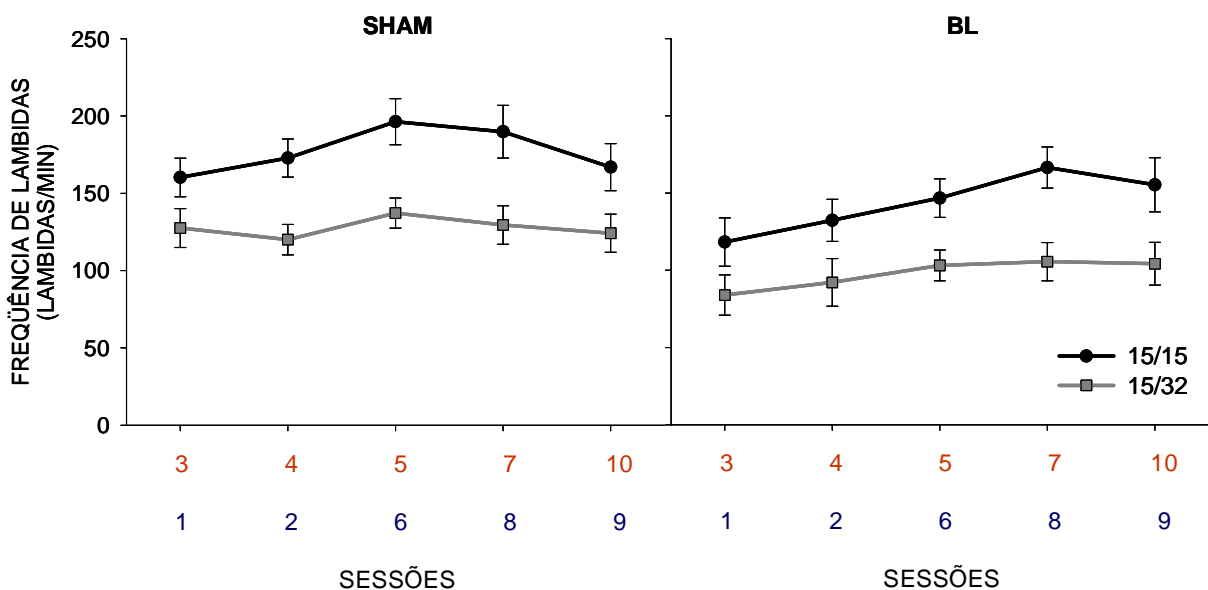


Figura 21. Frequência de lambidas (média \pm erro padrão) na primeira solução (sacarina 0,15%) ao longo das sessões de teste da segunda fase da tarefa de contraste antecipatório de incentivo intra-sujeitos (dias randomizados) realizado por ratos lesados seletivamente no BL (*BL*) e por seus respectivos controle-operados (*SHAM*) sob as condições sacarina-sacarina (*15/15*) ou sacarina-sacarose (*15/32*). As sessões em vermelho indicam os dias de apresentação da condição 15/15, e as em azul indicam os dias de apresentação da condição 15/32.

A análise da frequência de lambidas na segunda solução durante a segunda fase do treino de contraste antecipatório intra-sujeitos revelou um efeito significativo da Condição ($F_{1,39} = 1109,4 - p < 0,0001$), indicando que independentemente das lesões, sujeitos expostos à

condição 15/32 consumiram mais da segunda solução do que aqueles submetidos à condição 15/15 (Figuras 22 e 23).

A ANOVA revelou ausência de significância quanto ao efeito de interação Condição x Lesão ($F_{1,39} = 2,80 - p=0,10$). O teste *post hoc* de Newman-Keuls indicou que, para os ratos do grupo BL e para os do grupo SHAM, o consumo da segunda solução de sacarose foi significativamente maior que o de sacarina ($p<0,0001$), isto é, que ratos BL mantêm a preferência pela solução de sacarose em relação à solução de sacarina, como pode ser visto nas Figuras 22 e 23.

O teste *post hoc* também revelou que os ratos BL consumiram menos da segunda solução de sacarose que os SHAM ($p<0,01$), mas que o consumo da segunda solução de sacarina foi o mesmo entre eles ($p=0,66$ - Figura 22). Esse último resultado também pôde ser evidenciado pelo efeito significativo da Lesão ($F_{1,39} = 4,60 - p<0,04$).

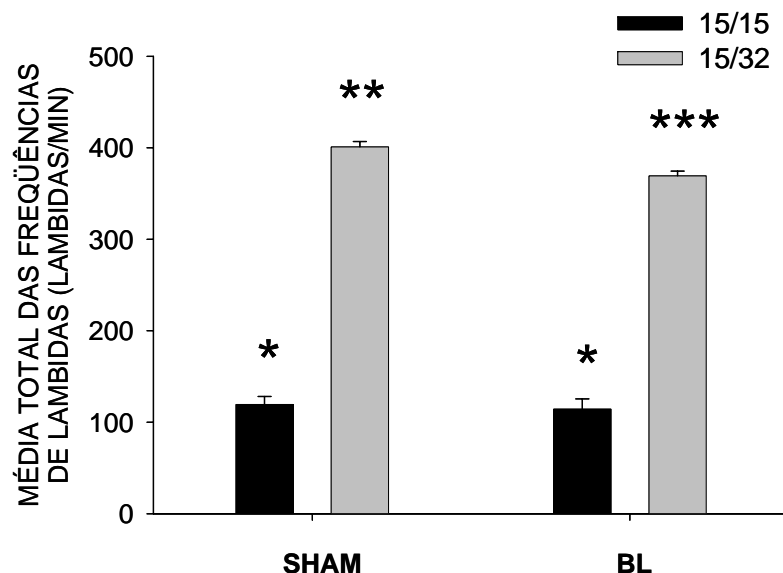


Figura 22. Frequência média de lambidas (média \pm erro padrão) na segunda solução (sacarina 0,15% ou sacarose 32%, dependendo da condição) na segunda fase da tarefa de contraste antecipatório de incentivo intra-sujeitos (dias randomizados) realizado por ratos lesados seletivamente no BL (**BL**) e por seus respectivos controle-

operados (*SHAM*) sob as condições sacarina-sacarina (*15/15*) ou sacarina-sacarose (*15/32*).

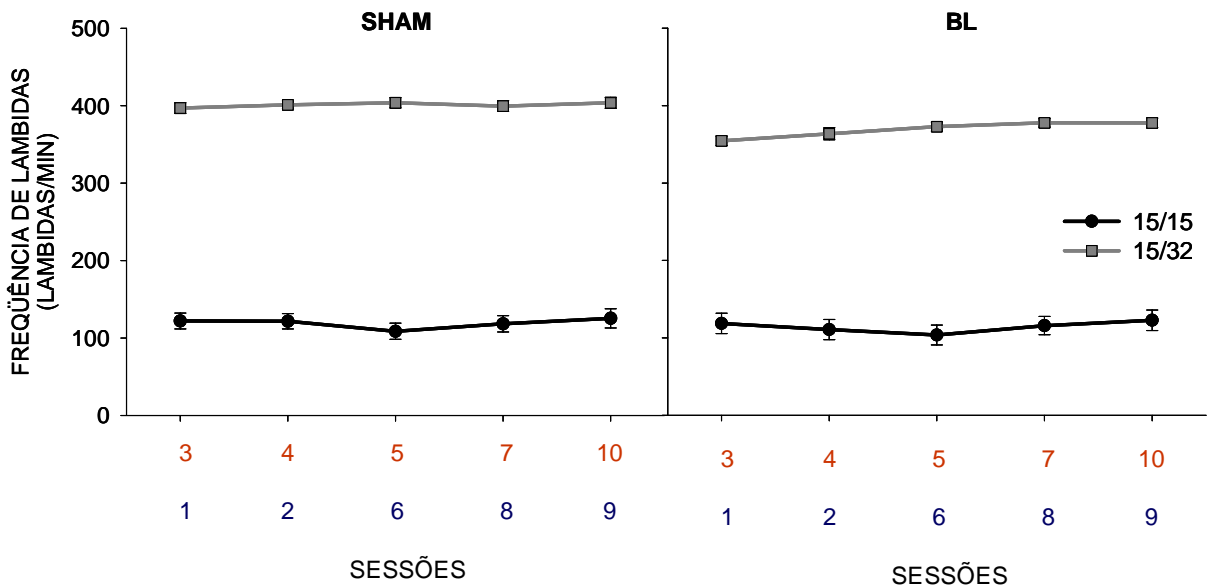


Figura 23. Freqüência de lambidas (média \pm erro padrão) na segunda solução (sacarina 0,15% ou sacarose 32%, dependendo da condição) ao longo das sessões de teste da segunda fase da tarefa de contraste antecipatório de incentivo intra-sujeitos (dias randomizados) realizado por ratos lesados seletivamente no BL (*BL*) e por seus respectivos controle-operados (*SHAM*) sob as condições sacarina-sacarina (*15/15*) ou sacarina-sacarose (*15/32*). As sessões em vermelho indicam os dias de apresentação da condição 15/15, e as em azul indicam os dias de apresentação da condição 15/32.

Em síntese, os resultados deste conjunto de experimentos indicaram que ratos com lesão seletiva do BL não apresentaram prejuízo significativo de desempenho nos testes de medo condicionado ao som e ao contexto, embora os lesados treinados com choque tenham exibido tempo em congelamento moderadamente inferior aos seus respectivos controle-operados (não significativo em termos estatísticos). Ressalta-se aqui que o treino de condicionamento aversivo empregado neste experimento envolveu choques de 0,50mA, diferentemente do Experimento 1, o qual envolveu choques de 1mA. Diferentemente do observado no presente experimento, ratos com lesão do BL treinados com choques de 1mA (Experimento 1) exibiram prejuízo significativo de desempenho no teste de medo

condicionado ao contexto, mas não ao som. Especula-se que as discrepâncias quanto aos resultados dos dois experimentos ocorreram exatamente em razão das diferentes intensidades de choques nas patas aplicadas durante os treinos de condicionamento. O experimento seguinte tratará deste assunto.

Adicionalmente, os resultados do presente experimento indicaram que ratos com lesão seletiva do BL apresentaram o efeito de contraste antecipatório de incentivo, como seus respectivos controle-operados, numa versão intra-sujeitos da tarefa de contraste envolvendo sinalização das diferentes condições de treino por pistas discriminativas visuais. Ainda, ratos com lesão do BL permaneceram com a habilidade de discriminar entre as duas soluções apresentadas. Esses resultados estão de acordo com a hipótese de que o BL participaria da formação de associações estímulo-reforço em se tratando de estímulos contextuais, mas não discretos, uma vez que supostamente ratos lesados foram capazes de acessar o valor de incentivo da segunda solução por meio de pistas visuais discretas, e então comparar o valor de incentivo da solução pendente com o valor da solução corrente. Neste contexto, o último experimento (4) terá por objetivo avaliar se, de fato, a aquisição do efeito de contraste antecipatório de incentivo envolveria o aprendizado de associações estímulo-reforço, ou seja, se o desempenho nessa tarefa dependeria do acesso da representação do valor motivacional da recompensa pendente por meio de estímulos condicionados ambientais.

Uma discussão mais detalhada desse conjunto de resultados será realizada na seção da Discussão, mais adiante.

5. Experimento 3

EXPERIMENTO 3.

Efeitos da lesão seletiva e excitotóxica do BL sobre o desempenho numa tarefa de condicionamento clássico aversivo ao som e ao contexto, com choques de 0,75mA e de 1mA

No último experimento descrevemos o efeito da lesão excitotóxica e seletiva do BL sobre o medo condicionado ao som e ao contexto quando os animais foram expostos a cinco pareamentos de som e choque de **0,50mA** durante o treino. Os resultados mostraram que, sob essas condições de treino, ratos lesados não mostraram prejuízo em nenhum dos testes de medo condicionado, diferentemente do observado no Experimento 1, onde animais lesados no BL apresentaram prejuízo de desempenho no teste de medo condicionado ao contexto, mas não ao som, quando o treino compreendeu cinco pareamentos de som e choque de **1mA** (grupo MÉDIA-ALTA intensidade). Hipotetizamos que a ausência de diferença entre os desempenhos de sujeitos lesados e controle-operados quanto ao medo condicionado ao contexto quando o treino envolveu choques de 0,50mA, pode ter ocorrido por conta de as respostas de congelamento exibidas pelos ratos controle-operados durante o teste terem sido muito baixas a ponto de não ser possível detectar qualquer diferença existente entre eles e os ratos lesados. Assim sendo, os sujeitos lesados que haviam sido treinados no condicionamento clássico aversivo no Experimento 2 (com choques de 0,50mA) foram retreinados na mesma tarefa, mas empregando choques de 0,75mA ou de 1mA, logo depois do término do treino na tarefa de contraste antecipatório de incentivo.

5.1. MATERIAIS E MÉTODOS

Sujeitos

Foram utilizados 26 ratos machos Wistar provenientes do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina - USP. Grupos de até três animais foram mantidos em gaiolas de

plástico, em ambiente sob temperatura em torno de 22°C, e ciclo luz/escuro de 12 horas (luz das 7h00min às 19h00min). Dezesesseis desses sujeitos experimentais haviam passado anteriormente pelas tarefas de condicionamento clássico aversivo (com choques de 0,50mA) e de contraste antecipatório de incentivo intra-sujeitos (Experimento 2), e haviam sido inicialmente submetidos à cirurgia para produção de lesão seletiva do BL (portanto, faziam parte do grupo BL). Os ratos controle-operados (SHAM) utilizados no Experimento 2 haviam sido sacrificados antes do início do presente experimento, e portanto, os sujeitos controles (Ñ-OP, N = 10) utilizados aqui não haviam passado por nenhum procedimento cirúrgico, mas tinham idade e peso semelhantes aos lesados. Esses ratos utilizados como controles (Ñ-OP) diferiram dos ratos lesados (BL) em vários aspectos incluindo a ausência de intervenção cirúrgica, ausência de treino inicial na tarefa de condicionamento aversivo com choques de 0,50mA, ausência de treino prévio na tarefa de contraste antecipatório de incentivo e todas as manipulações ligadas a esses procedimentos. Dessa forma, claramente esse grupo de animais não se tratou de um grupo controle ideal, e por conseguinte o planejamento experimental envolvendo este experimento também não foi ideal, porém pareceu importante fazê-lo exploratoriamente face à “perda” dos ratos SHAM e ao tempo requerido para a operação e os outros procedimentos envolvendo novos ratos.

Treino de Condicionamento Clássico Aversivo

O aparelho e o procedimento básico de treino de condicionamento clássico aversivo empregados neste experimento foram os mesmos do Experimento 2 (ver Materiais e Métodos, Experimento 2). O treino ocorreu cerca de quinze dias após término dos testes de contraste antecipatório de incentivo do Experimento 2, e cerca de 50 dias depois do término do primeiro teste de medo condicionado.

Dividimos os animais em dois grupos distintos considerando a intensidade de choque aplicada durante o treino neste experimento. Um grupo recebeu pareamentos de som e choque de intensidade de **0,75mA** (grupo CHQ-0,75) enquanto outro grupo recebeu pareamentos de som e choque de intensidade de **1mA** (grupo CHQ-1). Desta forma, os animais foram

divididos em um total de quatro grupos: animais lesados que receberam choques de 0,75mA (grupo BL / CHQ-0,75; N = 8), animais lesados que receberam choques de 1mA (grupo BL / CHQ-1; N = 8), animais controles que foram expostos a choques de 0,75mA (grupo Ñ-OP / CHQ-0,75; N = 5) e, finalmente, animais controles que foram submetidos a choques de 1mA (grupo Ñ-OP / CHQ-1; N = 5).

Teste de Medo Condicionado ao Contexto

O aparelho e o procedimento do teste de medo condicionado ao contexto foram os mesmos empregados no Experimento 2 (ver Materias e Métodos, Experimento 2).

5.2. RESULTADOS

Teste de Medo Condicionado ao Contexto

Inicialmente realizou-se um teste ANOVA de duas vias para medidas repetidas com o objetivo de avaliar se o condicionamento aversivo prévio realizado no Experimento 2 alterou de alguma forma o desempenho dos sujeitos lesados retreinados na tarefa de condicionamento, com as novas intensidades de choque. Para tanto, comparamos os tempos em congelamento, no teste de medo condicionado ao contexto, de ratos BL previamente expostos aos choques de 0,50mA (no Experimento 2) com o tempo em congelamento de ratos BL que não haviam recebido choque. As variáveis independentes da análise compreenderam o tipo de treino prévio (CHQ e Ñ-CHQ) e os blocos de tempo nos quais o teste foi dividido (dez blocos de um minuto cada; sendo considerado como medida repetida). A ANOVA não detectou qualquer diferença e, portanto, influência do condicionamento prévio sobre o segundo condicionamento (Efeito de Treino Prévio: $F_{1,14}=0,79 - p=0,39$). Ou seja, ratos que haviam recebido choque (de 0,50mA) e ratos que não haviam sido expostos ao choque (Ñ-CHQ) durante o treino anterior, exibiram desempenhos semelhantes no segundo condicionamento aversivo envolvendo choques de 0,75mA ou de 1mA.

Assim sendo, aplicou-se uma ANOVA de três vias para medidas repetidas, sendo consideradas como variáveis independentes o tipo de lesão (Ñ-OP ou BL), o grupo quanto ao procedimento experimental (CHQ-0,75 ou CHQ-1) e os blocos de tempo nos quais o teste foi dividido (dez blocos de um minuto cada, considerado como medida repetida). A porcentagem de tempo exibido pelos animais com respostas de congelamento durante o teste foi tomada como a variável dependente.

A ANOVA revelou a existência de um efeito significativo da Lesão ($F_{1,22} = 5,79 - p < 0,02$), indicando que ratos lesados no BL exibiram tempo em congelamento significativamente menor que os ratos Ñ-OP no teste de medo condicionado ao contexto, independentemente da intensidade de choque empregada durante o treino (Figura 24).

A ANOVA revelou também um efeito significativo quanto ao tipo de Treino ($F_{1,22} = 12,60 - p < 0,002$), ou seja, ratos expostos a choques de 0,75mA apresentaram, no teste ao contexto, tempos em congelamento menores que ratos submetidos a choques de 1mA (Figura 24). Além disso, a ANOVA não revelou efeito significativo na interação Lesão x Treino ($F_{1,22} = 0,12 - p = 0,73$), e o teste *post hoc* de Newman-Keuls indicou que o desempenho de ratos do grupo BL / CHQ-1 não diferiu do desempenho do grupo correspondente Ñ-OP / CHQ-1 ($p = 0,16$), apesar de existir uma tendência de os lesados apresentarem tempo em congelamento menor que os controles (Figura 24). No entanto, o teste *post hoc* revelou um efeito muito próximo do significativo quando comparamos o tempo em congelamento dos animais do grupo BL / CHQ-0,75 e do grupo Ñ-OP / CHQ-0,75 ($p = 0,06$), sugerindo um prejuízo de desempenho de ratos lesados no BL no teste de medo condicionado ao contexto quando o treino envolveu choques de 0,75mA (Figura 24). O teste de Newman-Keuls também mostrou uma tendência, apesar de não significativa, de ratos do grupo Ñ-OP / CHQ-0,75 exibirem tempo em congelamento menor que os Ñ-OP / CHQ-1 ($p = 0,08$). O mesmo ocorreu para os animais BL, porém neste caso, a diferença atingiu significância estatística ($p < 0,03$). Isto é, os animais do grupo BL / CHQ-0,75 exibiram tempo em congelamento significativamente menor que os ratos do grupo BL / CHQ-1, como mostra a Figura 24.

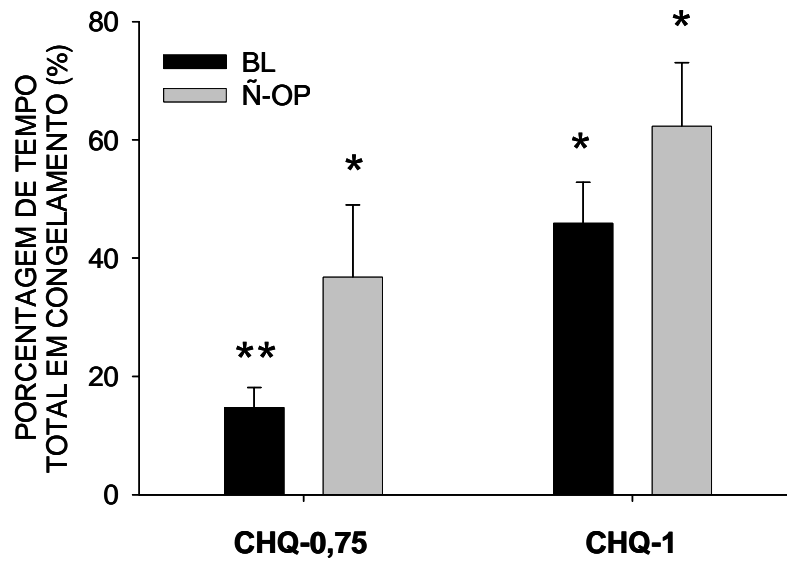


Figura 24. Porcentagem do tempo total em congelamento (média \pm erro padrão) no teste de medo condicionado ao contexto. **CHQ-0,75**, ratos que foram expostos a choques de 0,75mA durante o treino de condicionamento; **CHQ-1**, ratos que foram expostos a choques de 1mA durante o treino de condicionamento; **BL**, sujeitos lesados seletivamente no BL; **Ñ-OP**, sujeitos controles não-operados

Adicionalmente, o teste ANOVA revelou efeitos significantes quanto ao fator Bloco ($F_{9,198} = 13,55 - p < 0,0001$) e à interação Lesão x Bloco ($F_{9,198} = 3,98 - p < 0,0001$), mas não um efeito significativo na interação Treino x Bloco ($F_{9,198} = 0,44 - p = 0,91$). Mais especificamente, o teste *post hoc* de Newman-Keuls (Lesão x Treino x Bloco) mostrou que os tempos em congelamento exibidos por ratos BL / CHQ-1 e Ñ-OP / CHQ-1 não diferiram significativamente entre si ao longo de todos os dez blocos do teste de medo condicionado ao contexto (Figura 25). O teste indicou, ainda, que animais do grupo BL / CHQ-0,75 apresentaram tempo em congelamento significativamente menor que o do grupo correspondente Ñ-OP / CHQ-0,75, mais especificamente no terceiro, quarto e quinto blocos do teste, como mostra a Figura 25.

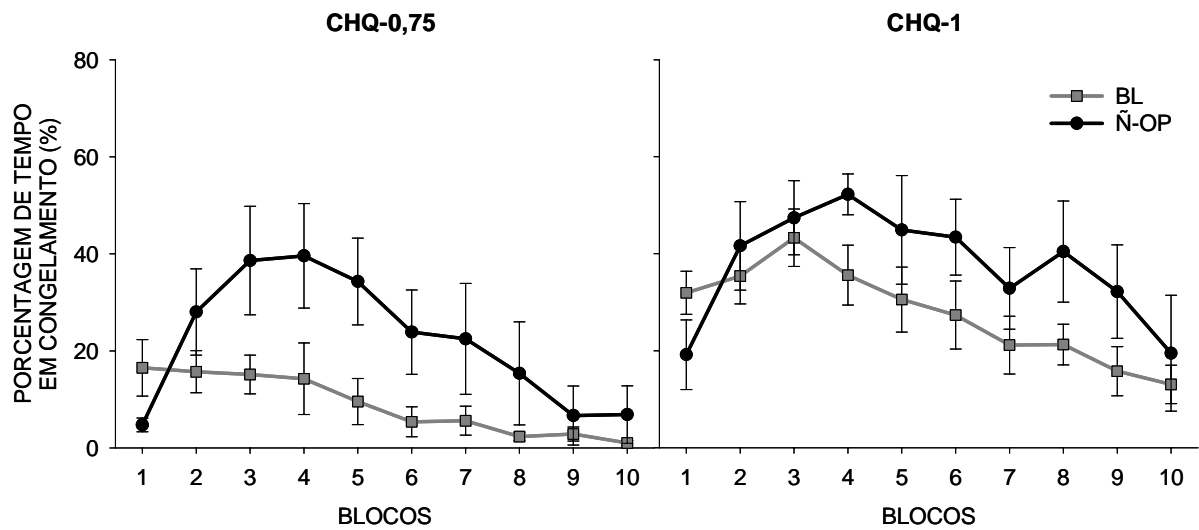


Figura 25. Porcentagem de tempo em congelamento (média \pm erro padrão) ao longo dos dez blocos de tempo (de 1 min cada) no teste de medo condicionado ao contexto. *CHQ-0,75*, ratos que foram expostos a choques de 0,75mA durante o treino de condicionamento; *CHQ-1*, ratos que foram expostos a choques de 1mA durante o treino de condicionamento; *BL*, sujeitos lesados seletivamente no BL; *Ñ-OP*, sujeitos controles não-operados.

Resumidamente, os resultados deste experimento indicaram que ratos com lesão seletiva do BL apresentam desempenho prejudicado no teste de medo condicionado ao contexto quando treinados com choques de 0,75mA, mas apresentam prejuízo não significativo em termos estatísticos, embora moderado, no mesmo teste quando treinados com choques mais intensos, de 1mA. Face à utilização de um grupo controle (Ñ-OP) não ideal na realização deste experimento, um novo lote de animais foi treinado na tarefa de condicionamento clássico aversivo envolvendo choques de 0,75mA com o objetivo de avaliar os efeitos da lesão seletiva do BL sobre essa situação comportamental, como será descrito no experimento seguinte.

O experimento seguinte, como mencionado anteriormente, terá por objetivo também avaliar o envolvimento do aprendizado de associações do tipo estímulo-reforço na aquisição do efeito de contraste antecipatório de incentivo, e os efeitos da lesão seletiva do BL sobre essa tarefa comportamental.

6. Experimento 4

EXPERIMENTO 4.

1) Avaliação do possível envolvimento de associações estímulo-reforço no efeito de contraste antecipatório de incentivo, em ratos normais e com lesão seletiva e excitotóxica do BL

2) Efeitos da lesão seletiva e excitotóxica do BL sobre o desempenho de ratos numa tarefa de condicionamento clássico aversivo ao som e ao contexto envolvendo choques de 0,75mA

Um dos objetivos deste conjunto de experimentos foi avaliar se a aquisição do efeito de contraste antecipatório de incentivo, em animais normais e em animais com lesão seletiva do BL, requer o estabelecimento de associações do tipo estímulo-reforço. Em outras palavras, objetivou-se avaliar se o efeito de contraste antecipatório dependeria do acesso da representação do valor de incentivo da segunda recompensa por meio de estímulos condicionados ambientais, a qual seria então comparada com o valor da solução corrente gerando a supressão do consumo da primeira solução na condição sacarina-sacarose. Portanto, de acordo com essa interpretação, se após um treino inicial na tarefa de contraste antecipatório, os animais forem submetidos a sessões de desvalorização da solução preferida (sacarose 32%) por meio do seu pareamento com um mal-estar (injeção de LiCl, i.p.) e subsequentemente, re-expostos à tarefa, é de se esperar que ratos normais exibam uma redução do efeito de contraste, já que essa solução apresentaria menor valor de incentivo.

Mais ainda, de acordo com a interpretação de que o BL participaria do processamento de informações contextuais (ou representações configuracionais), mas não de informações sobre estímulos discretos (ou representações elementais) no estabelecimento de associações estímulo-reforço, seria plausível hipotetizar que a lesão seletiva do BL resultaria no prejuízo de desempenho de ratos numa versão intra-sujeitos da tarefa de contraste antecipatório de incentivo envolvendo discriminação configuracional, mas não elemental, das condições de treino. O presente experimento também objetivou avaliar essa hipótese.

Além disso, frente aos resultados dos últimos experimentos quanto à tarefa de condicionamento clássico aversivo, decidiu-se reavaliar os efeitos da lesão seletiva do BL sobre o desempenho de ratos nos testes de medo condicionado ao som e ao contexto, quando treinados com cinco pareamentos de som e choque de **0,75mA**, replicando assim parte dos resultados críticos do Experimento 3. Dessa forma, após os procedimentos cirúrgicos, novos grupos de animais foram treinados na tarefa de contraste antecipatório e, posteriormente, submetidos aos testes de medo condicionado ao som e ao contexto.

6.1. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1.1. Cirurgias-piloto para o estabelecimento das coordenadas estereotáxicas para a produção de lesões seletivas e excitotóxicas do BL

Sujeitos

Foram utilizados no total 17 ratos machos Wistar provenientes do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina – USP, com idades variando entre três e cinco meses. Grupos de até três animais foram mantidos em gaiolas de plástico, em ambiente sob temperatura em torno de 22°C, e ciclo luz/escuro de 12 horas (luz das 7h00min às 19h00min).

Procedimento Cirúrgico

Os procedimentos básicos foram os mesmos já descritos nos outros experimentos, com exceção de que os animais foram anestesiados com uma mistura de xilasina e ketamina (ketamina: 75mg/kg de peso do animal; xilasina: 10mg/kg de peso do animal), ao invés de equitesina.

Foi utilizado ácido ibotênico, conforme já descrito anteriormente, para a produção das lesões excitotóxicas.

As coordenadas estereotáticas que apresentaram os melhores resultados nesse lote de animais foram as seguintes: **(1)** -3,0 AP; -5,1 ML; -7,6 DV, **(2)** -3,5 AP; -5,2 ML; -7,7 DV, **(3)** -3,9 AP; -5,2 ML; -7,8 DV, **(4)** -3,1 AP; +5,2 ML; -7,6 DV, **(5)** -3,5 AP; +5,3 ML; -7,7 DV, **(6)** -4,0 AP; +5,3 ML; -7,8 DV; com aplicação de 0,02 µl de ácido ibotênico (10 mg/ml) em cada ponto de injeção.

Processamento Histológico

Os procedimentos histológicos empregados foram os mesmos utilizados nos experimentos anteriores.

6.1.2. Cirurgias para a produção de lesões seletivas e excitotóxicas do BL

Sujeitos

Foram utilizados 54 ratos machos Wistar provenientes do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina – USP, com aproximadamente três meses de idade. Grupos de até três animais foram mantidos em gaiolas de plástico, em ambiente sob temperatura em torno de 22°C, e ciclo luz/escuro de 12 horas (luz das 7h00min às 19h00min).

Procedimento Cirúrgico

O procedimento cirúrgico anteriormente descrito para as cirurgias-piloto foi o mesmo utilizado nesta etapa. Foram empregadas as coordenadas estereotáticas que produziram as melhores lesões seletivas do BL nas cirurgias-piloto, descritas acima. Aplicou-se 0,02µl de ácido ibotênico (10 mg/ml) em cada ponto de injeção. Terminado o procedimento cirúrgico, os animais receberam injeção intra-muscular de ketoprofeno (anti-inflamatório; Ketofen®; 2mg/kg de massa corpórea; 12-12h por 48h).

Os animais controle-operados foram submetidos ao mesmo tratamento cirúrgico, porém receberam injeção de tampão fosfato-salina ao invés da neurotoxina.

Dos 54 ratos operados, 5 sujeitos morreram antes da conclusão de todas as tarefas comportamentais. Os 49 ratos restantes pertenceram a dois grupos distintos: 27 ao grupo dos lesados (BL), e 22 ao grupo dos controle-operados (SHAM).

6.1.3. Tarefa de Contraste Antecipatório de Incentivo Inter-Sujeitos

Privação Alimentar

A privação alimentar teve duração de 21 horas diárias, iniciou-se três dias antes do início do treino dos animais na tarefa de contraste antecipatório de incentivo e perdurou até o final do treinamento. Os animais tinham acesso livre ao alimento por um período de três horas depois de 30 minutos do término de cada sessão de treino.

Aparelho e Procedimento

O aparelho utilizado na tarefa de contraste antecipatório de incentivo foi o mesmo do Experimento 2 (ver Materiais e Métodos, Experimento 2). Além do já descrito anteriormente, o aparelho de treino foi equipado com um alto-falante no teto da caixa, que permitia a produção de sons com frequência e intensidade controladas por uma fonte geradora.

O treino na tarefa de contraste antecipatório iniciou-se 10 dias após a cirurgia de cada animal, e o procedimento básico de cada sessão foi o mesmo descrito no Experimento 2. Foram realizadas ao total 12 sessões de treino, uma por dia, nesta fase do teste.

Os animais foram divididos em dois grupos de acordo com a condição do treino: um grupo recebeu sacarina 0,15% como primeira e segunda soluções (grupo 15/15), e o outro grupo recebeu sacarina 0,15% como primeira solução e sacarose 32% como segunda solução (grupo 15/32). Note que a primeira solução oferecida aos animais era sempre sacarina 0,15%, independentemente do grupo do qual faziam parte. Portanto, foram submetidos ao treino um total de 4 grupos de animais, sendo eles: lesados no BL sob condição 15/15 (BL – 15/15; N = 13); lesados no BL sob condição 15/32 (BL – 15/32; N = 14); controle-operados sob condição

15/15 (SHAM – 15/15; N = 11) e controle-operados sob condição 15/32 (SHAM – 15/32; N = 11).

6.1.4. Tarefa de Contraste Antecipatório de Incentivo Intra-Sujeitos

6.1.4.1. Treino Inicial

Dois dias depois de concluído o treinamento na versão inter-sujeitos da tarefa de contraste antecipatório de incentivo, iniciou-se o treinamento dos mesmos animais na versão intra-sujeitos da tarefa.

Privação Alimentar

O esquema de privação alimentar manteve-se o mesmo da etapa de treino anterior.

Aparelho e Procedimento

O aparelho utilizado na tarefa de contraste antecipatório de incentivo intra-sujeitos e o procedimento básico de cada sessão foram os mesmos descritos para o treino anterior.

Os sujeitos foram expostos às duas condições experimentais ao longo do treino: sacarina 0,15% seguida por sacarina 0,15% (15/15) e sacarina 0,15% seguida por sacarose 32% (15/32), em dias alternados e sinalizados por pistas distintas. O primeiro dia de treino nesta situação consistiu na apresentação da mesma condição experimental (15/15 ou 15/32) a qual cada sujeito havia sido exposto no treino prévio de contraste inter-sujeitos.

Os animais foram divididos em dois grupos de acordo com o tipo de arranjo das pistas empregado para a sinalização das condições do treino: um grupo foi exposto a um conjunto de pistas que permitia uma discriminação elemental (grupo ELM), e um segundo grupo foi exposto a um conjunto de pistas que requeria uma discriminação configuracional (grupo CFG) das condições de treino. O “arranjo elemental” consistia da apresentação de um estímulo sonoro intermitente (750 Hz, 80 dB, pulsos de 100ms em intervalos de 100ms) ou da

introdução de paredes laterais pretas no aparelho de treino, sendo elas (som ou paredes laterais) devidamente contrabalanceadas dentro do grupo; ou seja, metade dos animais recebeu o estímulo sonoro como sinalizador da condição 15/15 e o estímulo visual como sinalizador da condição 15/32, e o inverso foi aplicado à outra metade dos animais. Já o “arranjo configuracional” compreendeu a apresentação do estímulo sonoro **ou** do estímulo visual como sinalizadora de uma das condições de treino e a apresentação **conjunta** dos dois estímulos como sinalizadora da outra condição. Da mesma forma, houve o contrabalanceamento adequado das pistas dentro do grupo, ou seja, para metade dos sujeitos as pistas isoladas sinalizavam a condição 15/15 e as pistas em conjunto sinalizavam a condição 15/32, e para a outra metade dos animais o inverso foi aplicado.

Assim, foram submetidos ao treino um total de quatro grupos de animais, sendo eles: lesados no BL sob “arranjo elemental” das pistas (BL/ELM; N = 13); lesados no BL sob “arranjo configuracional” das pistas (BL/CFG; N = 14); controle-operados sob “arranjo elemental” das pistas (SHAM/ELM; N = 10); controle-operados sob “arranjo configuracional” das pistas (SHAM/CFG; N = 12).

Foram realizadas 28 sessões no total, uma por dia, para os sujeitos expostos ao “arranjo elemental” (14 sessões para cada uma das condições de treino) e um total de 36 sessões para os ratos expostos ao “arranjo configuracional” das pistas para a discriminação das condições experimentais (18 sessões para cada uma das condições experimentais).

Ao término desse treinamento inicial, os sujeitos receberam mais 8 sessões de teste, após um intervalo de dois dias. Nessa segunda fase, as duas condições experimentais não mais foram arranjadas de forma alternada, mas foram apresentadas de maneira randômica, sendo cada uma ainda sinalizada pelas respectivas pistas discriminativas. A seqüência de apresentações das condições, nesta fase, foi a seguinte: (1) 15/32, (2) 15/32, (3) 15/15, (4) 15/15, (5) 15/15, (6) 15/32, (7) 15/32, (8) 15/15. Essa segunda fase do treino foi aplicada de maneira a assegurar que o desempenho dos animais estava sob o controle das pistas ambientais empregadas, e não da alternância diária de apresentação das duas condições experimentais.

6.1.4.2. Desvalorização seletiva da solução de sacarose

Imediatamente após o término do treino de contraste antecipatório intra-sujeitos, os animais foram submetidos a sessões de desvalorização seletiva da solução de sacarose.

Privação Alimentar

O esquema de privação alimentar continuou sendo o mesmo empregado durante as etapas anteriores do teste.

Aparelho e Procedimento

Esta etapa do treino comportamental foi realizada em gaiolas de plástico medindo 20 x 30 x 13cm, tendo como assoalho, barras de aço inoxidável conectadas a um fio terra. Ressalta-se aqui que essas gaiolas eram completamente distintas das caixas utilizadas no treinamento da tarefa de contraste antecipatório. Tínhamos disponíveis, no total, seis gaiolas, sendo possível o treino de seis ratos simultaneamente.

Um bebedouro contendo solução de sacarina 0,15% ou de sacarose 32% (dependendo da sessão de treino), era introduzido em cada gaiola no início de cada sessão e ficava disponível por 15 minutos contados a partir da primeira lambida do animal. Cada bebedouro conectava-se à interface de um microcomputador, o qual registrava o número de lambidas dadas pelos animais em cada bebedouro. Ao término de cada sessão, os animais retornavam para as suas respectivas gaiolas-viveiro.

Os animais foram divididos em dois grupos: um deles recebeu pareamentos da ingestão de sacarose com injeção de LiCl (0,3M; 0,4ml/100g de peso corpóreo; i.p.) – grupo LiCl – enquanto o outro grupo recebeu pareamentos da ingestão de sacarose com injeção de solução salina (0,4ml/100g de peso corpóreo; i.p.) – grupo SAL. Portanto, os animais foram divididos em um total de 8 grupos, sendo eles: lesados no BL sob “arranjo elemental” das pistas submetidos à desvalorização da sacarose (BL / ELM / LiCl; N = 6); lesados no BL sob “arranjo elemental” das pistas submetidos ao tratamento controle (BL / ELM / SAL; N = 7); lesados no BL sob “arranjo configuracional” das pistas submetidos à desvalorização da

sacarose (BL / CFG / LiCl; N = 6); lesados no BL sob “arranjo configuracional” das pistas submetidos ao tratamento controle (BL / CFG / SAL; N = 8); controle-operados sob “arranjo elemental” das pistas submetidos à desvalorização da sacarose (SHAM / ELM / LiCl; N = 5); controle-operados sob “arranjo elemental” das pistas submetidos ao tratamento controle (SHAM / ELM / SAL; N = 5); controle-operados sob “arranjo configuracional” das pistas submetidos à desvalorização da sacarose (SHAM / CFG / LiCl; N = 5); controle-operados sob “arranjo configuracional” das pistas submetidos ao tratamento controle (SHAM / CFG / SAL; N = 7).

No total foram realizadas seis sessões, sendo três sessões de apresentação da solução de sacarina 0,15% (nunca pareada a qualquer evento, independentemente do grupo), e outras três sessões de apresentação da solução de sacarose 32% (pareada imediatamente com LiCl ou salina, dependendo do grupo). As sessões de apresentação de sacarina ou de sacarose foram alternadas ao longo dos seis dias, sendo que a primeira sessão do treino consistiu na apresentação da solução de sacarina.

6.1.4.3. Teste na tarefa de contraste antecipatório de incentivo intra-sujeitos após a desvalorização da sacarose

Privação Alimentar

O esquema de privação alimentar continuou sendo o mesmo empregado durante as etapas anteriores.

Aparelho e Procedimento

O aparelho e o procedimento utilizados nesta etapa foram os mesmos empregados no treino intra-sujeitos da tarefa de contraste antecipatório de incentivo, descrito acima. Com a exceção de que foram realizadas somente duas sessões de teste, sendo a primeira compreendida pela apresentação da condição sacarina-sacarina (15/15), e a última pela

apresentação da condição sacarina-sacarose (15/32), devidamente sinalizadas pelas pistas discriminativas empregadas durante a fase de treino intra-sujeitos.

6.1.5. Condicionamento Clássico Aversivo

Treino de Condicionamento Clássico Aversivo

O aparelho e o procedimento utilizados neste experimento foi o mesmo empregado durante o Experimento 2 (ver Materiais e Métodos, Experimento 2), com a exceção de que os choques administrados foram de **0,75 mA**.

Dividimos os animais em dois grupos distintos: um grupo recebeu pareamento de som com choque (grupo CHQ), enquanto o outro grupo recebeu estimulação sonora na ausência de choque (grupo Ñ-CHQ). Como os animais também haviam sido divididos quanto ao tipo de cirurgia empregada (BL e SHAM), passaram a existir 4 grupos de animais: ratos lesados que receberam choque (grupo BL/CHQ; N = 17), ratos lesados que não receberam choque (grupo BL/Ñ-CHQ; N = 10), ratos controle-operados que receberam choque (grupo SHAM/CHQ; N = 14) e ratos controle-operados que não receberam choque (grupo SHAM/Ñ-CHQ; N = 8).

Teste de Medo Condicionado ao Contexto

O teste de medo condicionado ao contexto foi executado no mesmo aparelho utilizado para o treino do condicionamento aversivo (ver Materiais e Métodos, Experimento 2) e o procedimento foi o mesmo empregado no teste do Experimento 2.

A duração das respostas de congelamento foi medida durante o teste de medo condicionado ao contexto, e analisada em dez blocos de um minuto cada.

Teste de Medo Condicionado ao Som

O aparelho de teste de medo condicionado ao som foi o mesmo utilizado durante o Experimento 2 (ver Materiais e Métodos, Experimento 2) e o procedimento foi o mesmo

empregado no Experimento 2, com a exceção de que foi realizado 24 horas após o término do teste de medo condicionado ao contexto, e portanto, 48 horas após o treino do condicionamento aversivo.

A duração das respostas de congelamento foi medida durante o teste, e analisada posteriormente em doze blocos de tempo de um minuto cada.

6.1.6. Processamento Histológico

Ao término das tarefas comportamentais, os animais foram sacrificados e seus encéfalos processados histologicamente. O processamento histológico dos encéfalos dos animais utilizados foi o mesmo empregado no Experimento 1 (ver Materiais e Métodos, Experimento 1).

6.1.7. Análise Estatística

Os dados comportamentais referentes às tarefas de contraste antecipatório de incentivo e de condicionamento clássico aversivo foram analisados estatisticamente através do teste de Análise de Variância (ANOVA) para medidas repetidas pelo pacote STATISTICA. Os detalhes de cada análise serão descritos, a seguir, na seção dos Resultados.

6.2. RESULTADOS

6.2.1. Resultados Histológicos: Cirurgias-Piloto

A Figura 26 mostra fotomicrografias de uma lesão bilateral do BL, produzida com a aplicação do conjunto de coordenadas estereotáxicas que apresentou os melhores resultados nas cirurgias-piloto, através da injeção múltipla e tópica de ácido ibotênico (10mg/ml; 0,02 µl/sítio de injeção). Para efeitos comparativos, a Figura 4 (ver Resultados, Experimento 1)

mostra fotomicrografias de uma secção coronal do encéfalo de um rato normal que não foi submetido a qualquer intervenção cirúrgica.

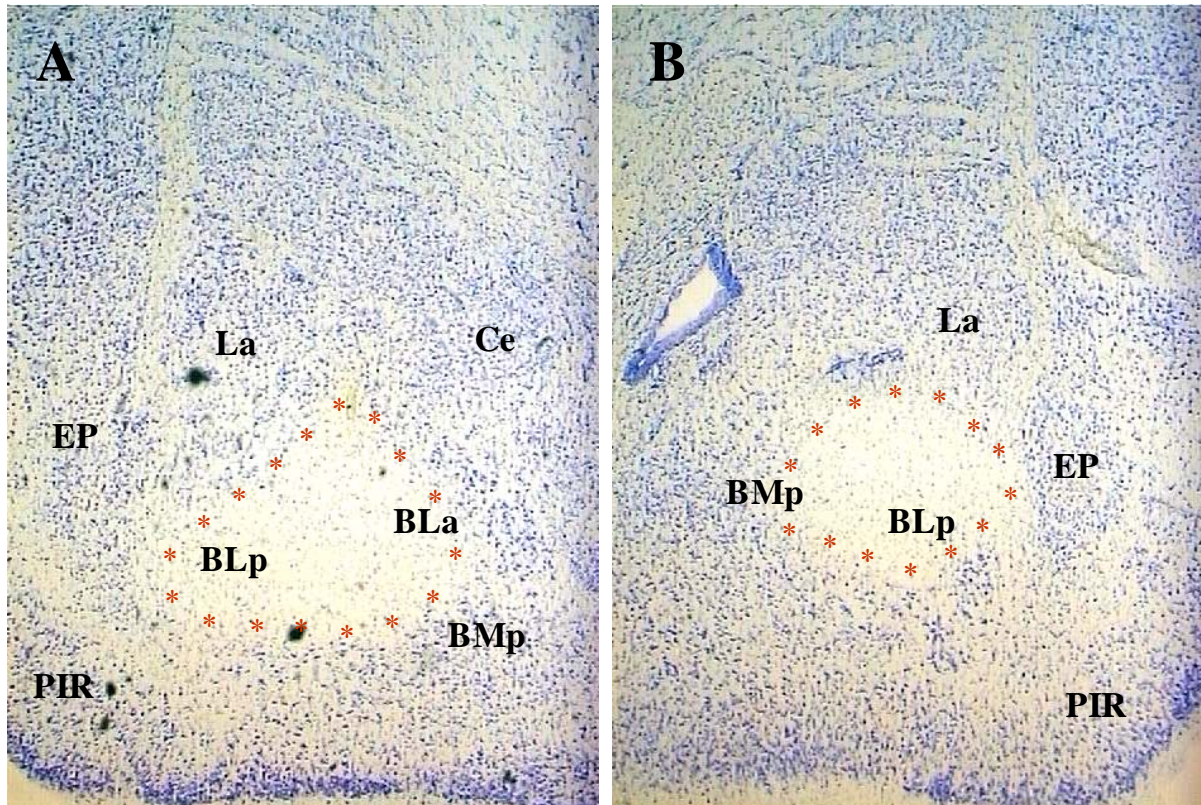


Figura 26. Fotomicrografias de secções coronais de encéfalo de rato no nível da amígdala (aumento de 40x), coradas com violeta de cresila. (A) e (B) indicam hemisfério direito e esquerdo, respectivamente, de um animal que apresentou a melhor lesão do BL numa cirurgia-piloto. A lesão (delimitada pelos asteriscos) atingiu o BL bilateralmente, e parte do núcleo basal acessório posterior. *BLa*, núcleo basal anterior; *BLp*, núcleo basal posterior; *BMp*, núcleo basal acessório posterior; *Ce*, núcleo central; *EP*, núcleo endopiriforme; *La*, núcleo lateral da amígdala e *PIR*, córtex piriforme.

6.2.2. Resultados Histológicos

A Figura 27 ilustra esquematicamente as dimensões das lesões observadas nos ratos com maiores e menores danos, incluídos neste experimento. Dos 27 ratos submetidos à cirurgia para a produção da lesão do BL, nove sujeitos não foram incluídos na análise dos dados comportamentais, por apresentarem lesões muito pequenas da porção anterior do BL (segundo critérios adotados por Swanson, 1992). Dos 18 ratos lesados incluídos na análise,

oito apresentaram lesão de, no mínimo, 70% da porção anterior do BL. Outros cinco ratos exibiram lesões menores, compreendendo no mínimo, cerca de 30% dessa região em um dos hemisférios, e praticamente toda a região no outro hemisfério. Os cinco ratos restantes incluídos na análise apresentaram lesão de, no mínimo, 30% da porção anterior do BL bilateralmente. A maioria dos sujeitos teve danificada parte da porção posterior do BL (região mais rostral), sendo a lesão bilateral em nove ratos e unilateral em oito ratos. Em alguns casos houve lesão de pequenas porções rostrais do LA (unilateralmente em quatro sujeitos e bilateralmente em três sujeitos). Além disso, três animais apresentaram pequenas lesões do núcleo endopiriforme e do córtex piriforme adjacente. Em nenhum caso houve lesão do núcleo central ou do núcleo basal acessório, ou de quaisquer dos núcleos restantes da amígdala.

6.2.3. Tarefa de Contraste Antecipatório de Incentivo Inter-sujeitos

Após a avaliação histológica das lesões, foram incluídos na análise dos dados comportamentais referentes ao contraste antecipatório de incentivo, um total de 18 sujeitos no grupo dos lesados (BL) e 22 sujeitos no grupo dos controle-operados (SHAM), sendo eles ainda divididos em dois grupos dependendo da condição de treino a qual foram submetidos (15/15 ou 15/32). Assim, os animais foram divididos em um total de quatro grupos, relacionados a seguir: BL – 15/15 (N = 10); BL – 15/32 (N = 8); SHAM – 15/15 (N = 11) e SHAM – 15/32 (N = 11).

Foi aplicada uma ANOVA de três vias para medidas repetidas, para a análise dos dados. Para efeito de análise, dividimos as 12 sessões de treino em cada condição experimental em quatro blocos de três sessões cada. Assim, foram tomadas como variáveis independentes: (1) o tipo de lesão (SHAM ou BL), (2) as condições experimentais (15/15 ou 15/32), e (3) os blocos de sessões de treino (quatro blocos no total para cada uma das condições; sendo considerado como medida repetida). A frequência de lambidas em cada solução durante a tarefa foi tomada como a variável dependente.

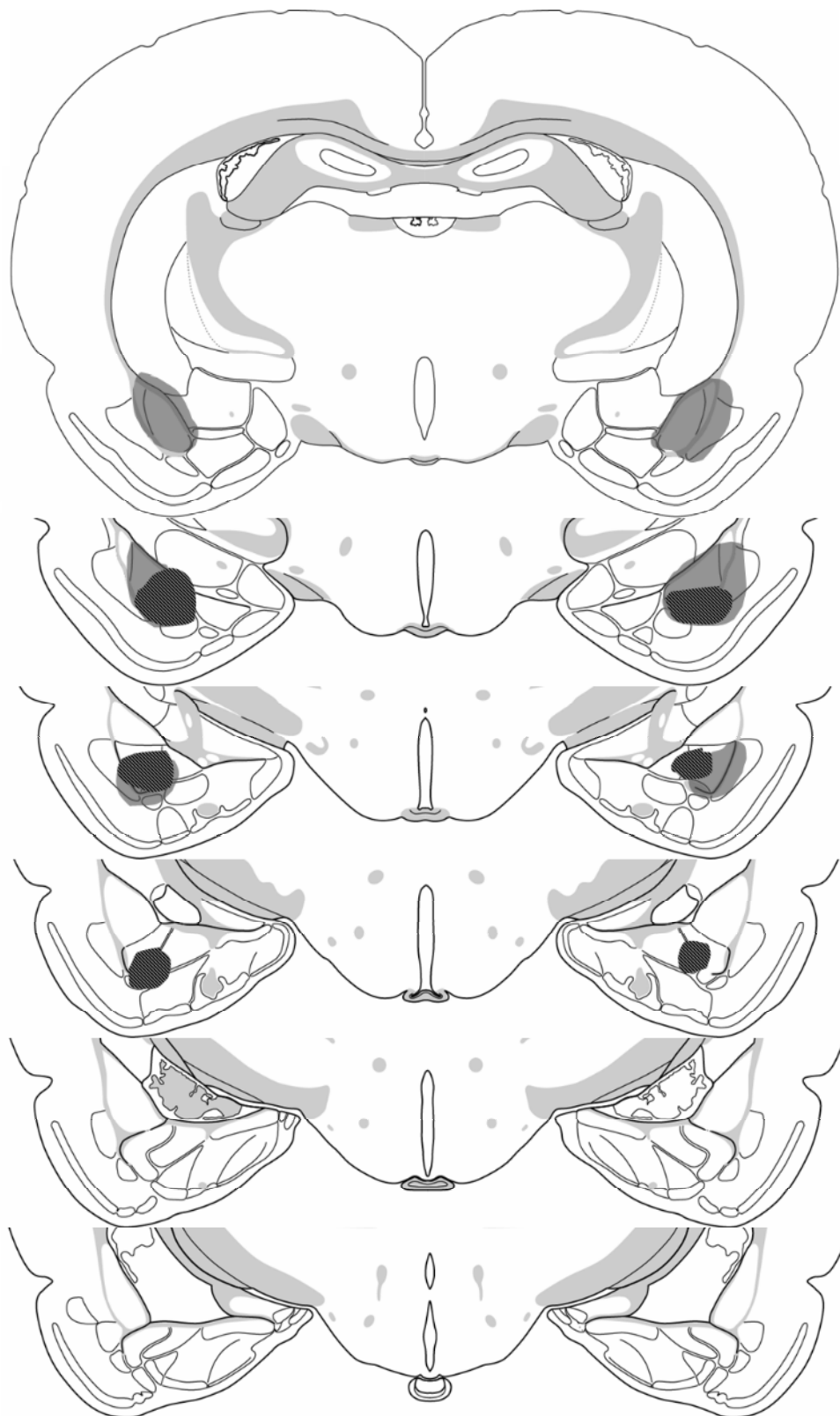


Figura 27. Representações de secções coronais no nível da amígdala ilustrando esquematicamente a abrangência das lesões mais extensas (preenchimento claro) e menos extensas (preenchimento escuro) dos animais incluídos na análise do Experimento 4. As legendas dos diferentes núcleos da amígdala e das áreas adjacentes são mostradas no Apêndice A (ver adiante).

Os resultados indicaram que a lesão seletiva do BL não interferiu no efeito de contraste antecipatório quando os ratos lesados foram treinados na versão inter-sujeitos da tarefa. Ou seja, ratos BL, como seus respectivos SHAM, apresentaram o consumo da primeira solução (sacarina 0,15%, independentemente da condição) diminuído quando a sacarose era oferecida como segunda solução, em comparação com a condição onde a segunda solução era também sacarina 0,15% (Figura 28).

Ao analisarmos os dados relativos à frequência de lambidas na primeira solução, a ANOVA, como esperado, revelou a existência de um efeito significativo do fator Condição ($F_{1,45} = 31,52 - p < 0,0001$) e da interação entre Condição e Bloco ($F_{3,135} = 28,56 - p < 0,0001$), indicando que independentemente da lesão, sujeitos expostos à condição 15/32 consumiram significativamente menos da primeira solução que aqueles submetidos à condição 15/15, evidenciando, então, o efeito de contraste.

Além disso, o teste estatístico revelou ausência de efeito significativo do fator Lesão ($F_{1,45} = 0,29 - p = 0,60$), da interação Lesão x Condição ($F_{1,45} = 0,001 - p = 0,98$), e da interação Lesão x Condição x Bloco ($F_{3,135} = 0,70 - p = 0,55$). A análise *post hoc* de Newman-Keuls (Lesão x Condição) indicou que os ratos do grupo BL e seus respectivos SHAM consumiram significativamente menos da primeira solução na condição 15/32 do que na condição 15/15 ($p < 0,001$). Ainda, o teste de Newman-Keuls mostrou que o consumo da primeira solução dos ratos BL não diferiu significativamente do de ratos SHAM, tanto na condição 15/15 como na condição 15/32. Os resultados indicaram, portanto, que o efeito de contraste foi semelhante entre ratos do grupo BL e do grupo SHAM, nessa versão inter-sujeitos da tarefa, como pode ser observado na Figura 28.

Além disso, o teste *post hoc* de Newman-Keuls (Lesão x Condição x Bloco) mostrou que, tanto para os animais BL quanto para os SHAM, o efeito de contraste apareceu já no segundo bloco do treino. E ainda, que o consumo da primeira solução de ratos do grupo BL não diferiu significativamente do de ratos do grupo SHAM em cada uma das condições de treino ao longo de todos os quatro blocos da tarefa de contraste (Figura 28).

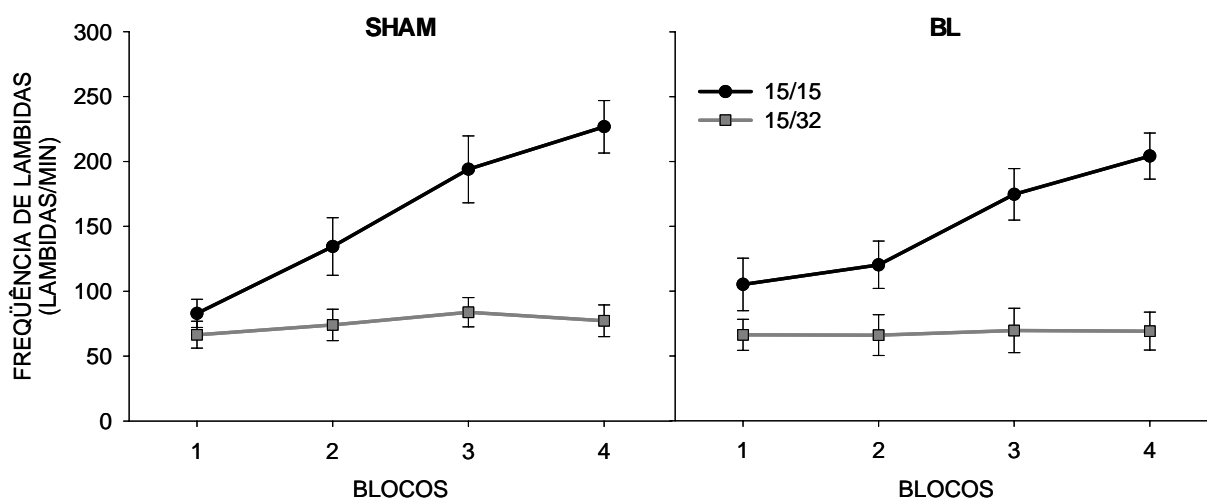


Figura 28. Frequência de lambidas (média \pm erro padrão) na primeira solução (sacarina 0,15%) durante os quatro blocos de sessões de treino da tarefa de contraste antecipatório de incentivo inter-sujeitos realizado por ratos lesados seletivamente no BL (*BL*) e por seus respectivos controle-operados (*SHAM*) sob as condições sacarina-sacarina (*15/15*) ou sacarina-sacarose (*15/32*).

Adicionalmente, os resultados referentes ao consumo da segunda solução (sacarina ou sacarose, dependendo da condição, 15/15 ou 15/32) indicaram que a lesão seletiva do BL pareceu não interferir sobre a atribuição de valor hedônico às duas soluções. Ou seja, ratos do grupo BL, como seus respectivos SHAM, apresentaram o consumo da solução de sacarose significativamente maior que o consumo da segunda solução de sacarina, como podemos observar na Figura 29.

A ANOVA, como esperado, revelou a existência de um efeito significativo do fator Condição ($F_{1,45} = 388,67 - p < 0,0001$) e da interação Condição x Bloco ($F_{3,135} = 3,98 - p < 0,001$), indicando que independentemente da lesões, sujeitos expostos à condição 15/32 consumiram mais da segunda solução que aqueles submetidos à condição 15/15.

O teste estatístico revelou ainda a ausência de efeito significativo do fator Lesão ($F_{1,45} = 2,09 - p = 0,16$), embora tenha ocorrido uma tendência de os animais do grupo BL apresentarem o consumo da segunda solução (independentemente da condição) diminuído em relação aos ratos SHAM.

Também não houve efeito significativo da interação Lesão x Condição ($F_{1,45} = 0,10 - p=0,75$), nem da interação Lesão x Condição x Bloco ($F_{3,135} = 0,20 - p=0,89$). Mais especificamente, o teste *post hoc* de Newman-Keuls (Lesão x Condição) indicou que os ratos BL e os SHAM não apresentaram diferenças significantes quanto aos consumos de sacarina ($p=0,43$) e de sacarose ($p=0,22$), quando apresentadas como segundas soluções, como mostra a Figura 29.

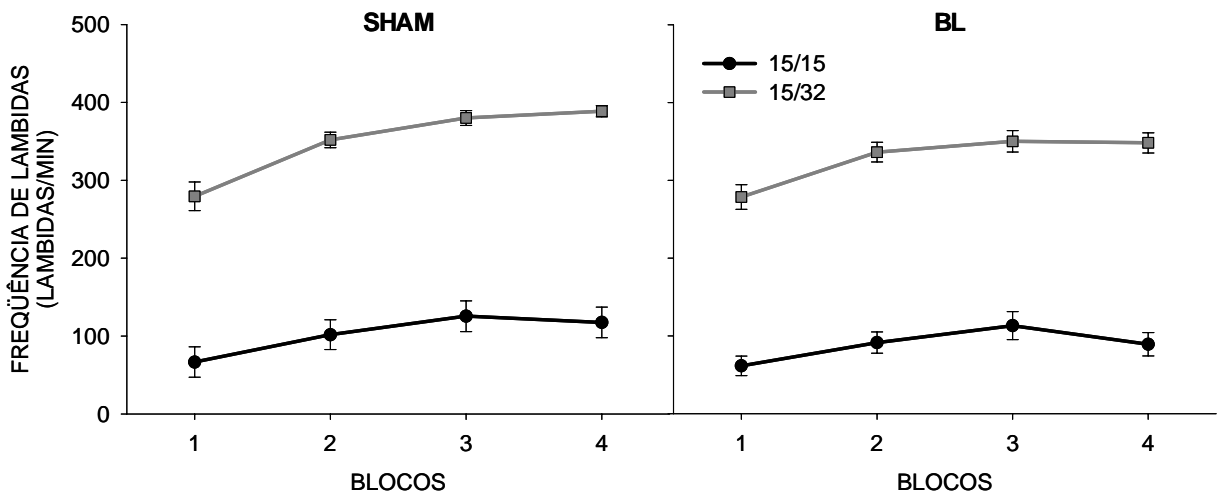


Figura 29. Frequência de lambidas (média \pm erro padrão) na segunda solução durante os quatro blocos de sessões de treino da tarefa de contraste antecipatório de incentivo inter-sujeitos realizado por ratos lesados seletivamente no BL (*BL*) e por seus respectivos controle-operados (*SHAM*) sob as condições sacarina-sacarina (*15/15*) ou sacarina-sacarose (*15/32*).

6.2.4. Tarefa de Contraste Antecipatório de Incentivo Intra-sujeitos

6.2.4.1. Fase 1: Treino inicial – apresentação das condições 15/15 e 15/32, associadas a uma discriminação elemental ou configuracional, em dias alternados

De acordo com a avaliação histológica das lesões, foram incluídos na análise dos dados comportamentais um total de 18 sujeitos no grupo dos lesados (BL) e 22 sujeitos no grupo dos controle-operados (SHAM), sendo eles ainda sub-divididos em dois grupos

dependendo do tipo de arranjo das pistas discriminativas ao qual foram expostos (elemental - ELM ou configuracional - CFG). Assim, os animais foram divididos em um total de quatro grupos, relacionados a seguir: BL/ELM (N = 6); BL/CFG (N = 12); SHAM/ELM (N = 12) e SHAM/CFG (N = 10).

Como já mencionado, para que os animais atingissem níveis assintóticos de desempenho, os treinos na tarefa de contraste antecipatório intra-sujeitos empregando o “arranjo elemental” ou o “arranjo configuracional” das pistas discriminativas envolveram números totais de sessões distintos: 28 sessões (14 para a condição 15/15 e a outra metade para a condição 15/32) para o treino com o “arranjo elemental” das pistas e 36 sessões (da mesma forma, metade para a condição 15/15 e outra metade para a condição 15/32) para o treino com o “arranjo configuracional”. Assim, os dois tipos de treino foram divididos em blocos de 5 sessões cada, com a finalidade de possibilitar uma comparação envolvendo a ANOVA para medidas repetidas, tendo Lesão e tipo de Pista como variáveis inter-sujeitos e Blocos de Sessões e Condição de Treino como variáveis intra-sujeitos. Para o treino com o “arranjo elemental” das pistas, cada um dos quatro primeiros blocos representaram as médias de três sessões e o último bloco, a média das duas últimas sessões de cada sujeito. Já para o treino com o “arranjo configuracional”, cada um dos três primeiros blocos representaram as médias de quatro sessões, e os dois blocos restantes as médias de três sessões de cada sujeito.

Os resultados indicaram que a lesão seletiva do BL não interferiu sobre o efeito de contraste na versão intra-sujeitos da tarefa de contraste antecipatório de incentivo, tanto quando empregamos o “arranjo elemental” das pistas para a discriminação das duas condições de treino (15/15 ou 15/32) quanto quando utilizamos o “arranjo configuracional” (Figura 30).

A ANOVA revelou, como esperado, um efeito significativo do fator Condição ($F_{1,36} = 32,84 - p < 0,0001$) e da interação entre Condição e Bloco ($F_{4,144} = 45,78 - p < 0,0001$), indicando que, independentemente da lesão e do tipo de arranjo das pistas empregado, os animais consumiram significativamente menos da primeira solução (sacarina) em dias que ocorreu sinalização da condição 15/32 do que em dias que houve sinalização da ocorrência da condição 15/15.

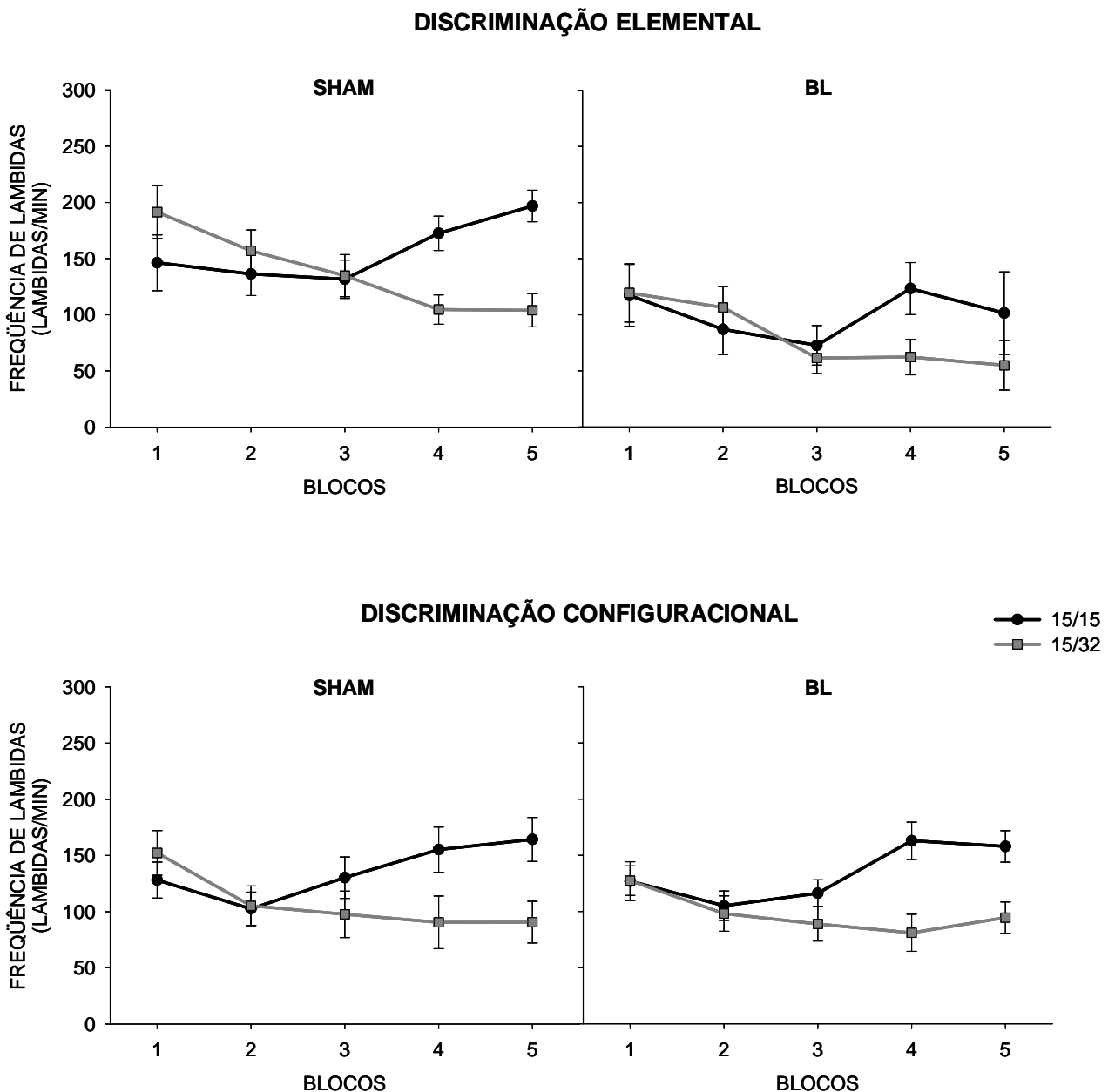


Figura 30. Frequência de lambidas (média \pm erro padrão) na primeira solução (sacarina 0,15%) durante os blocos de sessões de treino da primeira fase da tarefa de contraste antecipatório de incentivo intra-sujeitos realizado por ratos lesados seletivamente no BL (**BL**) e por seus respectivos controle-operados (**SHAM**) sob as condições sacarina-sacarina (**15/15**) ou sacarina-sacarose (**15/32**), ao empregarmos pistas discriminativas que possibilitaram uma discriminação elemental ou configuracional das diferentes condições experimentais.

A ANOVA revelou ainda a ausência de um efeito significativo na interação entre Lesão e Condição ($F_{1,36} = 0,20 - p=0,66$), mas a existência de um efeito significativo na interação Lesão x Condição x Bloco ($F_{4,144} = 3,15 - p<0,02$). Mais especificamente, o teste *post hoc* de

Newman-Keuls (Lesão x Condição) mostrou que o consumo da primeira solução na condição 15/32 foi significativamente menor do que na condição 15/15 para os ratos do grupo BL ($p < 0,0002$) e para os do grupo SHAM ($p < 0,0006$). Esses resultados sugerem, portanto, que ratos lesados seletivamente no BL, como seus SHAM, adquiriram o efeito de contraste antecipatório, independentemente do tipo de arranjo das pistas empregado durante o treino (Figura 30). Adicionalmente, o teste *post hoc* revelou que o consumo da primeira solução dos animais do grupo BL foi significativamente menor que dos seus respectivos SHAM nas duas condições de treino (15/15 – $p < 0,0002$ e 15/32 – $p < 0,0001$). Esse último resultado também pôde ser evidenciado pelo efeito significativo do fator Lesão ($F_{1,36} = 4,02$ – $p < 0,05$) revelado pelo teste ANOVA.

Além disso, não houve efeito significativo do fator Pista ($F_{1,36} = 0,0001$ – $p = 0,99$) nem da interação entre Pista e Condição ($F_{1,36} = 2,24$ – $p = 0,14$). O teste *post hoc* de Newman-Keuls (Pista x Condição) mostrou que o efeito de contraste ocorreu, independentemente da lesão, tanto para sujeitos expostos ao “arranjo elemental” (ELM – $p < 0,01$) quanto para sujeitos expostos ao “arranjo configuracional” (CFG – $p < 0,001$) (Figura 30). O teste *post hoc* revelou também que ratos do grupo ELM não apresentaram diferenças significantes quanto ao consumo da primeira solução em relação aos ratos do grupo CFG, tanto na condição 15/15 ($p = 0,31$) como na condição 15/32 ($p = 0,27$).

Também não houve efeitos significantes na interação Lesão x Pista ($F_{1,36} = 2,67$ – $p = 0,11$) e na interação Lesão x Pista x Condição ($F_{1,36} = 0,11$ – $p = 0,74$). O teste *post hoc* de Newman-Keuls (Lesão x Pista x Condição) revelou que o consumo da primeira solução na condição 15/32 foi menor que na condição 15/15 para os ratos dos grupos BL/CFG ($p < 0,001$), SHAM/CFG ($p < 0,007$) SHAM/ELM ($p < 0,05$). No entanto, esse efeito foi quase significativo para os ratos do grupo BL/ELM ($p = 0,08$). É importante notar que essas análises levam em consideração a média de **todas** as sessões de treino, e portanto, a ausência da diferença significativa entre os consumos da primeira solução nas duas condições não necessariamente revela que não houve aquisição do efeito de contraste; para isso, é necessário analisar os dados das últimas sessões de treino. O teste de Newman-Keuls (Lesão x Condição x Pista x

Bloco) revelou que, para todos os quatro sub-grupos de ratos BL e SHAM expostos aos arranjos ELM e CFG, o consumo da primeira solução na condição 15/32 foi significativamente menor que na condição 15/15 ($p < 0,01$) no último bloco do treino, sugerindo que ratos lesados no BL e seus respectivos SHAM adquiriram o efeito de contraste antecipatório de incentivo, numa versão intra-sujeitos, quando os arranjos elemental e configuracional das pistas foram empregados para a discriminação das condições de treino (Figura 30).

Além disso, os resultados referentes ao consumo da segunda solução (sacarina ou sacarose, dependendo da condição, 15/15 ou 15/32) indicaram que a lesão seletiva do BL pareceu não interferir sobre a preferência da solução de sacarose em relação à sacarina, durante a versão intra-sujeitos da tarefa de contraste antecipatório de incentivo, quando empregou-se um arranjo elemental ou configuracional das pistas para a discriminação das condições experimentais (Figura 31). Isto é, ratos do grupo BL, assim como seus SHAM, apresentaram o consumo da solução de sacarose significativamente maior que o consumo da solução de sacarina, na situação de discriminação elemental ou configuracional das condições de treino, como mostra a Figura 31.

A ANOVA, como esperado, revelou a existência de efeito significativo do fator Condição ($F_{1,36} = 1154,8 - p < 0,0001$), indicando que independentemente da lesão e do arranjo das pistas empregado, animais sob a condição 15/32 consumiram mais da segunda solução que quando submetidos à condição 15/15 (Figura 31).

A ANOVA também exibiu um efeito significativo em relação à Lesão ($F_{1,36} = 4,20 - p < 0,05$), indicando que ratos BL consumiram menos da segunda solução que os SHAM. O teste estatístico ainda revelou a existência de um efeito quase significativo quanto à interação entre Lesão e Condição ($F_{1,36} = 3,80 - p = 0,06$), mas a ausência de um efeito significativo da interação Lesão x Condição x Bloco ($F_{4,144} = 0,50 - p = 0,73$). Mais especificamente, o teste *post hoc* de Newman-Keuls (Lesão x Condição) indicou que, para os ratos do grupo BL e para os seus SHAM, o consumo da segunda solução de sacarose foi significativamente maior que o de sacarina ($p < 0,0001$), independentemente do tipo de arranjo das pistas empregado. O teste *post hoc* ainda mostrou que os ratos BL apresentaram o consumo da segunda solução de

sacarina diminuído em relação aos seus SHAM ($p < 0,003$), mas o mesmo não ocorreu para o consumo da solução de sacarose ($p = 0,78$).

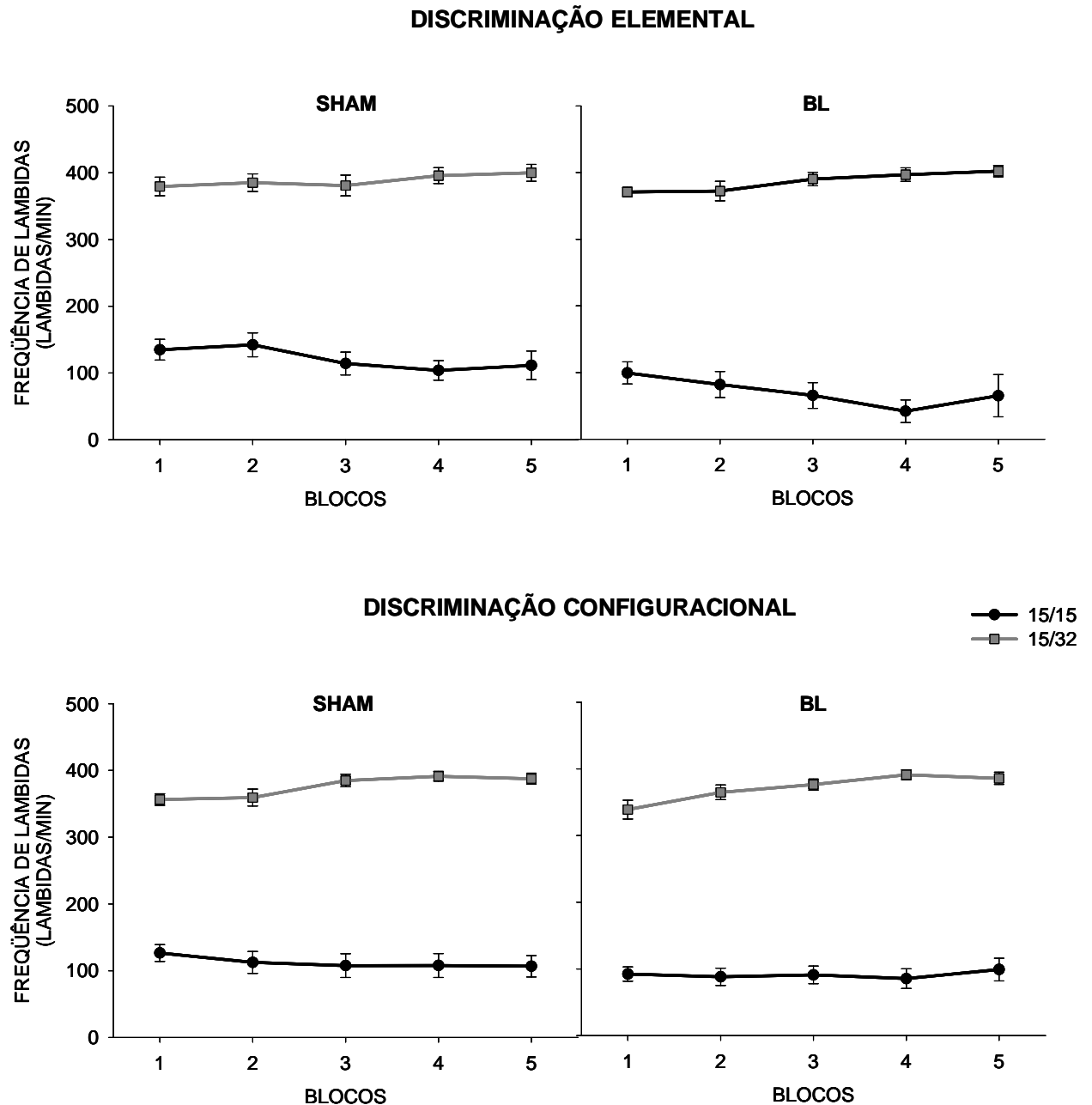


Figura 31. Freqüência de lambidas (média \pm erro padrão) na segunda solução (sacarina 0,15%) durante os blocos de sessões de treino da primeira fase da tarefa de contraste antecipatório de incentivo intra-sujeitos realizado por ratos lesados seletivamente no BL (*BL*) e por seus respectivos controle-operados (*SHAM*) sob as condições sacarina-sacarina (15/15) ou sacarina-sacarose (15/32), ao empregarmos pistas discriminativas que possibilitaram uma discriminação elemental ou configuracional das diferentes condições experimentais.

Além disso, a ANOVA não revelou efeito significativo de Pista ($F_{1,36} = 0,20 - p=0,68$), da interação entre Pista e Condição ($F_{1,36} = 1,40 - p=0,25$), nem da interação Pista x Condição x Bloco ($F_{4,144} = 0,70 - p=0,60$). O teste *post hoc* de Newman-Keuls (Pista x Condição) mostrou que o consumo da segunda solução de sacarose foi significativamente maior que o de sacarina tanto para os ratos do grupo ELM ($p<0,0001$) quanto do grupo CFG ($p<0,0001$), independentemente da lesão. Ainda, o teste *post hoc* indicou que o consumo da segunda solução de sacarina de ratos expostos ao arranjo ELM não diferiu significativamente do de ratos que receberam o arranjo CFG ($p=0,62$), e que o mesmo ocorreu para o consumo da solução de sacarose ($p=0,24$).

Também não houve efeito significativo na interação entre Lesão e Pista ($F_{1,36} = 0,50 - p=0,48$), na interação Lesão x Pista x Bloco ($F_{4,144} = 0,80 - p=0,53$), nem na interação Lesão x Pista x Condição ($F_{1,36} = 1,00 - p=0,33$). O teste *post hoc* de Newman-Keuls (Lesão x Pista x Condição) mostrou que o consumo da segunda solução de sacarose foi significativamente maior que o de sacarina para todos os grupos de ratos BL e SHAM submetidos aos diferentes tipos de arranjos das pistas ($p<0,0001$), como mostra a Figura 31. Além disso, o teste *post hoc* revelou que o consumo da segunda solução de sacarose não diferiu entre BL e SHAM quando a discriminação das condições de treino ocorreu tanto por um arranjo ELM ($p=0,91$) quanto por um arranjo CFG das pistas ($p=0,79$) (Figura 31). No entanto, o teste mostrou que o consumo da segunda solução de sacarina foi similar entre ratos BL e SHAM quando foram expostos ao arranjo CFG ($p=0,22$), mas foi menor para os lesados no BL quando a sinalização ocorreu pelo arranjo ELM ($p<0,02$) (Figura 31).

6.2.4.2. Fase 2: Treino inicial - apresentação das condições 15/15 e 15/32, associadas a uma discriminação elemental ou configuracional, em dias randomizados

Os mesmos parâmetros de análise empregados no teste estatístico da Fase 1 do treino inicial de contraste antecipatório de incentivo intra-sujeitos (ver seção anterior) foram utilizados para a análise dos dados comportamentais referentes a esta segunda fase do treino.

Ou seja, foi realizado um teste ANOVA de quatro vias para medidas repetidas tendo Lesão (BL ou SHAM) e tipo de Pista (ELM ou CFG) como variáveis independentes inter-sujeitos, e Condição (15/15 ou 15/32) e Sessão (quatro sessões para cada condição) como variáveis independentes intra-sujeitos. A frequência de lambidas nas soluções foi tomada como a variável dependente. Os resultados são mostrados nas Figuras 32, 33 e 34.

Quando analisamos os dados referentes à frequência de lambidas na primeira solução, o teste ANOVA, como esperado, revelou um efeito significativo do fator Condição ($F_{1,36} = 27,70 - p < 0,0001$), indicando que, independentemente da lesão e do tipo de arranjo das pistas empregado, os animais consumiram significativamente menos da primeira solução (sacarina) em dias que ocorreu sinalização da condição 15/32 do que em dias que houve sinalização da ocorrência da condição 15/15 (Figura 32).

O teste ANOVA também revelou a existência de um efeito muito próximo do significativo do fator Lesão ($F_{1,36} = 3,60 - p = 0,06$), indicando que ratos do grupo BL consumiram menos da primeira solução do que os do grupo SHAM, independentemente da condição de treino e do tipo de arranjo das pistas empregado. A ANOVA ainda revelou a ausência de um efeito significativo na interação entre Lesão e Condição ($F_{1,36} = 0,002 - p = 0,96$) e na interação Lesão x Condição x Sessão ($F_{4,144} = 1,36 - p = 0,26$). Mais especificamente, o teste *post hoc* de Newman-Keuls (Lesão x Condição) mostrou que o consumo da primeira solução na condição 15/32 foi significativamente menor do que na condição 15/15 para os ratos do grupo BL ($p < 0,0005$) e do grupo SHAM ($p < 0,0006$), independentemente do tipo de pista empregada (Figura 32). O teste *post hoc* ainda indicou que os ratos BL consumiram menos da primeira solução, nas duas condições de treino, que os animais SHAM ($p < 0,0002$), independentemente do tipo de arranjo da pistas empregado.

Além disso, a ANOVA revelou a ausência de um efeito significativo do fator Pista ($F_{1,36} = 0,23 - p = 0,63$) e da interação entre Pista e Condição ($F_{1,36} = 2,14 - p = 0,15$). O teste *post hoc* de Newman-Keuls mostrou que o consumo da primeira solução na condição 15/32 foi significativamente menor que na condição 15/15 para os ratos do grupo ELM ($p < 0,0001$) e do grupo CFG ($p > 0,02$), independentemente da lesão (Figura 32).

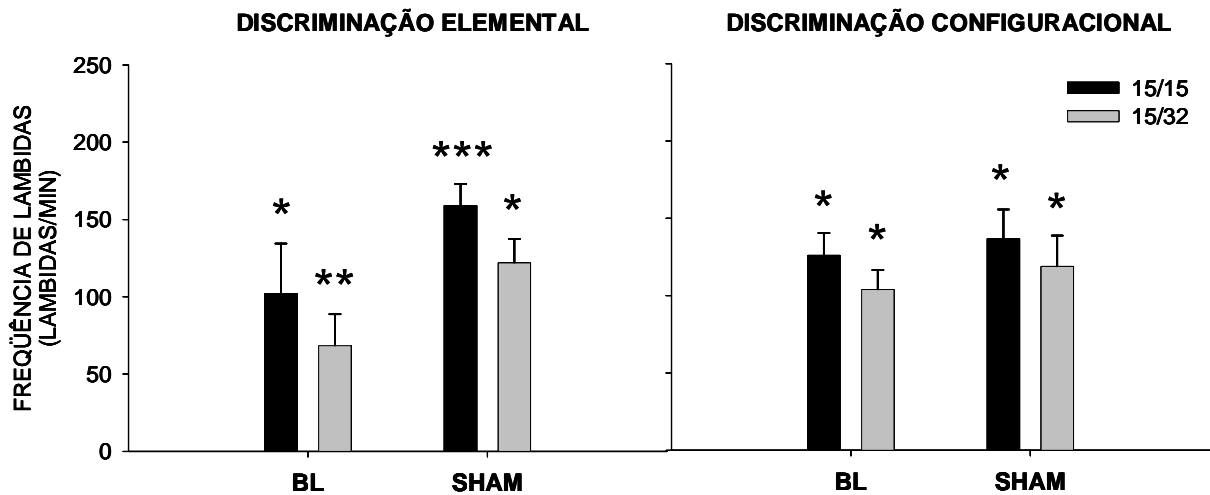


Figura 32. Freqüência de lambidas (média \pm erro padrão) na primeira solução (sacarina 0,15%) durante a segunda fase da tarefa de contraste antecipatório de incentivo intra-sujeitos (dias randomizados) realizado por ratos lesados seletivamente no BL (*BL*) e por seus controle-operados (*SHAM*) sob as condições sacarina-sacarina (*15/15*) ou sacarina-sacarose (*15/32*), ao empregarmos pistas discriminativas que possibilitaram uma discriminação elemental ou configuracional das diferentes condições experimentais.

Além disso, a ANOVA revelou ausência de um efeito significativo na interação entre Lesão e Pista ($F_{1,36} = 1,40 - p=0,24$) e na interação Lesão x Condição x Pista ($F_{1,36} = 0,13 - p=0,72$). O teste *post hoc* de Newman-Keuls mostrou que o consumo da primeira solução na condição 15/32 foi significativamente menor que na condição 15/15 para os ratos BL ($p<0,002$) e SHAM ($p<0,006$) que receberam o arranjo ELM, mas que isso não ocorreu para nenhum dos grupos que recebeu o arranjo CFG (BL – $p=0,17$ e SHAM – $p=0,34$), como pode ser observado na Figura 32.

Portanto, os resultados indicaram que ratos do grupo BL que receberam o “arranjo elemental” das pistas discriminativas e seus respectivos SHAM apresentaram o efeito de contraste antecipatório de incentivo nesta fase da tarefa de contraste intra-sujeitos, onde as condições de treino foram apresentadas em dias randomizados, e não mais em dias alternados, mas ainda sinalizadas pelas pistas discriminativas. Ademais, apesar de os testes estatísticos terem sido sensíveis à ocorrência do efeito de contraste antecipatório, nessa segunda fase do treino, ao analisarmos os dados do consumo da primeira solução de **todos** os animais que

receberam sinalização pelo “arranjo configuracional” das pistas (independentemente da lesão – Efeito de Pista x Condição), os mesmos testes revelaram a ausência de um efeito significativo de contraste antecipatório quando os dados de ratos BL e SHAM, expostos também ao arranjo configuracional, foram analisados separadamente (Efeito de Lesão x Pista x Condição).

A ANOVA também detectou a existência de um efeito significativo do fator Sessão ($F_{3,108} = 8,50 - p < 0,0001$) e da interação entre Condição e Sessão ($F_{3,108} = 3,04 - p < 0,03$). O teste *post hoc* de Newman-Keuls indicou que o consumo da primeira solução na condição 15/32 não se alterou ao longo das quatro sessões de treino nesta fase da tarefa. No entanto, na condição 15/15, o consumo da primeira solução pareceu se alterar em função da seqüência de apresentação das sessões de treino. Lembrando que a seqüência de apresentação das condições nesta fase da tarefa foi: 15/32 – 15/32 – **15/15** – **15/15** – **15/15** – 15/32 – 15/32 – **15/15**, detectou-se diferenças significantes entre os consumos da (1) primeira e terceira, (2) segunda e terceira e da (3) terceira e quarta sessões da condição 15/15 ($p < 0,01$), mas não entre (1) a primeira e a segunda, (2) a primeira e a quarta e (3) a segunda e a quarta sessões da condição 15/15, como podemos visualizar na Figura 33. Ou seja, o consumo da primeira solução na condição 15/15 tendeu a aumentar quando essa condição foi apresentada em dias consecutivos, mas voltou a um nível mais baixo depois da subsequente experiência com a condição 15/32. Além disso, o teste também revelou que quando comparamos as quatro sessões de treino na condição 15/15 com as outras quatro sessões na condição 15/32, individualmente, o efeito significativo de contraste antecipatório não apareceu sempre, ou seja, foi somente na segunda e na terceira sessões da condição 15/15 que o consumo da primeira solução se mostrou significativamente maior que o de quaisquer das quatro sessões da condição 15/32. As análises de Newman-Keuls (Lesão x Condição x Sessão, e Pista x Condição x Sessão) também mostraram que os ratos dos grupos BL e SHAM apresentaram igualmente esse padrão de desempenho, assim como os ratos expostos à discriminação elemental ou configuracional das condições de treino.

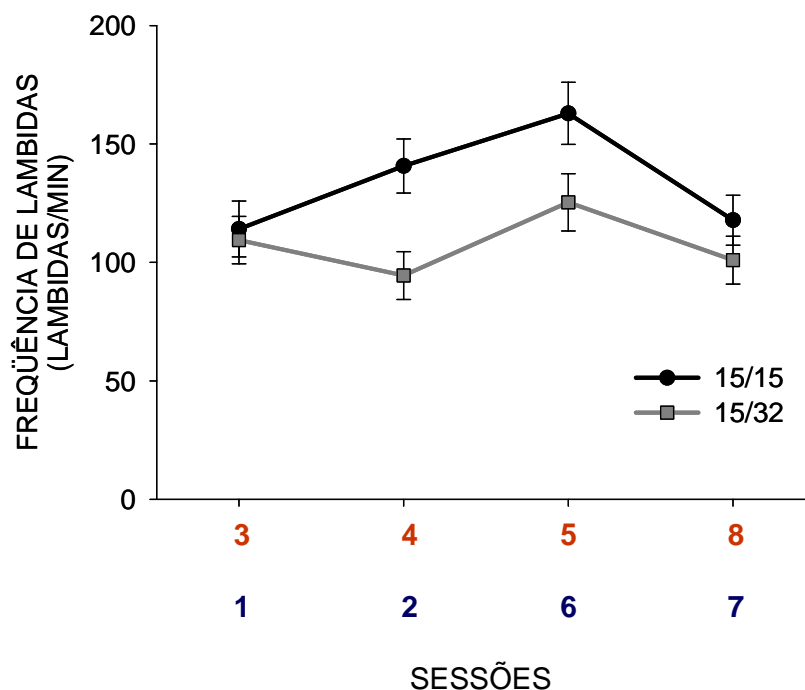


Figura 33. Frequência de lambidas (média \pm erro padrão) na primeira solução (sacarina 0,15%) durante a segunda fase da tarefa de contraste antecipatório de incentivo intra-sujeitos (dias randomizados) de todos os sujeitos, sob as condições sacarina-sacarina (15/15) ou sacarina-sacarose (15/32) ao longo das sessões de treino. As sessões em vermelho indicam os dias de apresentação da condição 15/15, e as em azul indicam os dias de apresentação da condição 15/32

Em relação ao consumo da segunda solução durante a segunda fase do treino de contraste antecipatório intra-sujeitos, a ANOVA revelou um efeito significativo quanto ao fator Condição ($F_{1,36} = 678,44 - p < 0,0001$), indicando que independentemente da lesão e do arranjo das pistas empregado, animais expostos à condição 15/32 consumiram mais da segunda solução do que aqueles submetidos à condição 15/15 (Figura 34).

Não houve um efeito significativo do fator Lesão ($F_{1,36} = 3,05 - p = 0,09$), embora tenha existido uma tendência dos ratos do grupo BL apresentarem o consumo da segunda solução diminuído em comparação com os SHAM, independentemente da condição de treino e do tipo de arranjo das pistas empregado. A ANOVA ainda revelou a existência de um efeito muito

próximo do significativo na interação entre Lesão e Condição ($F_{1,36} = 3,68 - p=0,06$); o teste *post hoc* de Newman-Keuls (Lesão x Condição) mostrou que, tanto para os ratos BL como para os SHAM, o consumo da segunda solução de sacarose foi significativamente maior que o de sacarina ($p<0,0001$), independentemente do tipo de arranjo das pistas empregado (Figura 34). O teste *post hoc* também indicou que o consumo da segunda solução de sacarina de ratos BL foi significativamente menor que o dos SHAM ($p<0,01$), mas não revelou qualquer diferença significativa quanto ao consumo da solução de sacarose ($p=0,91$), independentemente do tipo de arranjo das pistas empregado.

Além disso, a ANOVA não exibiu efeito significativo do fator Pista ($F_{1,36} = 0,02 - p=0,89$), nem da interação entre Pista e Condição ($F_{1,36} = 0,01 - p=0,91$). O teste *post hoc* de Newman-Keuls (Pista x Condição) revelou que o consumo da segunda solução de sacarose foi significativamente maior que o de sacarina tanto para os ratos do grupo ELM quanto para os ratos do grupo CFG ($p<0,0001$), independentemente da lesão. O teste *post hoc* ainda mostrou que o consumo das segundas soluções, tanto de sacarina ($p=0,98$) quanto de sacarose ($p=0,86$), não atingiu diferença estatística entre sujeitos do grupo ELM ou CFG (Figura 34).

Além disso, a ANOVA revelou ausência de efeito significativo na interação Lesão x Condição x Pista ($F_{1,36} = 1,32 - p=0,25$). E o teste de Newman-Keuls mostrou que o consumo da segunda solução de sacarose foi significativamente maior que o de sacarina para os grupos de ratos BL e SHAM submetidos aos dois tipos de arranjos das pistas ($p<0,0001$), como mostra a Figura 34. O teste *post hoc* ainda revelou que o consumo da segunda solução de sacarose não diferiu significativamente entre ratos BL e SHAM quando a sinalização se deu pelo arranjo ELM ($p=0,94$) ou pelo arranjo CFG ($p=0,87$) (Figura 34). Porém, mostrou que o consumo da segunda solução de sacarina não diferiu entre ratos BL e SHAM quando a sinalização ocorreu pelo arranjo CFG ($p=0,78$), mas foi menor para os BL quando a sinalização ocorreu pelo arranjo ELM ($p<0,01$), como mostra a Figura 34.

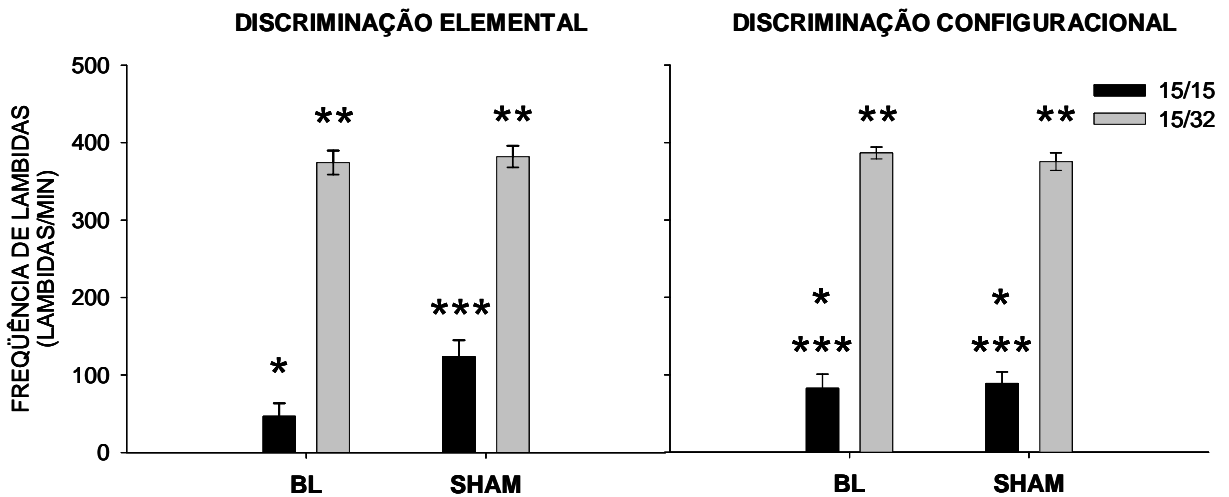


Figura 34. Freqüência de lambidas (média \pm erro padrão) na segunda solução (sacarina 0,15% ou sacarose 32%, dependendo da condição) durante a segunda fase da tarefa de contraste antecipatório de incentivo intra-sujeitos (dias randomizados) realizado por ratos lesados seletivamente no BL (*BL*) e por seus controle-operados (*SHAM*) sob as condições sacarina-sacarina (15/15) ou sacarina-sacarose (15/32), ao empregarmos pistas discriminativas que possibilitaram uma discriminação elemental ou configuracional das diferentes condições experimentais.

6.2.4.3. Desvalorização seletiva da solução de sacarose

Como já mencionado, após a avaliação histológica das lesões, foram incluídos na análise dos dados comportamentais um total de 18 sujeitos no grupo dos lesados (BL) e 22 sujeitos no grupo dos controle-operados (SHAM), sendo eles ainda divididos em dois grupos dependendo do tipo de arranjo das pistas discriminativas ao qual foram expostos (elemental - ELM ou configuracional - CFG), e ainda em outros dois grupos quanto ao tipo de tratamento na fase de desvalorização seletiva da sacarose ao qual foram submetidos (grupo com desvalorização - LiCl, ou grupo controle - SAL). Assim, os animais foram divididos em um total de oito grupos, relacionados a seguir: BL / ELM / LiCl (N = 3); BL / ELM / SAL (N = 3); BL / CFG / LiCl (N = 6); BL / CFG / SAL (N = 6); SHAM / ELM / LiCl (N = 5); SHAM / ELM / SAL (N = 5); SHAM / CFG / LiCl (N = 5) e SHAM / CFG / SAL (N = 7).

Foi realizado uma ANOVA de cinco vias para medidas repetidas tendo Lesão (BL ou SHAM), tipo de Pista (ELM ou CFG) e tipo de Tratamento (LiCl ou SAL) como variáveis independentes inter-sujeitos, e tipo de Solução (sacarina ou sacarose) e Sessão (três sessões

para cada solução) como variáveis independentes intra-sujeitos. A frequência de lambidas nas soluções foi tomada como a variável dependente.

A ANOVA revelou um efeito significativo quanto ao fator Lesão ($F_{1,32} = 5,09 - p < 0,03$), indicando que o consumo de ratos do grupo BL foi significativamente menor que o de ratos do grupo SHAM, independentemente dos fatores Solução, Pista e Tratamento (Figuras 35 e 36).

O teste estatístico, como esperado, também exibiu um efeito significativo do fator Tratamento ($F_{1,32} = 17,54 - p < 0,001$). Ou seja, ratos do grupo LiCl consumiram significativamente menos que os animais do grupo SAL, independentemente do fator Solução. Além disso, a ANOVA também revelou a existência de um efeito significativo do fator Solução ($F_{1,32} = 337,95 - p < 0,0001$), indicando que o consumo da solução de sacarose foi significativamente maior que o de sacarina. Também houve efeito significativo na interação entre Tratamento e Solução ($F_{1,32} = 45,48 - p < 0,0001$), e o teste *post hoc* de Newman-Keuls indicou que o consumo médio de sacarose foi maior que o de sacarina para ratos do grupo LiCl ($p < 0,0001$) ou do grupo SAL ($p < 0,0001$). O teste *post hoc* mostrou ainda, que os animais do grupo LiCl consumiram menos da sacarose que aqueles do grupo SAL ($p < 0,0001$), mas que eles não diferiram entre si quanto ao consumo da sacarina ($p = 0,32$) (Figuras 35 e 36).

Além disso, a ANOVA não revelou efeito significativo na interação Lesão x Tratamento x Solução ($F_{1,32} = 0,89 - p = 0,35$), e o teste *post hoc* de Newman-Keuls mostrou que tanto ratos BL quanto SHAM incluídos no grupo LiCl consumiram menos da solução de sacarose que aqueles incluídos no grupo SAL (BL - $p < 0,0001$; SHAM - $p < 0,0001$), mas não houve diferença quanto ao consumo da sacarina (BL - $p = 0,08$; SHAM - $p = 0,70$) (Figuras 35 e 36).

Também não houve efeito significativo do fator Pista ($F_{1,32} = 0,87 - p = 0,36$) nem da interação Pista x Tratamento x Solução ($F_{1,32} = 1,18 - p = 0,28$). O teste *post hoc* de Newman-Keuls revelou que a diminuição do consumo da sacarose no grupo LiCl em relação ao grupo SAL, ocorreu tanto para ratos que receberam o arranjo ELM ($p < 0,0002$) quanto para ratos

expostos ao arranjo CFG ($p < 0,0002$) (Figuras 35 e 36). E mostrou, ainda, que o consumo da solução de sacarina não diferiu entre os grupos LiCl e SAL, quando o arranjo das pistas foi ELM ($p = 0,48$) ou CFG ($p = 0,97$) (Figuras 35 e 36).

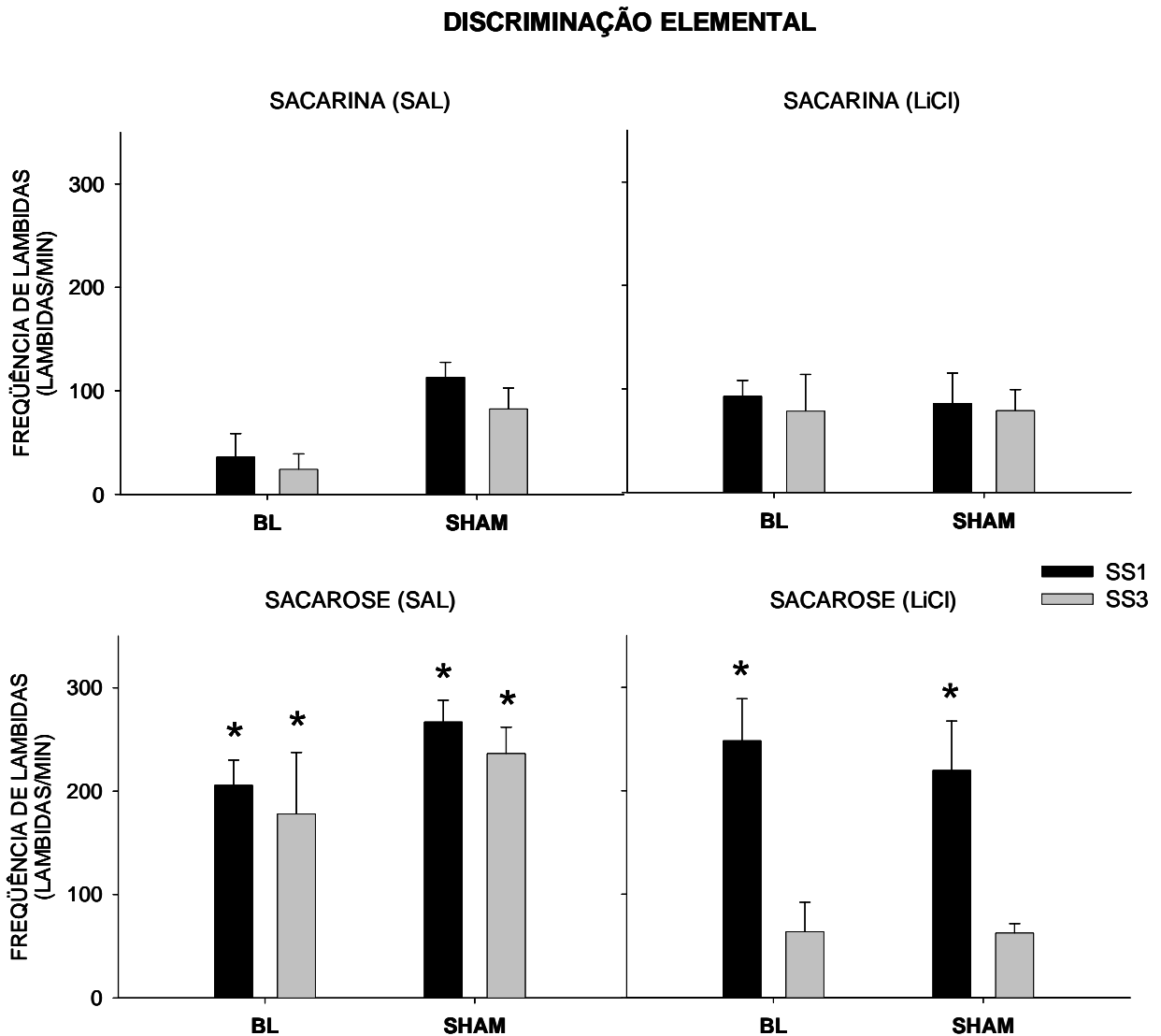


Figura 35. Frequência de lambidas (média \pm erro padrão) nas soluções de sacarina 0,15% (*sacarina*) ou de sacarose 32% (*sacarose*) na primeira (*SS1*) e na última (*SS3*) sessões da fase de desvalorização seletiva da sacarose (*LiCl*: pareamento de sacarose com LiCl; *SAL*: pareamento de sacarose com salina), realizada pelos ratos lesados seletivamente no BL (*BL*) e por seus controle-operados (*SHAM*), que haviam recebido previamente pistas discriminativas que possibilitaram uma discriminação elemental das diferentes condições experimentais.

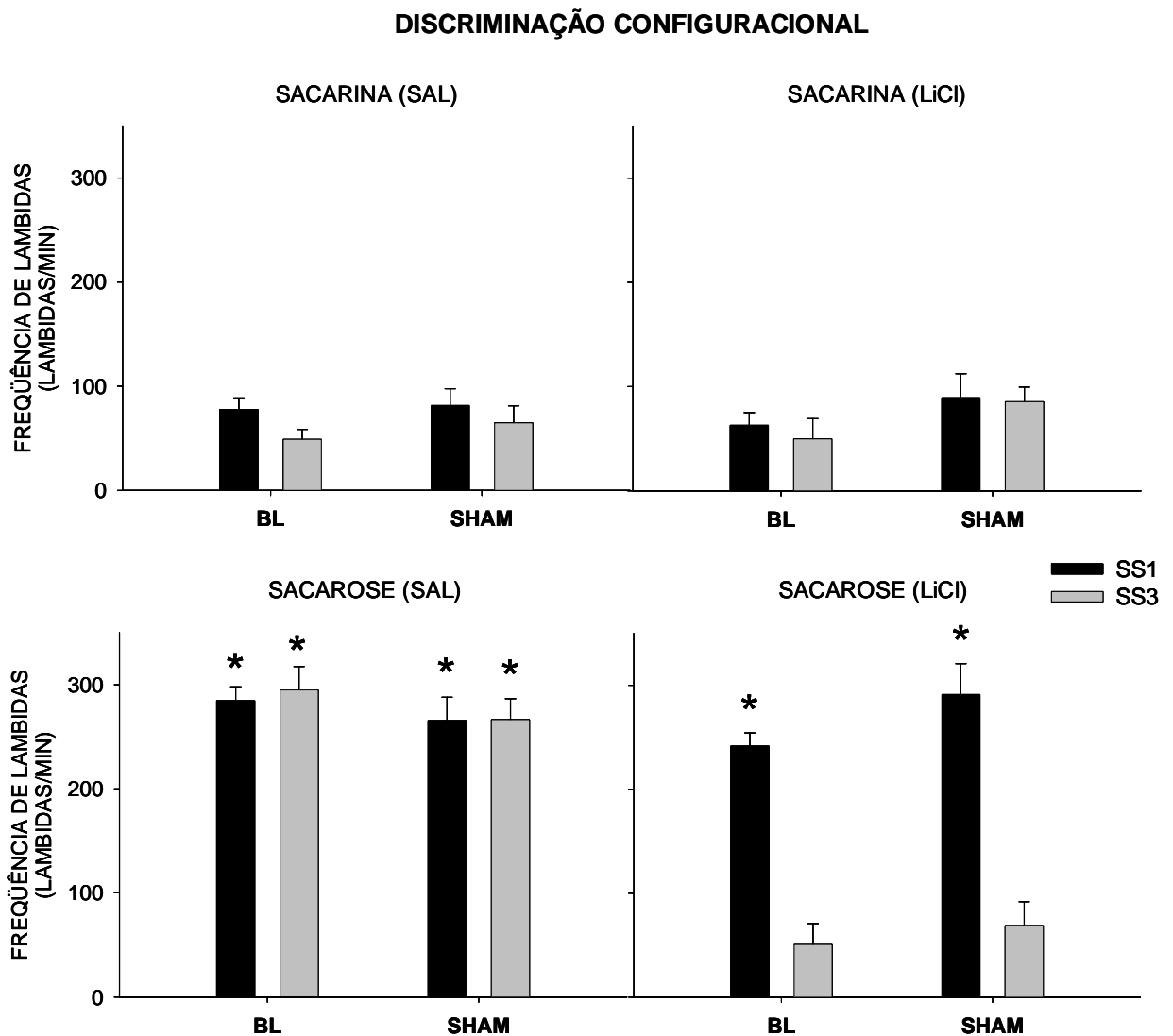


Figura 36. Frequência de lambidas (média \pm erro padrão) nas soluções de sacarina 0,15% (*sacarina*) ou de sacarose 32% (*sacarose*) na primeira (*SS1*) e na última (*SS3*) sessões da fase de desvalorização seletiva da sacarose (*LiCl*: pareamento de sacarose com LiCl; *SAL*: pareamento de sacarose com salina), realizada pelos ratos lesados seletivamente no BL (*BL*) e por seus controle-operados (*SHAM*), que haviam recebido previamente pistas discriminativas que possibilitaram uma discriminação configuracional das diferentes condições experimentais.

Além disso, a ANOVA revelou a existência de um efeito significativo do fator Sessão ($F_{2,64} = 38,87 - p < 0,0001$) e da interação entre Tratamento e Sessão ($F_{2,64} = 19,10 - p < 0,0001$). O teste *post hoc* de Newman-Keuls mostrou que os ratos diminuíram o consumo das soluções ao longo de todas as três sessões dessa fase de treino quando pertenceram ao grupo LiCl ($p < 0,0001$), mas não ao grupo SAL ($p > 0,05$). Também houve efeito significativo

na interação entre Solução e Sessão ($F_{2,64} = 28,57 - p < 0,0001$), e o teste *post hoc* de Newman-Keuls indicou que o consumo da sacarina não se alterou ao longo das três sessões do treino ($p > 0,05$), mas que diferentemente, o consumo da sacarose diminuiu ao longo das sessões ($p < 0,0001$). O teste ANOVA também exibiu efeito significativo na interação Tratamento x Solução x Sessão ($F_{2,64} = 34,41 - p < 0,0001$), e o teste de Newman-Keuls revelou que tanto ratos do grupo LiCl quanto do grupo SAL não alteraram o consumo da solução de sacarina ao longo das três sessões dessa fase de treino ($p > 0,05$) (Figuras 35 e 36). No entanto, o consumo da sacarose diminuiu ao longo das três sessões para animais do grupo LiCl ($p < 0,0001$), mas não para os do grupo SAL ($p > 0,05$) (Figuras 35 e 36).

A ANOVA revelou ausência de efeitos significantes na interação Lesão x Tratamento x Sessão ($F_{2,64} = 0,05 - p = 0,95$) e na interação Pista x Tratamento x Sessão ($F_{2,64} = 1,43 - p = 0,25$). Também revelou ausência de efeitos significantes na interação Lesão x Solução x Sessão ($F_{2,64} = 0,08 - p = 0,92$) e na interação Pista x Solução x Sessão ($F_{2,64} = 0,15 - p = 0,86$). As ausências desses efeitos, em conjunto, indicam que o padrão de resultados descritos acima se aplica igualmente para ratos BL e SHAM e para ratos dos grupos ELM e CFG.

Finalmente, a ANOVA revelou ausência de efeito significativo na interação Lesão x Pista x Tratamento x Solução x Sessão ($F_{2,64} = 1,57 - p = 0,22$). O teste *post hoc* de Newman-Keuls mostrou que, dentro de todos os quatro sub-grupos de ratos BL e SHAM expostos aos arranjos ELM e CFG, o consumo da sacarose diminuiu significativamente da primeira sessão para a última sessão em ratos do grupo LiCl ($p < 0,0001$), mas não em ratos do grupo SAL ($p > 0,05$). O teste de Newman-Keuls também revelou que, dentro de todos esses quatro sub-grupos, o consumo da sacarina não se alterou ao longo das sessões dessa fase do treino tanto em ratos do grupo LiCl ($p > 0,05$) quanto em ratos do grupo SAL ($p > 0,05$). O teste também indicou que, dentro de todos os quatro sub-grupos, ratos do grupo LiCl e ratos do grupo SAL não exibiram diferenças significantes nos consumos de sacarina na última sessão do treino ($p > 0,05$). E que, também para todos os quatro sub-grupos, o consumo de sacarose na última sessão do treino de ratos do grupo LiCl foi menor que o de ratos do grupo SAL ($p < 0,001$). E finalmente que, na última sessão dessa fase de treino, para todos esses quatro sub-grupos, o

consumo de sacarose foi maior que o consumo de sacarina em animais do grupo SAL ($p < 0,0001$), mas não do grupo LiCl ($p > 0,05$) (Figuras 35 e 36).

Em síntese, esse conjunto de resultados mostra que o procedimento adotado para desvalorizar seletivamente a sacarose foi efetivo em todos os sub-grupos, sendo eles BL ou SHAM, e mesmo ELM ou CFG.

6.2.4.4. Teste na tarefa de contraste antecipatório de incentivo intra-sujeitos após a desvalorização da sacarose

A composição dos grupos continuou como na fase anterior de desvalorização seletiva da sacarose. A ANOVA de quatro vias para medidas repetidas teve Lesão (BL ou SHAM), tipo de Pista (ELM ou CFG) e tipo de Tratamento (LiCl ou SAL) como variáveis independentes inter-sujeitos, e Condição (15/15 ou 15/32) como variável independente intra-sujeitos. A frequência de lambidas nas soluções foi tomada como a variável dependente.

Ao utilizarmos o teste ANOVA no tratamento dos dados da frequência de lambidas na primeira solução durante esta fase de teste, verificou-se a existência de um efeito significativo do fator Condição ($F_{1,32} = 4,62 - p < 0,04$), indicando que ratos expostos à sinalização da condição 15/32 consumiram menos da primeira solução que ratos submetidos à sinalização da condição 15/15, independentemente da lesão, das pistas e do tratamento empregado (Figura 37).

A ANOVA revelou a existência de um efeito próximo ao significativo do fator Lesão ($F_{1,32} = 3,02 - p = 0,09$), sugerindo uma tendência de ratos do grupo BL consumirem menos da primeira solução que os SHAM, independentemente das condições de teste, das pistas e do tratamento empregado.

Também houve um efeito significativo do fator Tratamento ($F_{1,32} = 8,10 - p < 0,01$), indicando que ratos do grupo LiCl consumiram significativamente mais da primeira solução, nessa última etapa do teste, que os animais do grupo SAL, independentemente dos fatores Condição e Pista. Verificou-se que esse efeito não existia antes dessa fase do treino ($F_{1,32} =$

2,27 – $p=0,14$), apesar de já existir uma tendência. Ou seja, os ratos que receberiam o tratamento com LiCl não apresentavam, durante a fase anterior do treino (contraste antecipatório intra-sujeitos com dias randomizados), o consumo da primeira solução (independentemente da condição) significativamente maior que o dos ratos que receberiam o tratamento SAL, apesar de existir uma forte tendência para isso.

Além disso, a ANOVA revelou ausência de um efeito significativo do fator Pista ($F_{1,32} = 0,001 - p=0,97$) e da interação entre Pista e Condição ($F_{1,32} = 2,42 - p=0,13$). No entanto, o teste *post hoc* de Newman-Keuls (Pista x Condição) revelou que ratos do grupo ELM, independentemente da lesão e do tratamento da fase de desvalorização, apresentaram o consumo da primeira solução no dia de condição 15/32 significativamente menor que no dia de condição 15/15 ($p<0,05$) (Figura 37). Diferentemente, o mesmo teste mostrou que isso não ocorreu para os ratos do grupo CFG ($p=0,67$), ou seja, para estes ratos, o consumo da primeira solução no dia de teste na condição 15/32 não diferiu daquele no dia da condição 15/15, e portanto, não exibiram o efeito de contraste antecipatório (Figura 37). Além disso, a ANOVA revelou ausência de efeito significativo na interação Lesão x Pista x Condição ($F_{1,32} = 0,69 - p=0,41$), indicando que os grupos BL e SHAM não diferiram quanto a essa influência das pistas sobre o aparecimento do efeito de contraste antecipatório. E ainda, a ausência de efeito significativo na interação Pista x Tratamento x Condição ($F_{1,32} = 0,03 - p=0,86$) mostrou que os grupos LiCl e SAL também não diferiram quanto a essa influência das pistas sobre o aparecimento do efeito de contraste antecipatório (Figura 37).

Diante desse conjunto de resultados, os dados dos animais do grupo ELM foram analisados separadamente. A ANOVA revelou a existência de um efeito significativo do fator Condição ($F_{1,12} = 4,33 - p<0,05$), mas a ausência de efeitos significantes dos fatores Lesão ($F_{1,12} = 0,82 - p=0,38$) e Tratamento ($F_{1,12} = 1,87 - p=0,20$), indicando que o consumo da primeira solução foi significativamente menor no dia de sinalização da condição 15/32 que no dia de sinalização da condição 15/15, independentemente da lesão e do tratamento empregado. Ou seja, independentemente dos fatores Lesão e Tratamento, os animais exibiram o efeito de contraste antecipatório nessa última etapa do teste.

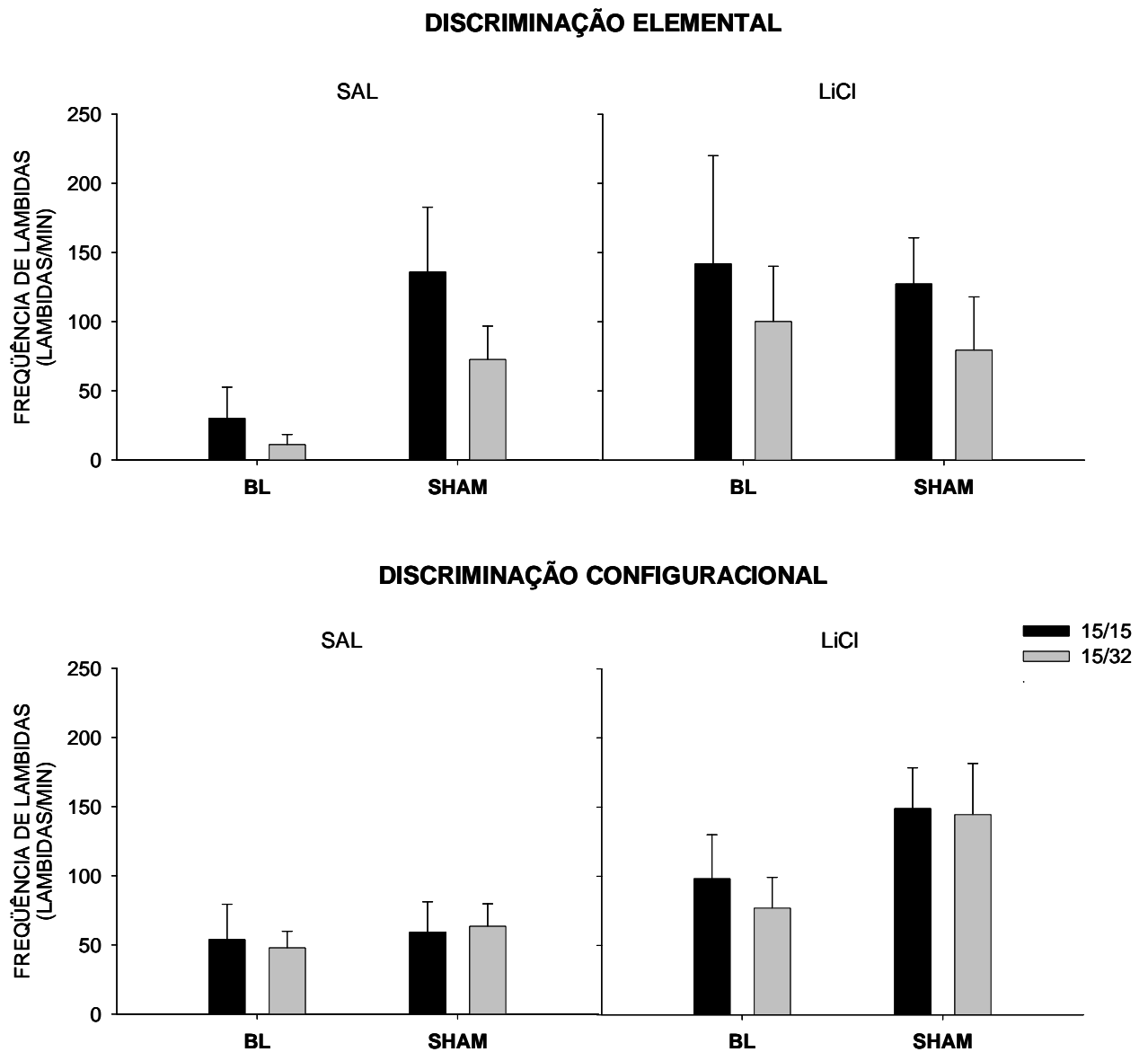


Figura 37. Frequência de lambidas (média \pm erro padrão) na primeira solução (sacarina 0,15%) durante a fase de teste pós-desvalorização seletiva da sacarose (*LiCl*: pareamento da sacarose com LiCl; e *SAL*: pareamento da sacarose com salina), na tarefa de contraste antecipatório de incentivo, realizado por ratos lesados seletivamente no BL (*BL*) e por seus controle-operados (*SHAM*) sob as condições sacarina-sacarina (*15/15*) ou sacarina-sacarose (*15/32*), ao empregarmos pistas discriminativas que possibilitaram uma discriminação elemental ou configuracional das diferentes condições experimentais.

Além disso, não houve efeitos significantes na interação Lesão x Tratamento ($F_{1,12} = 1,94 - p=0,19$) e na interação Lesão x Condição ($F_{1,12} = 0,37 - p=0,55$).

A ANOVA também revelou ausência de efeito significativo na interação entre Tratamento e Condição ($F_{1,12} = 0,007 - p=0,93$). O teste *post hoc* de Newman-Keuls mostrou uma tendência não significativa de os animais consumirem menos da primeira solução na sessão de sinalização da condição 15/32 do que na da condição 15/15, tanto para o grupo LiCl ($p=0,13$) quanto para o grupo SAL ($p=0,17$) (Figura 37). O teste de Newman-Keuls revelou, ainda, que o consumo da primeira solução dos ratos do grupo SAL não diferiu significativamente do consumo dos ratos do grupo LiCl nas duas condições de teste (15/15: $p=0,20$ e 15/32: $p>0,25$) (Figura 37).

Também não houve efeito significativo na interação Lesão x Tratamento x Condição ($F_{1,12} = 0,21 - p=0,65$), e o teste *post hoc* de Newman-Keuls não mostrou qualquer diferença significativa quanto ao consumo da primeira solução entre as condições 15/32 e 15/15 ($p>0,05$), quando analisamos os quatro grupos individualmente (BL/LiCl; BL/SAL; SHAM/LiCl e SHAM/SAL). Também não mostrou diferenças significantes entre os quatro grupos quanto ao consumo da primeira solução no dia de condição 15/15 ($p>0,05$) e também quanto ao consumo da primeira solução no dia de condição 15/32 ($p>0,05$) (Figura 37).

Os resultados indicaram, portanto, que durante essa etapa final do teste, o efeito de contraste antecipatório ocorreu para os animais do grupo ELM, mas não para os do grupo CFG. Ademais, ao analisarmos apenas os dados comportamentais dos ratos do grupo ELM, o teste estatístico não foi sensível à ocorrência do efeito significativo de contraste antecipatório quando os animais foram separados em grupos quanto à lesão (BL ou SHAM) ou ao tratamento empregado (LiCl ou SAL). O teste foi sensível ao aparecimento de um efeito significativo de contraste antecipatório somente quando os dados de **todos** os animais do grupo ELM foram analisados em conjunto. No entanto, o teste estatístico detectou ausência de diferenças entre esses sub-grupos quanto ao consumo da primeira solução durante essa etapa da tarefa, tanto na condição 15/15 quanto na condição 15/32. É provável que isso tenha se dado pelo reduzido número de animais nas amostras decorrente da separação dos ratos em quatro sub-grupos. Portanto, dentre os animais do grupo ELM, parece plausível sugerir que aqueles que haviam recebido o tratamento com LiCl apresentaram desempenho semelhante

àqueles que haviam recebido o tratamento controle (SAL); ou seja, ambos mostraram uma tendência em exibir o efeito de contraste antecipatório de incentivo nessa fase de teste, apesar da desvalorização da sacarose. Ademais, ratos BL e SHAM parecem também ter exibido desempenhos similares quanto ao consumo da primeira solução, nas duas condições de treino, nessa fase de teste.

Adicionalmente, ao analisarmos os dados sobre a frequência de lambidas nas segundas soluções nesta fase de teste, a ANOVA revelou ausência de efeitos significantes dos fatores Lesão ($F_{1,32} = 1,76 - p=0,19$) e Pista ($F_{1,32} = 2,59 - p=0,12$), e da interação entre Lesão e Pista ($F_{1,32} = 0,60 - p=0,44$) (Figura 38).

A ANOVA revelou um efeito significativo no fator Condição ($F_{1,32} = 179,07 - p<0,0001$), indicando que o consumo da segunda solução de sacarose foi significativamente maior que o de sacarina, independentemente da lesão, das pistas e dos tratamentos empregados.

Também houve um efeito significativo do fator Tratamento ($F_{1,32} = 30,10 - p<0,0001$), mostrando que o consumo da segunda solução de ratos do grupo LiCl foi significativamente menor que o de ratos do grupo SAL, independentemente da condição experimental. Além disso, houve um efeito significativo na interação entre Tratamento e Condição ($F_{1,32} = 58,46 - p<0,0001$), tendo o teste *post hoc* de Newman-Keuls mostrado que ratos do grupo LiCl consumiram significativamente menos da segunda solução de sacarose que ratos do grupo SAL ($p<0,0001$), mas que o consumo da segunda solução de sacarina não diferiu entre esses dois grupos ($p=0,31$) (Figura 38). Além disso, o teste de Newman-Keuls revelou que o consumo da segunda solução de sacarose foi significativamente maior que o de sacarina para esses dois grupos ($p<0,0003$) (Figura 38).

Além disso, a ANOVA revelou um efeito de interação próximo do significativo na interação entre Lesão e Tratamento ($F_{1,32} = 3,17 - p=0,08$). O respectivo teste de Newman-Keuls revelou que o consumo da segunda solução, independentemente da condição, dos ratos do grupo LiCl foi menor que o dos ratos do grupo SAL, tanto para os BL ($p<0,01$) quanto para os SHAM ($p<0,001$) (Figura 38). O teste *post hoc* indicou ainda, que os ratos do grupo

BL/SAL consumiram menos da segunda solução, independentemente da condição, que o seus respectivos SHAM/SAL ($p < 0,03$). No entanto, o mesmo não foi detectado para os animais previamente tratados com LiCl ($p = 0,74$) (Figura 38).

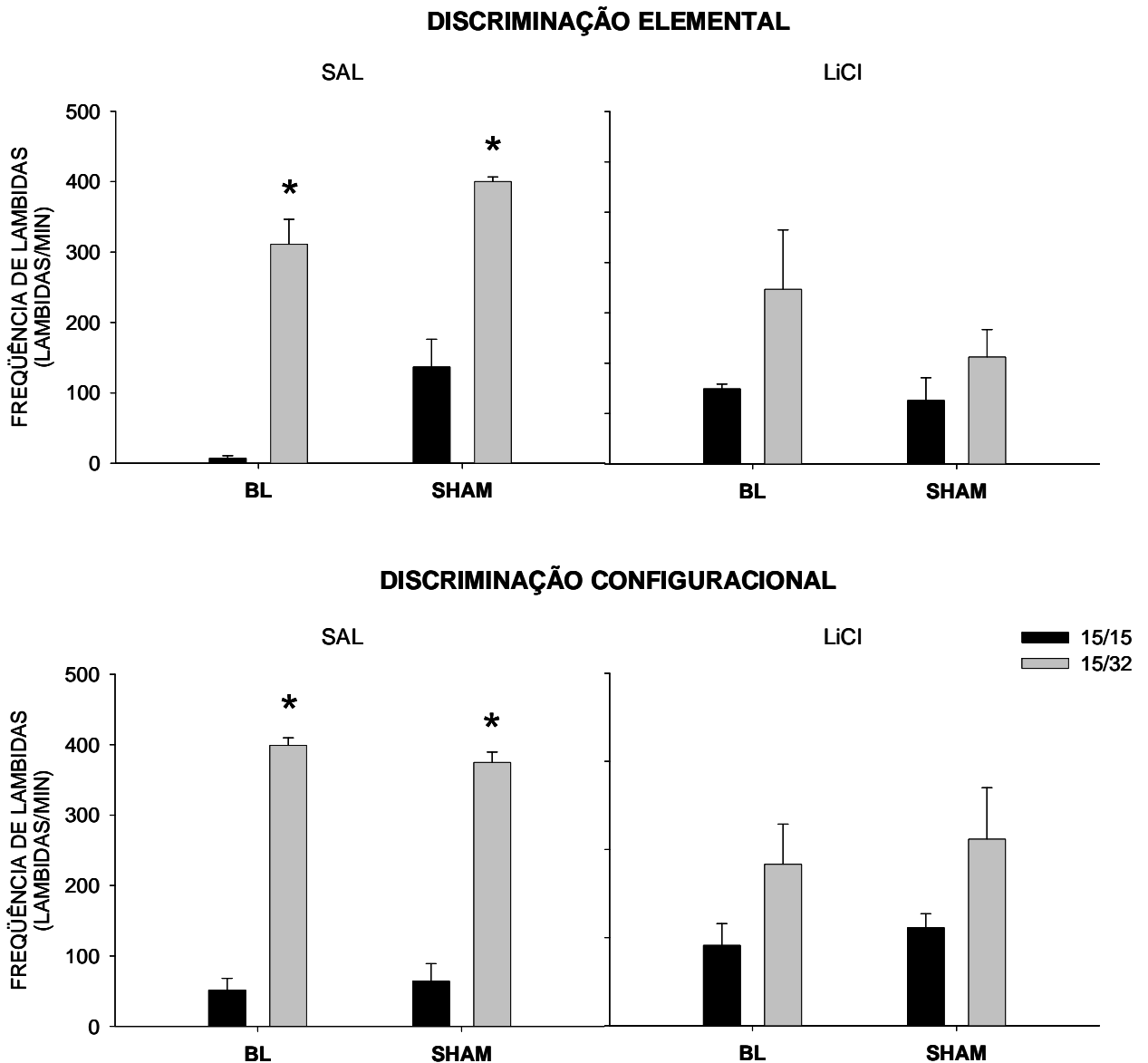


Figura 38. Frequência de lambidas (média \pm erro padrão) na segunda solução (sacarina 0,15% ou sacarose 32%, dependendo da condição) durante a fase de teste pós-desvalorização seletiva da sacarose (*LiCl*: pareamento da sacarose com LiCl; e *SAL*: pareamento da sacarose com salina), na tarefa de contraste antecipatório de incentivo, realizado por ratos lesados seletivamente no BL (*BL*) e por seus controle-operados (*SHAM*) sob as condições sacarina-sacarina (*15/15*) ou sacarina-sacarose (*15/32*), ao empregarmos pistas discriminativas que possibilitaram uma discriminação elemental ou configuracional das diferentes condições experimentais.

Ainda, não houve efeito significativo na interação entre Lesão e Condição ($F_{1,32} = 1,15 - p=0,29$). O respectivo teste de Newman-Keuls mostrou que, tanto para os ratos BL como para os SHAM, o consumo da segunda solução de sacarose foi significativamente maior que o de sacarina ($p<0,0001$), independentemente dos fatores Pista e Tratamento. O teste *post hoc* também revelou uma forte tendência, apesar de não significativa, de o consumo da segunda solução de sacarina de ratos do grupo BL ter sido menor que o dos SHAM ($p=0,06$), mas não mostrou qualquer diferença entre esses grupos quanto ao consumo da solução de sacarose ($p=0,75$).

A ANOVA ainda revelou ausência de efeito significativo na interação Lesão x Tratamento x Condição ($F_{1,32} = 0,07 - p=0,79$). Mais especificamente, o teste *post hoc* de Newman-Keuls indicou que, tanto para os BL quanto para os SHAM, o consumo da segunda solução de sacarose foi menor para aqueles incluídos no grupo LiCl do que para aqueles incluídos no grupo SAL ($p<0,0001$) (Figura 38). No entanto, essa diferença não ocorreu para o consumo da segunda solução de sacarina ($p>0,05$) (Figura 38). Além disso, o teste *post hoc* mostrou que, tanto para o grupo BL quanto para o grupo SHAM, o consumo da segunda solução de sacarose foi significativamente maior que o de sacarina em ratos expostos ao tratamento SAL (BL e SHAM: $p<0,0001$) e também em ratos submetidos ao tratamento LiCl (BL: $p<0,01$ e SHAM: $p<0,04$) (Figura 38).

Além disso, a ANOVA revelou ausência de efeito significativo na interação Pista x Tratamento x Condição ($F_{1,32} = 0,12 - p=0,73$). O teste *post hoc* de Newman-Keuls mostrou que dentro dos grupos ELM e CFG, o consumo da segunda solução de sacarose de ratos expostos ao tratamento LiCl foi significativamente menor que daqueles submetidos ao tratamento SAL ($p<0,0001$) (Figura 38). O teste também mostrou que, ainda dentro dos grupos ELM e CFG, o consumo da segunda solução de sacarina não diferiu entre ratos tratados com LiCl e ratos tratados com SAL (ELM: $p=0,91$; CFG: $p=0,43$). Além disso, o teste de Newman-Keuls indicou que, dentro dos grupos ELM e CFG, o consumo da segunda solução de sacarose foi maior que o de sacarina para ratos tratados com LiCl ou com SAL ($p<0,05$) (Figura 38).

Finalmente, a ANOVA revelou ausência de efeito significativo na interação Lesão x Pista x Tratamento x Condição ($F_{1,32} = 0,27 - p=0,61$). O respectivo teste *post hoc* de Newman-Keuls revelou que o consumo da segunda solução de sacarose dos quatro sub-grupos (BL e SHAM expostos aos arranjos ELM ou CFG) que receberam o tratamento LiCl foi menor do que o dos outros quatro sub-grupos submetidos ao tratamento SAL ($p<0,01$) (Figura 38). Além disso, o teste de Newman-Keuls mostrou que o consumo da segunda solução de sacarina não diferiu entre ratos que receberam o tratamento LiCl e aqueles que receberam o tratamento SAL, dentro de todos os quatro sub-grupos de ratos BL e SHAM expostos aos arranjos ELM ou CFG ($p>0,05$) (Figura 38). O teste também revelou que o consumo da segunda solução de sacarose foi maior que o de sacarina em ratos expostos ao tratamento SAL ($p<0,0001$), mas que essa diferença não foi detectada em ratos submetidos ao tratamento LiCl ($p>0,05$), quando analisamos individualmente os dados de ratos BL e SHAM expostos aos arranjos ELM ou CFG (Figura 38).

6.2.4. Condicionamento Clássico Aversivo

O número total de sujeitos incluídos na análise dos dados comportamentais referentes ao condicionamento clássico aversivo, em função da avaliação histológica das lesões, foi o seguinte: dez sujeitos no grupo dos lesados que receberam choque durante o treino (BL/CHQ; $N = 10$), sete sujeitos no grupo dos lesados que não foram expostos ao choque (BL/Ñ-CHQ; $N = 7$), 14 sujeitos no grupo dos controle-operados que receberam choque durante o treino (SHAM/CHQ; $N = 14$), e oito sujeitos no grupo dos controle-operados que não receberam choque (SHAM/Ñ-CHQ; $N = 8$).

Teste de Medo Condicionado ao Contexto

Foi aplicada uma ANOVA de três vias para medidas repetidas, para a análise dos dados. As variáveis independentes da análise compreenderam o tipo de lesão (SHAM ou BL), o grupo quanto ao tipo de Treino (CHQ ou Ñ-CHQ) e os blocos de tempo nos quais o teste foi

dividido (dez blocos de um minuto no total; sendo considerado como medida repetida). A porcentagem de tempo exibida pelos animais com respostas de congelamento durante o teste foi tomada como variável dependente. Os resultados são mostrados nas Figuras 39 e 40.

Ao analisarmos os dados de todos os dez blocos do teste de medo condicionado ao contexto, o teste ANOVA revelou um efeito significativo do fator Treino ($F_{1,35} = 4,64 - p < 0,04$), indicando que ratos do grupo CHQ apresentaram tempo em congelamento significativamente menor que os ratos do grupo Ñ-CHQ, independentemente da lesão.

Além disso, a ANOVA revelou ausência de efeitos significantes do fator Lesão ($F_{1,35} = 1,84 - p = 0,18$) e da interação entre Lesão e Treino ($F_{1,35} = 0,65 - p = 0,44$). Mais especificamente, o teste *post hoc* de Newman-Keuls indicou que os ratos do grupo SHAM/CHQ não exibiram, no teste ao contexto, diferenças significantes no tempo em congelamento em relação aos SHAM/Ñ-CHQ ($p = 0,10$). O mesmo foi encontrado para os ratos BL. Ou seja, os testes estatísticos não detectaram diferenças significantes entre os desempenhos de ratos SHAM/CHQ e SHAM/Ñ-CHQ, quando os dados comportamentais coletados em **todos os dez blocos** do teste foram analisados em conjunto.

Diante desta ausência de efeitos estatísticos significantes e da clara tendência sugerida pelos resultados no sentido da aquisição do medo condicionado ao contexto por ratos SHAM, e de uma redução do congelamento nos animais lesados submetidos ao choque (Figuras 39 e 40) resolveu-se analisar os dados comportamentais referentes somente aos cinco minutos iniciais do teste, pois, após esse período, o tempo em congelamento de ratos submetidos ao choque atingiu um nível similar ao de animais não expostos ao choque, o que contribui para a redução de eventuais diferenças numa análise global dos resultados.

Essa segunda ANOVA revelou a existência de um efeito significativo de Treino ($F_{1,35} = 9,61 - p < 0,01$), mas a ausência de efeito significativo do fator Lesão ($F_{1,35} = 1,89 - p = 0,18$) e da interação entre Lesão e Treino ($F_{1,35} = 2,28 - p = 0,14$). Ademais, o teste *post hoc* de Newman-Keuls mostrou que ratos do grupo SHAM/CHQ exibiram tempo em congelamento significativamente maior que aqueles do grupo SHAM/Ñ-CHQ ($p < 0,01$), nos primeiros cinco blocos do teste (Figura 39). No entanto, o mesmo não ocorreu para os animais do grupo BL

($p=0,27$), ou seja, ratos lesados não aumentaram o tempo em congelamento no teste ao contexto quando condicionados aversivamente (Figura 39). Ainda, o teste *post hoc* revelou que ratos do grupo BL/CHQ apresentaram tempo em congelamento significativamente menor que seus respectivos SHAM/CHQ ($p<0,04$), mas que o mesmo não ocorreu para aqueles que não haviam sido submetidos ao choque (grupos Ñ-CHQ – $p=0,92$) (Figura 39).

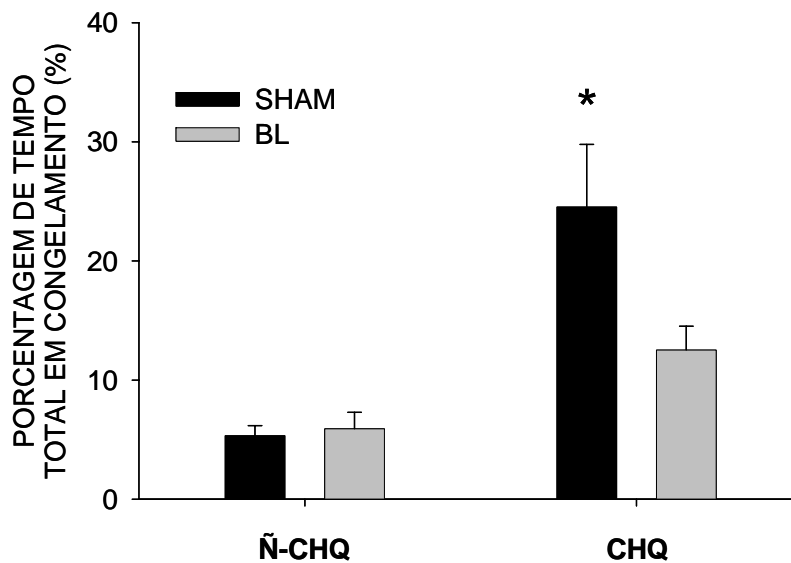


Figura 39. Porcentagem do tempo total em congelamento (média \pm erro padrão) durante os primeiros cinco blocos do teste de medo condicionado ao contexto. **CHQ**, ratos que foram expostos ao choque durante o treino de condicionamento; **Ñ-CHQ**, ratos que não receberam o estímulo aversivo durante o treino; **BL**, sujeitos lesados seletivamente no BL; **SHAM**, sujeitos controle-operados.

Adicionalmente, a ANOVA revelou ausência de efeito significativo do fator Bloco ($F_{4,140} = 1,16 - p=0,33$) e da interação entre Lesão e Bloco ($F_{4,140} = 2,00 - p=0,10$), mas exibiu efeito significativo na interação entre Treino e Bloco ($F_{4,140} = 2,82 - p<0,03$). A ANOVA também revelou ausência de efeito significativo na interação Lesão x Treino x Bloco ($F_{4,140} = 0,91 - p=0,46$). Mais especificamente, o teste *post hoc* de Newman-Keuls (Lesão x Treino x Bloco) mostrou que os ratos do grupo SHAM/CHQ apresentaram tempo em

congelamento significativamente menor que os do grupo SHAM/Ñ-CHQ especificamente no primeiro e no terceiro blocos do teste ($p < 0,0001$) (Figura 40). Ainda, foi exatamente nesses blocos que o desempenho dos BL/CHQ diferiu dos SHAM/CHQ ($p < 0,01$) (Figura 40). Ademais, o teste *post hoc* indicou que o desempenho dos ratos do grupo BL/CHQ não diferiu significativamente em relação ao dos ratos do grupo BL/Ñ-CHQ ao longo de todos os cinco primeiros blocos do teste (Figura 40).

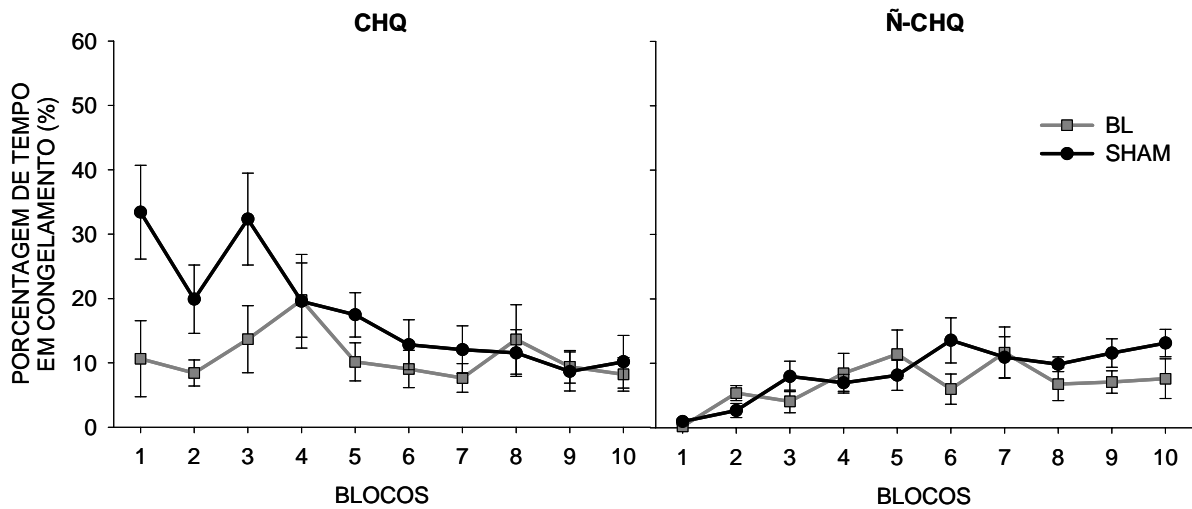


Figura 40. Porcentagem de tempo em congelamento (média \pm erro padrão) ao longo dos dez blocos de tempo (de 1 min cada) no teste de medo condicionado ao contexto. **CHQ**, ratos que foram expostos ao choque durante o treino de condicionamento; **Ñ-CHQ**, ratos que não receberam o estímulo aversivo durante o treino; **BL**, sujeitos lesados seletivamente no BL; **SHAM**, sujeitos controle-operados.

Teste de Medo Condicionado ao Som

O teste ANOVA de três vias para medidas repetidas e as variáveis utilizadas para a análise dos dados do teste de medo condicionado ao contexto foram empregadas também para a análise dos dados deste teste comportamental. Os resultados são mostrados nas Figuras 41 e 42.

A ANOVA revelou a existência de um efeito significativo do fator Treino ($F_{1,35} = 53,43 - p < 0,0001$), indicando que os ratos do grupo CHQ exibiram tempo em congelamento significativamente maior que aqueles do grupo Ñ-CHQ, independentemente da lesão.

Além disso, a ANOVA revelou a ausência de efeitos significantes do fator Lesão ($F_{1,35} = 0,0001 - p = 0,99$) e da interação entre Lesão e Treino ($F_{1,35} = 0,68 - p = 0,41$). Mais especificamente, o teste *post hoc* de Newman-Keuls indicou que animais dos grupos SHAM/CHQ e BL/CHQ apresentaram tempo em congelamento significativamente maior que os respectivos ratos dos grupos Ñ-CHQ ($p < 0,0001$) (Figura 41). O teste *post hoc* também mostrou que ratos BL/Ñ-CHQ não exibiram, no teste de medo condicionado ao som, diferenças significantes no tempo em congelamento em relação aos SHAM/Ñ-CHQ ($p = 0,56$) (Figura 41). E ainda, que animais do grupo BL/CHQ não apresentaram, no teste de medo condicionado ao som, diferenças significantes no tempo em congelamento em relação aos SHAM/CHQ ($p = 0,56$), como mostra a Figura 41.

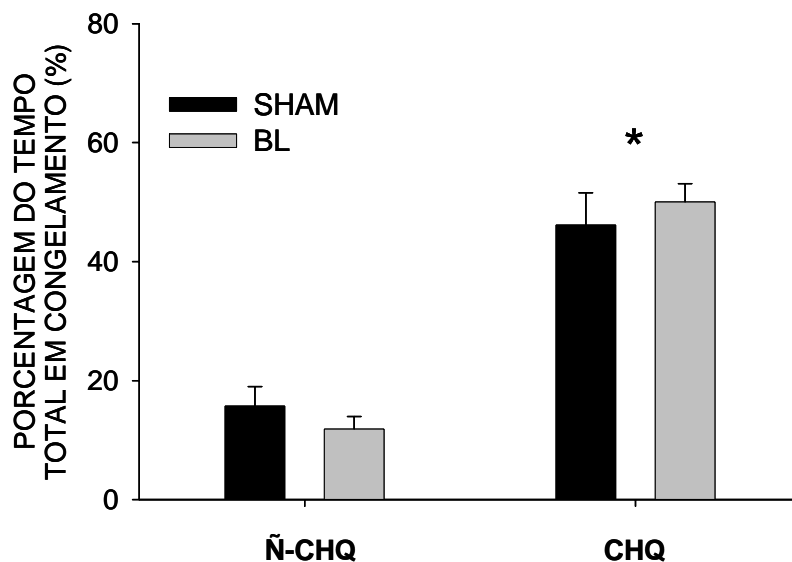


Figura 41. Porcentagem do tempo total em congelamento (média \pm erro padrão) durante todo o teste de medo condicionado ao som. **CHQ**, ratos que foram expostos ao choque durante o treino de condicionamento; **Ñ-CHQ**, ratos que não receberam o estímulo aversivo durante o treino; **BL**, sujeitos lesados seletivamente no BL; **SHAM**, sujeitos controle-operados.

Adicionalmente, a ANOVA revelou a existência de efeitos significantes do fator Bloco ($F_{11,385} = 31,30 - p < 0,0001$) e da interação entre Treino e Bloco ($F_{11,385} = 19,91 - p < 0,0001$), mas ausência de um efeito significativo na interação entre Lesão e Bloco ($F_{11,385} = 1,63 - p = 0,09$). O teste estatístico também evidenciou ausência de efeito significativo na interação Lesão x Treino x Bloco ($F_{11,385} = 0,61 - p = 0,82$). Mais especificamente, o teste *post hoc* de Newman-Keuls (Lesão x Treino x Bloco) mostrou que o tempo em congelamento exibido por ratos do grupo BL/Ñ-CHQ não diferiu significativamente do de ratos do grupo SHAM/Ñ-CHQ ao longo de todos os doze blocos do teste ($p > 0,05$) (Figura 42). Ademais, os animais do grupo BL/CHQ também não apresentaram diferenças significantes no tempo em congelamento em relação aos SHAM/Ñ-CHQ em todos os blocos do teste ($p > 0,05$) (Figura 42). E finalmente, o teste *post hoc* indicou que os tempos em congelamento exibidos por ratos dos grupos BL/CHQ e SHAM/CHQ não diferiram daqueles exibidos por ratos BL/Ñ-CHQ e SHAM/Ñ-CHQ nos dois primeiros blocos (na ausência dos estímulos sonoros – $p > 0,05$) e nos últimos três blocos ($p > 0,05$), mas diferiram significativamente nos outros blocos do teste de medo condicionado ao som ($p < 0,01$), como mostra a Figura 42.

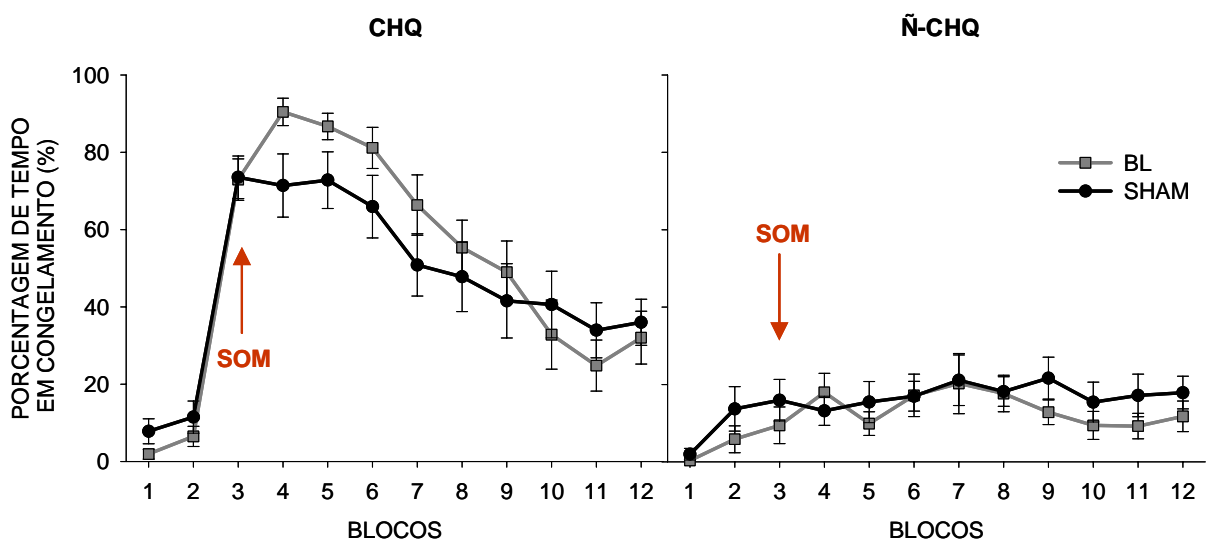


Figura 42. Porcentagem de tempo em congelamento (média \pm erro padrão) ao longo dos doze blocos de tempo (de 1 min cada) no teste de medo condicionado ao som. **CHQ**, ratos que foram expostos ao choque durante o treino de condicionamento; **Ñ-CHQ**, ratos que não receberam o estímulo aversivo durante o treino; **BL**, sujeitos lesados seletivamente no BL; **SHAM**, sujeitos controle-operados.

Em síntese, os resultados deste experimento mostraram que a lesão seletiva do BL prejudicou o desempenho de ratos no teste de medo condicionado ao contexto, mas não ao som, quando o treino de condicionamento aversivo envolveu choques de 0,75mA.

Além disso, os resultados também indicaram que a lesão seletiva do BL não interferiu sobre o efeito de contraste antecipatório de incentivo tanto em uma versão inter-sujeitos quanto em uma versão intra-sujeitos da tarefa envolvendo discriminação do tipo elemental ou configuracional das diferentes condições de treino.

Mais ainda, os resultados mostraram que mesmo após uma desvalorização efetiva da solução de sacarose, o efeito de contraste antecipatório se mantém tanto em ratos normais quanto em ratos lesados no BL.

Esses resultados serão discutidos mais detalhadamente adiante.

7. Discussão

7.1. A lesão seletiva e neurotóxica do núcleo basal da amígdala e os testes de medo condicionado ao som e ao contexto

O presente trabalho mostrou que ratos com lesão seletiva e neurotóxica do BL exibem prejuízo de desempenho no teste de medo condicionado ao contexto, mas não ao som. Em particular, ao se empregar cinco pareamentos de som e choque de intensidade de 0,75mA durante o treino de condicionamento clássico aversivo (Experimentos 3 e 4) detectou-se um prejuízo de desempenho dos animais lesados em relação aos seus respectivos controle-operados, especificamente no teste de medo condicionado ao contexto. Mais ainda, no teste de medo condicionado ao contexto, o tempo em congelamento de ratos lesados condicionados aversivamente com choques de 0,75mA não diferiu significativamente daquele apresentado por animais controle-operados não expostos ao choque durante o treino. Por outro lado, nenhum prejuízo de desempenho de ratos lesados no BL foi observado no teste de medo condicionado ao som. Portanto, sob essas condições de treinamento, parece que a lesão seletiva e neurotóxica do BL prejudicou a aquisição do medo condicionado ao contexto, mas não ao som.

Interessantemente, este trabalho também evidenciou que quando o condicionamento clássico aversivo envolveu cinco pareamentos de som e choque na intensidade de 0,50mA ou de 1mA, a lesão seletiva do BL pareceu não levar a críticos prejuízos no desempenho dos animais tanto no teste de medo condicionado ao contexto como no teste ao som, apesar de existir uma tendência de ratos lesados condicionados aversivamente exibirem tempo em congelamento menor que os seus respectivos controle-operados nos testes de medo condicionado ao contexto, em particular (Experimentos 2 e 3). Os resultados do Experimento 1 parecem consistentes com esse conjunto de resultados. Neste experimento, em particular, os animais exibiram grande variabilidade quanto às reações aos choques de 1mA recebidos nas patas (respostas de sobressalto, tentativa de fuga e congelamento) durante o treinamento na tarefa de condicionamento clássico aversivo. Essa variabilidade na intensidade das reações aos choques pode ter ocorrido em função da ausência de um aparelho de “scrambler” durante a administração dos choques, o que foi modificado nos experimentos subseqüentes. Assim, no

experimento em questão, as respostas dos animais aos choques nas patas foram classificadas em reações de baixa ou média-alta intensidade. De fato, os resultados mostraram que os animais que haviam exibido respostas de baixa intensidade aos choques nas patas durante o condicionamento apresentaram, nos testes de medo condicionado ao som e ao contexto, tempo em congelamento similar ao dos ratos que haviam sido submetidos ao procedimento controle (i.e., que não haviam recebido o estímulo aversivo). Ademais, os resultados indicaram que os ratos lesados que haviam apresentado reações de média a alta intensidade aos choques durante o condicionamento tiveram prejuízo de desempenho no teste de medo condicionado ao contexto, mas não ao som, quando comparados com os seus controle-operados. Assim, houve uma aparente discrepância entre os resultados deste experimento (Experimento 1) com aqueles do Experimento 3, os quais por sua vez indicaram a ausência de prejuízo de desempenho significativo de ratos lesados nos testes de medo condicionado ao contexto quando o condicionamento se deu também com choques de 1mA. No entanto, é importante ressaltar que as reações aos choques nas patas dos animais incluídos na análise do Experimento 1 variaram de média a alta intensidade. Portanto, parece plausível sugerir que tenham sido incluídos nesta amostra ratos que receberam choques nas patas com intensidade **inferior** a 1mA (classificados em exibir reações aos choques de média a alta intensidade). Isso permitiria explicar o prejuízo significativo de desempenho dos ratos lesados no teste de medo condicionado ao contexto observado no Experimento 1, mesmo com o treinamento com choques, supostamente, de 1mA: é possível que a presença de animais que haviam recebido, de fato, choques nas patas de intensidade inferior a 1mA no grupo amostral tenha contribuído para o aparecimento de um prejuízo significativo de desempenho dos ratos lesados no teste de medo condicionado ao contexto, da mesma forma como ocorreu quando o treino envolveu a apresentação de choques de 0,75mA nos Experimentos 3 e 4.

Assim, a lesão seletiva do BL, apesar de resultar em prejuízo de desempenho no teste de medo condicionado ao contexto, parece não ter eliminado a capacidade de aprendizagem dos animais nessa condição experimental. Primeiro, porque o tempo em congelamento de ratos lesados condicionados aversivamente, em qualquer condição de treino (com exceção do

Experimento 4), se mostrou sempre significativamente maior que o de ratos lesados não expostos ao choque. Em segundo lugar, porque apesar de haver uma tendência no sentido de animais lesados no BL se mostrarem prejudicados em relação aos controle-operados quanto à resposta de congelamento no teste de medo condicionado ao contexto quando treinados com choques de 0,50 ou 1mA, esse prejuízo não chegou a ser significativo. Além disso, nos animais controle-operados parece haver uma relação direta entre a intensidade do choque recebido nas patas e o tempo em congelamento exibido posteriormente no teste de medo condicionado ao contexto. De certa forma, algo similar ocorreu em relação aos ratos lesados no BL: animais lesados que haviam sido treinados com choques de 1mA exibiram tempo em congelamento, no teste de medo condicionado ao contexto, maior do que aqueles que haviam recebido choques de 0,75mA ou de 0,50mA. No entanto, o tempo em congelamento, nesse mesmo teste, de ratos lesados treinados com choques de 0,75mA parece ter sido equivalente ao daqueles submetidos a choques de 0,50mA.

Portanto, pode-se sugerir que o desempenho de ratos lesados no teste de medo condicionado ao contexto se “beneficiou” do aumento do valor aversivo dos choques nas patas durante o condicionamento, mas não da mesma forma como ocorreu com o desempenho de ratos normais. Ou seja, parece que o medo eliciado em ratos lesados pelo ambiente no qual haviam recebido os choques nas patas, medido em termos da resposta de congelamento, aumentou à medida que se aumentou também o valor aversivo do estímulo em questão. No entanto, o medo condicionado ao ambiente no qual o estímulo aversivo havia sido apresentado mesmo assim foi “menor” para ratos lesados no BL do que para os ratos controles: a diferença atingiu significância estatística quando treinados com choques de intensidade intermediária (0,75mA), mas não quando os choques foram mais ou menos intensos (1mA ou 0,50mA).

E ainda nesse contexto, a ausência de diferença entre os desempenhos de sujeitos lesados e controles quanto ao medo condicionado ao contexto, quando o treino envolveu choques de 0,50mA, pode ter ocorrido por conta de o tempo em congelamento exibido pelos ratos controles durante o teste ter sido muito baixo a ponto de não ser possível detectar

qualquer diferença existente entre eles e os lesados. De fato, os resultados indicaram que o tempo em congelamento apresentado por ratos controles que haviam recebido treino com choques de 0,50mA foi significativamente menor do que aquele mostrado por controles que haviam sido expostos aos choques de 0,75mA ou de 1mA.

É relevante ressaltar, por outro lado, que os resultados mostram inequivocamente que a lesão seletiva do BL não levou a qualquer prejuízo de desempenho dos ratos no teste de condicionamento clássico aversivo ao som.

Ademais, a lesão neurotóxica do BL estendeu-se, principalmente, à sua porção anterior; na totalidade ou, em outros casos, na sua maior parte. Em muitos casos também houve lesão, unilateral ou bilateralmente, de parte da porção posterior do BL. Em particular, no Experimento 4, foram reportadas as menores lesões do BL: de no mínimo, cerca de 30% da extensão da sua porção anterior. Já em relação às outras regiões, os animais lesados deste experimento mostraram perdas celulares equivalentes aos sujeitos dos demais experimentos. Apesar das lesões menos extensas do BL, foi no Experimento 4 onde observou-se os prejuízos mais severos de desempenho dos ratos lesados no teste de medo condicionado ao contexto. Parece portanto, que o BL está envolvido criticamente na aquisição ou no desempenho do medo condicionado ao contexto, uma vez que mesmo pequenas perdas celulares desse núcleo resultaram em comprometimento da resposta de congelamento dos animais nesta tarefa comportamental. A mesma idéia se aplica no refutamento de uma possível interpretação de que a ausência de prejuízo de desempenho no teste de medo condicionado ao som por ratos lesados seria decorrente de uma lesão não suficientemente completa do BL: pelo fato de as lesões produzidas neste trabalho terem resultado no prejuízo de aquisição do medo condicionado ao contexto, existe uma forte indicação de que estas lesões foram de fato efetivas, e portanto, é plausível sugerir que o funcionamento do BL não é fundamental para o desempenho no teste de medo condicionado ao som.

Diversos trabalhos têm investigado o envolvimento do BLA nos processos relativos ao medo condicionado, e é consenso que lesões ou inativações temporárias bilaterais do BLA resultam em prejuízo de aquisição do medo condicionado tanto ao som quanto ao contexto, ao

se tomar a resposta de congelamento como índice de aprendizagem (Fanselow & Kim, 1994; Maren *et al.*, 1996a, Maren *et al.*, 1996b; Cousins & Otto, 1998; Maren, 1998; 1999; Wilensky *et al.*, 1999; 2000). Entretanto, tem havido poucas tentativas no sentido de investigar o efeito de lesões, ou de outras intervenções, restritas a núcleos específicos da amígdala (Amoraphant, 2000; Goosens & Maren, 2001; Nader *et al.*, 2001; Yaniv *et al.*, 2004).

Por exemplo, Nader e colaboradores (2001) ao realizarem lesões **eletrolíticas** restritas a alguns núcleos amigdalares evidenciaram que lesões do LA ou do Ce resultaram em prejuízos significativos quanto à eliciação de respostas de congelamento no teste de medo condicionado ao som; entretanto, lesões eletrolíticas restritas ao BL, BM ou ao Me não interferiram sobre a aquisição desse tipo de condicionamento. Amoraphant e colaboradores (2000) obtiveram resultados equivalentes. Por outro lado, Goosens e Maren (2001) obtiveram resultados distintos; lesões seletivas do LA, do Ce, ou do BL em conjunto com o BM resultaram em prejuízo de aquisição do medo condicionado, tanto auditivo quanto contextual. Entretanto, estes últimos autores, a fim de obter lesões seletivas desses núcleos amigdalares, produziram grandes lesões eletrolíticas do complexo amigdalares em um hemisfério em associação a lesões neurotóxicas seletivas contralaterais nos núcleos específicos da amígdala. A diferença metodológica para produção das lesões nesses trabalhos pode ter causado as discrepâncias nos resultados comportamentais.

Além disso, Yaniv e colaboradores (2004) observaram que a **inativação reversível** do BL com lidocaína durante a fase de aquisição do condicionamento aversivo, levou a um prejuízo de desempenho 24h depois, no teste de medo condicionado ao contexto, mas não ao som. Calandreau e colaboradores (2005) descreveram resultados semelhantes. Neste último estudo, a inativação reversível do BL com lidocaína antes do condicionamento clássico aversivo resultou no prejuízo de desempenho no teste de medo condicionado ao contexto, quando o contexto era pareado com o estímulo aversivo isoladamente ou em conjunto com um CS auditivo, mas não alterou de nenhuma forma a aquisição do medo condicionado ao som.

O presente trabalho reportou resultados similares aos do estudo de Amorphant e colaboradores.(2000) e de Nader *et al.* (2001): a lesão seletiva do BL não interferiu na aquisição do medo condicionado ao som. Entretanto, os resultados do nosso estudo discreparam em relação aos descritos por Goosens e Maren (2001), os quais reportaram prejuízo de desempenho no teste de medo condicionado ao som após lesão do BL. É possível que essa desigualdade tenha ocorrido por conta das diferenças metodológicas empregadas para a produção das lesões em questão e da extensão das lesões em ambos os estudos; enquanto o presente trabalho valeu-se de lesões **neurotóxicas bilaterais seletivas** do BL, o estudo de Goosens e Maren (2001) utilizou extensa lesão eletrolítica envolvendo a totalidade do complexo amigdalár em um dos hemisférios em adição a uma lesão neurotóxica contralateral restrita ao BL. E finalmente, os nossos resultados foram consistentes com aqueles encontrados por Yaniv e colaboradores (2004) e por Calandreau *et al.* (2005): a perda funcional do BL levou ao prejuízo da aquisição do medo condicionado ao contexto, mas não ao som.

Segundo estudos hodológicos, informações sensoriais unimodais – auditivas e de outras naturezas – atingem a amígdala primordialmente através do LA (McDonald, 1998 e Pitkänen, 2000, para revisões). Trabalhos com enfoque eletrofisiológico indicam também que neurônios unimodais amigdalares responsivos a estímulos condicionados encontram-se majoritariamente no LA, e mais especificamente, que neurônios responsivos a estímulos auditivos condicionados localizam-se principalmente nesse núcleo (Toyomitsu *et al.*, 2002; Ono *et al.*, 1995). Mais do que isso, além de as representações unimodais de um estímulo auditivo serem processadas no LA, induziriam plasticidade sináptica nessa região, em certas circunstâncias (Blair *et al.*, 2001, para revisão).

Ademais, estudos eletrofisiológicos sugerem que associações entre um CS auditivo e um US aversivo ocorreriam no LA (Blair *et al.*, 2001 para revisão), e mais ainda, que a experiência com o condicionamento clássico aversivo a um som resulta em aumento no padrão de disparos de neurônios nessa região (Quirk *et al.*, 1995), sendo essa plasticidade neural mediada por LTP dependente de receptores do tipo NMDA (ver Blair *et al.*, 2001).

Entretanto, estas características hodológicas e neurofisiológicas do LA não são compartilhadas pelo BL. Diferentemente, esse núcleo é um dos principais alvos amigdalares de informações sensoriais polimodais provenientes da formação hipocampal, do córtex pré-frontal e do córtex perirrinal (ver McDonald, 1998 e Pitkänen, 2000, para revisões). Além disso, dados eletrofisiológicos indicam que neurônios polimodais amigdalares responsivos a estímulos condicionados encontram-se primordialmente no BL (Toyomitsu *et al.*, 2002; Ono *et al.*, 1995), e que essas informações polimodais induziriam plasticidade sináptica nessa região (Yaniv *et al.*, 2001).

Diversos estudos sugerem que o aprendizado sobre um contexto requer a formação de uma representação unificada ou configuracional sobre uma multiplicidade de estímulos (Fanselow, 1990; Pickens e Holland, 2004 e Rudy *et al.*, 2004 para revisões), e que por conseguinte, envolveria representações do tipo polimodais. Ademais, a integridade funcional hipocampal parece ser crítica para a aquisição e a consolidação de uma representação unificada de um contexto (O'Keefe e Nadel, 1978; Nadel *et al.*, 1985; Sutherland e Rudy, 1989). E mais ainda, sugere-se que o aprendizado do condicionamento clássico aversivo a um contexto envolve a transmissão, para a amígdala, de informações sobre a representação integrada de múltiplos estímulos (portanto, polimodal), possivelmente dependentes do funcionamento da formação hipocampal (Anagnostaras *et al.*, 2001 e Maren, 2001). Finalmente, estudos sobre a hodologia amigdalares indicam que o BL corresponde ao principal alvo amigdalares das projeções provenientes da formação hipocampal (Pitkänen, 2000).

Portanto, os resultados do presente trabalho relativos aos efeitos das lesões neurotóxicas e seletivas do BL sobre o condicionamento clássico aversivo são congruentes com os dados hodológicos e neurofisiológicos descritos acima. Ou seja, a alteração ou a perda do processamento de informações do tipo contextuais, mas não a de informações sobre um estímulo auditivo discreto, decorrente da perda seletiva de neurônios do BL foi, possivelmente, o fator relevante para a dissociação de desempenho encontrada em animais lesados nos testes de medo condicionado ao contexto e ao som. Assim, esses resultados possibilitam a inferência sobre a importância da integridade funcional do BL no

processamento de informações contextuais, mas não auditivas, relativo à aquisição do condicionamento clássico aversivo, ao menos quando a resposta de congelamento é tomada como o parâmetro de desempenho. No entanto, esses resultados não possibilitam qualquer interpretação sobre a hipótese de que diferentes representações de um CS ocorreriam em paralelo dentro da amígdala (Pitkänen *et al.*, 1997), uma vez que eles se referem somente aos efeitos das perdas celulares do BL, e não dos demais núcleos amigdalares.

Adicionalmente, alguns trabalhos sugerem que o BLA poderia estar envolvido na **produção** da resposta de congelamento, mais do que na formação de associações entre o CS e o US durante o condicionamento aversivo (Cahill *et al.*, 1999; Vazdarjanova *et al.*, 2001). Por exemplo, Vazdarjanova e colaboradores (2001) ao avaliarem a expressão da resposta de congelamento de ratos em resposta a bolas de pêlo de gato ou a bolas de pêlo de plástico, verificaram que a lesão ou a inativação temporária do BLA prejudica a expressão da resposta de congelamento **incondicionado** a um estímulo aversivo. Os autores sugeriram, então, que a diminuição do congelamento em tarefas de condicionamento aversivo em ratos portadores de lesão do BLA não necessariamente refletiria uma inabilidade de aprendizado de associações Pavlovianas, mas poderia refletir uma inabilidade de **expressar** o que de fato se aprendeu. Entretanto, o presente conjunto de experimentos não sustenta essa conclusão, ao menos ao que se refere ao BL, uma vez que não houve alteração da **expressão** da resposta de congelamento em animais lesados. Isto é, apesar do prejuízo de desempenho no teste de medo condicionado ao contexto, animais lesados no BL exibiram tempo em congelamento **equivalente** ao de ratos controles no teste de medo condicionado ao som.

Dessa forma, uma das interpretações que surgem desse trabalho é de que o funcionamento do BL seria necessário para o processamento de informações do tipo contextuais (ou configuracionais), mas não de informações auditivas unimodais, e mais ainda, que seria importante para o estabelecimento de associações entre a representação polimodal (contextual) de um estímulo e o valor motivacional de um evento aversivo durante a experiência com a tarefa de condicionamento clássico aversivo, mas não na formação de associações entre um estímulo auditivo e um US aversivo. Isso culminaria com os prejuízos

encontrados por ratos lesados quanto às respostas de congelamento no teste de medo condicionado ao contexto, mas não ao som. Os resultados ainda sugerem que este prejuízo é severo quando o ambiente ou contexto em questão prediz a ocorrência de um estímulo aversivo com valor “intermediário”, mas é moderado quando prediz um estímulo com valor aversivo “maior”. Ou seja, parece que o BL seria necessário para a aquisição da associação Pavloviana entre um contexto e um estímulo aversivo, mas que não seria o único a participar desse processo, isto é, outros núcleos amigdalares ou regiões extra-amigdalares estariam envolvidos também na formação dessa associação. Alternativamente, ou em paralelo, também é possível que a atividade dos neurônios do BL que “sobreviveram” ao procedimento de indução da lesão contribuiu de alguma forma no estabelecimento dessa associação. Nesse contexto, Calandreau e colaboradores (2005) recentemente reportaram que o LA exerce um papel importante tanto para a aquisição do condicionamento clássico aversivo ao som quanto na aquisição do condicionamento ao contexto. Esses autores sugeriram que a contribuição do funcionamento do LA sobre o condicionamento ao contexto seria dependente do grau de predictibilidade relativa das pistas ambientais sobre a pendência do US. Ou seja, no condicionamento clássico aversivo ao contexto, o funcionamento do LA competiria com o do BL no caso de um determinado estímulo (e.g., um som) estabelecer uma predição temporal mais precisa sobre a ocorrência do US do que o próprio contexto. Por outro lado, o funcionamento do LA cooperaria com o do BL para a formação de associações entre um contexto e um estímulo aversivo no caso de o próprio contexto ser a pista mais eficiente para a predição da pendência do US. Apesar de o BL ser o principal alvo de informações contextuais ou polimodais dentro da amígdala, o LA e o BM também recebem projeções, embora menos densas, provenientes da formação hipocampal e de outras regiões que transmitem informações polimodais. Portanto, é possível que o LA e/ou o BM também participem da formação de associações Pavlovianas entre a representação de um contexto e o valor motivacional de um estímulo aversivo.

No caso da interpretação de que o BL estaria envolvido de forma importante na formação de associações entre um contexto e o estímulo aversivo durante o condicionamento

clássico aversivo, pode-se sugerir que essas informações processadas no BL seriam transmitidas ao Ce, direta ou indiretamente, o qual modularia a produção de respostas de medo – incluindo a de congelamento – através de suas conexões com o hipotálamo e o tronco encefálico; e em se tratando particularmente da resposta de congelamento, através das suas projeções para a substância cinzenta periaquedutal (LeDoux, 1995; Rogan e LeDoux, 1996; Armony e LeDoux, 1997; Davis, 2000 para revisão). Como já mencionado, o Ce é o núcleo amigdalár que estabelece as mais densas conexões com o hipotálamo e tronco encefálico (ver Pitkänen, 2000 para revisão), e por conseguinte, é considerado por alguns autores como a porta de saída de informações processadas na amígdala para a geração de respostas autonômicas, endócrinas e comportamentais através dessas projeções (ver LeDoux, 2000, para revisão). Alguns trabalhos contribuem para essa idéia ao reportarem prejuízo de desempenho da resposta de congelamento nos testes de medo condicionado ao som e ao contexto após lesões eletrolíticas ou neurotóxicas do Ce (Roozendaal *et al.*, 1991; Campeau e Davis, 1995; Goossens e Maren, 2001; Nader *et al.*, 2001). Entretanto, recentemente Koo e colaboradores (2004) mostraram que danos eletrolíticos seletivos ao Ce resultaram em severos prejuízos quanto à produção de resposta de congelamento nos testes de medo condicionado ao som e ao contexto, ao passo que danos neurotóxicos seletivos do mesmo núcleo levaram somente a prejuízos moderados quanto a essa mesma resposta no teste de medo condicionado ao som, mas não ao contexto. Diante desses resultados, os autores sugeriram uma nova proposta em adição ao modelo serial de transmissão de informação do BLA para o Ce, e deste para o hipotálamo e o tronco encefálico no controle de respostas de medo, proposto pelo grupo de LeDoux (ver LeDoux, 2000 para revisão). Koo *et al.* (2004) sugeriram que, adicionalmente, informações processadas particularmente pelo BL poderiam ser transmitidas diretamente para o núcleo insterstial da estria terminal, e daí para a zona hipotalâmica medial, a qual por sua vez se projeta diretamente e densamente para a substância cinzenta periaquedutal (Dong *et al.*, 2001 e Canteras, 2002 *apud* Koo *et al.*, 2004). Assim, a atividade do BL poderia modular a produção de respostas de congelamento independentemente do funcionamento do Ce. Esses autores sugeriram ainda que lesões eletrolíticas ou até mesmo algumas lesões neurotóxicas

(em certas circunstâncias) do Ce levariam aos graves prejuízos quanto à produção de respostas de congelamento nos testes de medo condicionado, exatamente por danificar fibras de passagem oriundas do BL que atravessam o Ce e atingem o núcleo intersticial da estria terminal (Smith e Millhouse, 1985 *apud* Koo *et al.*, 2004). Diante disso, é possível admitir também que informações processadas no BL, sobre as associações entre o contexto e o estímulo aversivo, seriam transmitidas à substância cinzenta periaquedutal, via o núcleo intersticial da estria terminal e o hipotálamo, controlando a produção das respostas de congelamento, independentemente do Ce.

Além de participar desses processos associativos envolvendo pistas contextuais evidenciado pelo nosso e por outros trabalhos (Yaniv *et al.*, 2004 e Calandreau *et al.*, 2005), o BL parece ser fundamental também em situações de condicionamento nas quais o animal deve **executar uma resposta** motora a fim de se ter acesso ou impedir a ocorrência de um US ou de um CS (neste último caso, fala-se em reforçamento condicionado). Por exemplo, Killcross e colaboradores (1997) verificaram que ratos com lesão do BLA foram incapazes de se esquivar de um CS visual aversivo por comportamento operante “voluntário”, mas exibiram supressão do comportamento de aproximação ao CS de forma semelhante aos controles. Diferentemente, a lesão seletiva do Ce levou ao padrão inverso de resultados. Ademais, Amorphant e colaboradores (2000) reportaram que a lesão eletrolítica seletiva do BL teve por consequência um prejuízo de desempenho no teste de esquiwa ativa envolvendo um CS auditivo, mas não quanto à produção de respostas de congelamento. Mais ainda, observaram que a lesão seletiva do LA resultou em prejuízos comportamentais nas duas situações de teste. Esses últimos autores sugeriram que o funcionamento do LA, portanto, seria necessário para a associação entre um CS auditivo e um US, e que projeções do LA para o Ce mediarão as reações Pavlovianas condicionadas, ao passo que as projeções do LA para o BL mediarão o reforçamento condicionado de uma dada ação ou resposta motora. Acredita-se que o BL mediará a produção de respostas motoras nessas situações de condicionamento através de suas grandes projeções para o estriado ventral (Everitt e Robbins, 1992; Everitt *et al.*, 1999; Kelley *et al.*, 1982 e Johnson *et al.*, 1994 *apud* Hitchcott & Phillips, 1998; Swanson &

Petrovich, 1998). Os resultados do nosso trabalho, portanto, conflitam com a hipótese levantada por Killcross *et al.* (1997) e por Amorphant *et al.* (2000) de que o BL seria importante em situações de condicionamento que envolveriam a produção de respostas operantes, mas não a eliciação de respostas do tipo Pavlovianas. Diferentemente, os resultados do presente trabalho indicam que o funcionamento do BL é crítico para o desempenho de respostas Pavlovianas de medo, ao menos as de congelamento.

Neste mesmo contexto, é possível até ousar uma interpretação de que o BL poderia estar envolvido no processamento de informações contextuais ou polimodais não somente no estabelecimento de associações estímulo-reforço *per se*, mas selecionando um tipo de resposta mais adequada ao CS. Ou seja, o processamento das informações polimodais no BL seria importante também para a “avaliação” do contexto que permearia uma dada situação durante a experiência com o CS. Quando exposto à situação de teste, o animal é apresentado a uma série de estímulos que informam sobre quais respostas seriam as mais apropriadas dentro daquele cenário. Nesse sentido, o BL participaria de processos que capacitariam o animal avaliar que tipos de respostas seriam mais adequadas frente a uma dada situação envolvendo o CS. Por exemplo, em função do padrão de informações que atingiriam o BL, a atividade desse núcleo fortaleceria determinadas conexões (e.g., com o estriado) no sentido da produção de respostas do tipo operantes ou, alternativamente, fortaleceria outras conexões (e.g., com o Ce, núcleo intersticial da estria terminal ou hipotálamo) no sentido da produção de respostas do tipo Pavlovianas. No entanto, não podemos ser assertivos quanto a essa interpretação já que nenhum trabalho foi realizado até o momento na tentativa de se esclarecer essa idéia.

Diferentemente do condicionamento clássico aversivo ao contexto, o presente conjunto de experimentos sugere que o BL não está envolvido criticamente na aquisição ou no desempenho do medo condicionado ao som. Isso não implica que o BL não possa participar de alguma forma do estabelecimento de associações entre um estímulo sonoro e um evento aversivo, ou mesmo do controle das respostas de congelamento frente a um CS auditivo, mas sugere que o funcionamento desse núcleo amigdalár não é fundamental para esses processos: eles poderiam ser desempenhados por outras regiões mesmo na ausência do

BL. Como indicam os dados hodológicos, neurofisiológicos e comportamentais já mencionados, o LA e até mesmo o Ce são os principais candidatos a participar desses processos.

Portanto, a dissociação de desempenho nos testes de medo condicionado ao som e ao contexto resultante das lesões neurotóxicas e seletivas do BL sugerem que esse núcleo amigdalár seria um sítio de plasticidade neural necessário para associação entre as representações sensoriais de um estímulo e o valor motivacional de um evento aversivo, quando o CS envolve pistas contextuais, mas não auditivas. No entanto, apesar de importante para esse tipo de aprendizagem, o BL parece não ser a única região que participa desse tipo de processo. Alternativamente a essa idéia do envolvimento do BL no estabelecimento de associações CS-US, pode-se inferir que o funcionamento do BL seria necessário para a eliciação de respostas de congelamento em situações de condicionamento aversivo envolvendo pistas contextuais, mas não auditivas.

7.2. A lesão neurotóxica e seletiva do núcleo basal da amígdala e o desempenho na tarefa de contraste antecipatório de incentivo

Os resultados apresentados no presente trabalho sugerem que a lesão neurotóxica e seletiva do BL não prejudica a aquisição do efeito de contraste antecipatório de incentivo na versão inter-sujeitos da tarefa ou mesmo numa versão intra-sujeitos envolvendo uma discriminação elemental ou configuracional das condições experimentais (sacarina-sacarina ou sacarina-sacarose). Isso porque, em todas essas situações, ratos lesados no BL, assim como os controle-operados, apresentaram o consumo da primeira solução (sacarina 0,15%) diminuído quando os estímulos ambientais (ou a própria primeira solução, no caso da versão inter-sujeitos) indicavam a pendência de uma solução preferida (sacarose 32%) em comparação com a condição controle, na qual a solução de sacarina 0,15% era seguida também de sacarina 0,15%.

Em particular na versão intra-sujeitos da tarefa de contraste antecipatório envolvendo discriminação elemental (Experimentos 2 e 4) verificou-se que ratos controle-operados e lesados exibiram o efeito de contraste tanto na primeira fase, onde as diferentes condições experimentais eram apresentadas em dias alternados e sinalizados pelas pistas discriminativas, quanto na fase subsequente, na qual os animais eram submetidos às diferentes condições de treino em dias randomizados mas ainda sinalizadas pelas respectivas pistas. Esses resultados indicam, portanto, que ratos controle-operados e lesados no BL se valeram do “arranjo elemental” das pistas, mais do que da alternância diária das duas condições experimentais presentes na primeira fase da tarefa, para a discriminação das diferentes condições de treino e, por conseguinte, para a aquisição do efeito de contraste.

Já em se tratando da mesma tarefa na versão intra-sujeitos envolvendo discriminação configuracional (Experimento 4), observamos que ratos controle-operados e lesados apresentaram o efeito de contraste antecipatório na primeira etapa, onde, da mesma forma que na situação descrita acima, os animais eram expostos às duas condições de treino em dias alternados e sinalizadas pelas pistas discriminativas. No entanto, na fase subsequente, quando as diferentes condições experimentais eram apresentadas em dias randomizados, mas ainda sinalizadas por suas respectivas pistas, os testes estatísticos evidenciaram o efeito de contraste antecipatório somente quando o consumo da primeira solução de **todos** os sujeitos (controle-operados e lesados) foi submetido à análise, porém não foram sensíveis à ocorrência significativa do mesmo efeito quando os dados de ratos lesados e controle-operados foram analisados individualmente. Portanto, a diferença entre o consumo das primeiras soluções entre os dias de condição sacarina-sacarina e sacarina-sacarose apresentou-se moderada, porém não significativa, tanto para controles quanto para lesados na segunda etapa da tarefa, na qual as duas condições experimentais eram apresentadas em dias randomizados e sinalizadas pelas pistas configuracionais. Apesar disso, o efeito de contraste antecipatório se mostrou significativo quando as condições foram apresentadas em dias alternados sob o mesmo tipo de sinalização. Dessa forma, parece que os ratos submetidos à sinalização pelo “arranjo configuracional” durante a tarefa de contraste antecipatório intra-sujeitos podem ter

se valido também da alternância diária das condições experimentais para a antecipação da solução pendente em cada sessão, em adição à utilização das pistas ambientais discriminativas. O mesmo não ocorreu para os ratos expostos à situação de discriminação elemental, isto é, neste caso, o efeito de contraste foi significativo mesmo quando as condições experimentais foram apresentadas em dias randomizados, e portanto, os animais parecem ter utilizado, preferencialmente, as pistas ambientais para a antecipação da condição de cada sessão do que a sinalização temporal. Em geral, o aprendizado de uma discriminação configuracional requer um treino mais prolongado do que o de uma discriminação elemental, possivelmente por ser mais complexo; e apesar de termos empregado um número maior de sessões para o grupo submetido à discriminação configuracional do que para o grupo que recebeu a situação de discriminação elemental, possivelmente o número de apresentações das condições sob “sinalização configuracional” durante a primeira fase não tenha sido suficientemente grande para o estabelecimento adequado do efeito de contraste.

Os resultados ainda mostraram que ratos controle-operados e lesados também apresentaram desempenhos semelhantes durante a fase de desvalorização seletiva da sacarose (Experimento 4). Isto é, ratos que receberam pareamento da ingestão da solução de sacarose com um mal-estar, provocado pela injeção i.p. de LiCl, diminuíram significativamente o consumo da sacarose em comparação com os ratos que receberam o tratamento controle (i.e., pareamento com injeção de salina), e mais ainda, apresentaram uma desvalorização seletiva à sacarose, mantendo inalterado o consumo da solução de sacarina. Além do mais, nos ratos que receberam o tratamento com LiCl, o consumo da sacarose **não diferiu** significativamente em relação ao consumo da sacarina na última sessão do teste de desvalorização da sacarose, ao passo que ratos que foram submetidos ao tratamento com salina exibiram, no mesmo dia de teste, o consumo da sacarose significativamente maior que o de sacarina. Também quanto a este último padrão de resultados, os animais lesados apresentaram comportamento similar aos ratos controle-operados.

Na fase subsequente de teste, na qual os animais foram novamente submetidos às condições sacarina-sacarina e sacarina-sacarose devidamente sinalizadas, ratos controle-

operados e lesados que haviam sido previamente submetidos à desvalorização seletiva da sacarose pelo pareamento dessa solução com um mal-estar, apresentaram uma tendência, embora não significativa, de consumir menos da primeira solução na sessão em que havia sinalização da pendência da solução de sacarose em comparação com a sessão em que havia sinalização da pendência da solução de sacarina, ou seja, mostraram uma tendência em continuar apresentando o efeito de contraste antecipatório de incentivo. Da mesma forma, para ratos controle-operados e lesados que haviam recebido previamente o tratamento controle (pareamento da sacarose com salina) o efeito de contraste antecipatório de incentivo também apareceu nessa fase de teste como uma tendência não significativa em termos estatísticos. Verificou-se ainda, que ratos controle-operados e lesados que haviam recebido pareamento da sacarose com mal-estar apresentaram, na fase de teste, o consumo da primeira solução na condição sacarina-sacarose semelhante ao dos ratos que haviam recebido o tratamento com salina. Ademais, os testes estatísticos foram sensíveis à ocorrência (significante) do efeito de contraste antecipatório quando o consumo da primeira solução de **todos** os sujeitos (controle-operados e lesados submetidos aos dois tratamentos) foi submetido à análise. Ou seja, é possível que essa tendência para a ocorrência do efeito de contraste antecipatório não tenha atingido significância estatística, tanto em ratos submetidos ao tratamento com LiCl como em ratos expostos ao procedimento controle, por conta do pequeno número amostral dos grupos envolvidos. Notou-se ainda que, congruentemente com o obtido nas fases de treino anteriores, o efeito de contraste no teste só ocorreu para o grupo de ratos que foi submetido à situação de discriminação elemental, mas configuracional.

Além disso, de acordo com o observado na fase anterior, os ratos que haviam sido expostos à desvalorização seletiva da sacarose apresentaram o consumo da segunda solução de sacarose significativamente menor que os animais que haviam recebido o tratamento controle. No entanto, diferentemente da fase anterior do teste, embora o consumo da segunda solução de sacarose tenha diminuído nos ratos que receberam o tratamento com LiCl, ele ainda se mostrou maior que o consumo da segunda solução de sacarina, nos mesmos animais.

Dessa forma, os resultados indicaram que ratos controle-operados expostos à situação de discriminação elemental continuaram apresentando o efeito de contraste antecipatório de incentivo, embora moderado, mesmo após a desvalorização seletiva da solução preferida. No entanto, o mesmo não foi observado para os ratos controles submetidos à sinalização das diferentes condições experimentais por um “arranjo configuracional”. De fato, a ausência do efeito de contraste antecipatório nesta última situação é congruente com o desempenho dos mesmos animais nas etapas iniciais da tarefa, onde o efeito de contraste, embora moderado, não atingiu significância estatística. É possível que neste caso, o aprendizado do efeito de contraste – que era dependente da discriminação configuracional – não foi efetivamente estabelecido na fase inicial do treino, e conseqüentemente, não apareceu na última etapa do teste por conta da complexidade envolvida neste tipo de discriminação e de um número de sessões de treino insuficiente para o seu devido aprendizado. De qualquer forma, o desempenho de ratos lesados no BL quanto ao efeito de contraste antecipatório apresentou-se semelhante ao de ratos controles em todas essas circunstâncias.

A tarefa de contraste antecipatório de incentivo consiste, basicamente, de uma situação em que um evento disponível com determinado valor de incentivo é comparado com um segundo, de valor de incentivo diferente (maior) que ocorrerá a seguir. Ademais, o contraste antecipatório de incentivo reflete a decisão do animal de consumir uma recompensa disponível no momento ou esperar para consumir uma outra de maior valor de incentivo, que ocorrerá no futuro (Flaherty, 1996). É plausível pensar que durante o desempenho na tarefa de contraste antecipatório de incentivo, determinados estímulos (ambientais ou a própria primeira solução) exerceriam a função de estímulos condicionados (CS), através dos quais o animal seria capaz de evocar o valor motivacional da recompensa pendente. A representação sobre o valor de incentivo da segunda recompensa, evocada por um CS, seria então comparada com a representação do valor corrente da primeira recompensa, e no caso da condição sacarina-sacarose, isso resultaria na supressão do consumo da primeira solução, por esta exibir menor valor de incentivo que a solução pendente. Desta forma, essa interpretação

sugere que a tarefa de contraste antecipatório de incentivo requereria o aprendizado de associações do tipo estímulo-reforço.

Como já mencionado, as mais influentes teorias sobre a função do BLA sugerem seu envolvimento no aprendizado sobre associações estímulo-reforço (Weiskrantz, 1956; Gaffan & Harrison, 1987; Gaffan *et al.*, 1988, Cardinal *et al.*, 2002 e Baxter & Murray, 2002 para revisão). Nesse processo, o BLA seria requerido para que um estímulo condicionado ganhasse acesso ao valor motivacional corrente de um estímulo específico, ao qual ele havia sido pareado ou apresentado de forma a informar sobre a sua ocorrência. Mais ainda, com base em dados hodológicos e neurofisiológicos, seria possível supor que o BL, em particular, participaria do estabelecimento de associações entre a representação configuracional de um dado estímulo (ou conjunto de estímulos) e o valor motivacional de um segundo estímulo, mas não na formação desse tipo de associações envolvendo representações elementais de um CS.

Portanto, de acordo com essas interpretações, o BL poderia participar da aquisição do efeito de contraste antecipatório de incentivo especialmente em situações em que estímulos contextuais ou representações configuracionais fossem fundamentais para a evocação do valor de incentivo da recompensa pendente. E sendo assim, seria natural hipotetizar que a lesão seletiva do BL resultaria em um prejuízo de desempenho na tarefa de contraste antecipatório de incentivo intra-sujeitos envolvendo discriminação configuracional, mas não elemental, das condições experimentais (sacarina-sacarina ou sacarina-sacarose).

Os resultados mostraram que ratos lesados no BL adquiriram o efeito de contraste antecipatório de incentivo na versão **inter-sujeitos** da tarefa (Experimento 4) tal como os seus controle-operados. De acordo com a interpretação delineada acima, nos parece plausível a ausência de prejuízo de desempenho encontrada na tarefa de contraste antecipatório inter-sujeitos após lesão seletiva do BL, uma vez que ratos lesados não seriam capazes de evocar a representação do valor de incentivo da solução pendente por meio de estímulos contextuais, mas o fariam normalmente por meio de estímulos ambientais discretos. Ou seja, durante o treino na versão inter-sujeitos da tarefa de contraste antecipatório, grupos diferentes de

animais seriam expostos a apenas uma das condições experimentais (sacarina-sacarina ou sacarina-sacarose), e portanto, cada grupo poderia se valer da primeira solução ou de qualquer pista ambiental (sendo ela discreta ou contextual) para a evocação do valor de incentivo da solução pendente, e por conseguinte, para o desempenho adequado na tarefa. Da mesma forma, a ausência de prejuízo de aquisição da tarefa de contraste antecipatório de incentivo em uma versão **intra-sujeitos** envolvendo discriminação **elemental** das diferentes condições de treino (Experimentos 2 e 4) parece estar em conformidade com a hipótese levantada. Nesta situação, onde as duas condições experimentais são experienciadas por cada animal, ratos lesados no BL seriam capazes de utilizar o “arranjo elemental” da sinalização discriminativa das diferentes condições de treino para acessar o valor de incentivo da solução pendente e, portanto, adquirir o efeito de contraste. Entretanto, a ocorrência de um moderado efeito de contraste antecipatório em ratos lesados, tal como em ratos controle-operados, na versão **intra-sujeitos** da tarefa de contraste envolvendo discriminação **configuracional** das diferentes condições experimentais (Experimento 4) sugere que ratos lesados no BL foram capazes de utilizar também o “arranjo configuracional” das pistas para a aquisição da tarefa, em desacordo com a nossa interpretação inicial.

Apesar de ratos lesados no BL terem exibido o efeito de contraste antecipatório de incentivo sob “sinalização configuracional” das diferentes condições experimentais, tal qual os seus controle-operados, os resultados não necessariamente permitem a afirmação de que isso se deu pelo fato de os ratos lesados terem sido capazes de acessarem o valor de incentivo da solução pendente por meio da representação configuracional das pistas, ou seja, de terem sido capazes de estabelecer associações do tipo estímulo-reforço envolvendo representações configuracionais do CS. Isso porque os resultados deste trabalho não levam a uma sugestão categórica sobre o real requerimento da formação de associações estímulo-reforço na aquisição do efeito de contraste antecipatório de incentivo, mesmo em animais normais, como será discutido adiante.

Diversos estudos têm empregado o procedimento de desvalorização seletiva do reforço em tarefas comportamentais, seja ela produzida por meio do pareamento do reforço com um

mal-estar induzido ou por meio da saciação com o reforço, na tentativa de se avaliar efeitos de danos amigdalares e de outras estruturas em aspectos específicos do aprendizado de associações estímulo-reforço, ou seja, na capacidade de um estímulo acessar a representação do valor corrente de um dado reforço (Hatfield *et al.*, 1996; Málková *et al.*, 1997; Pickens *et al.*, 2003; Blundell *et al.*, 2003; Balleine *et al.*, 2003). Por exemplo, ratos que recebem pareamento da ingestão de uma recompensa com um mal-estar diminuem a resposta condicionada ao CS que havia sido previamente associado à apresentação daquela recompensa, em comparação com ratos que recebem pareamento da recompensa com salina (Hatfield *et al.*, 1996). Ou seja, parece que o CS evoca a representação do valor de incentivo **corrente** do estímulo (US) ao qual foi previamente associado, já que a redução do valor de incentivo do alimento, que ocorreu através de seu pareamento com um mal-estar, leva a uma diminuição das respostas condicionadas. Mais ainda, ratos lesados no BLA não apresentam essa redução das respostas condicionadas após a desvalorização do reforço, indicando, como já mencionado, que essa estrutura parece ser importante na formação de representações que associam pistas às propriedades de incentivo do reforço (Hatfield *et al.*, 1996). Nota-se também, nos estudos envolvendo desvalorização do reforço, que a lesão do BLA não interfere sobre os processos de atribuição de valor de incentivo ao reforço, uma vez que ratos lesados no BLA diminuem o consumo da recompensa após a sua desvalorização de forma semelhante aos seus controles. É importante notar que o mesmo foi observado no presente trabalho, ou seja, ratos com lesões seletivas do BL apresentaram redução do consumo da solução da sacarose tal qual os controle-operados, após a sua desvalorização.

Diante deste contexto, inicialmente pareceu plausível pensar que se a aquisição do efeito de contraste antecipatório de incentivo envolvesse associações do tipo estímulo-reforço, ao submetermos animais normais à desvalorização da sacarose após o treinamento na tarefa de contraste antecipatório intra-sujeitos, e posteriormente, ao retreino na mesma situação, constataríamos uma redução do efeito de contraste, uma vez que a sacarose passaria a exibir menor valor de incentivo. No entanto, não foi o que verificamos: como já mencionado, ratos normais expostos ao “arranjo elemental” das pistas discriminativas, que foram submetidos à

desvalorização seletiva da sacarose, continuaram apresentando um moderado efeito de contraste antecipatório de incentivo na última fase do teste. E portanto, diferentemente da hipótese inicial levantada, esse resultado pode sugerir que a modulação do consumo da primeira solução durante a tarefa de contraste antecipatório de incentivo não envolveria a formação de associações do tipo estímulo-reforço, uma vez que a antecipação do valor de incentivo diminuído da solução de sacarose, após o seu pareamento com um mal-estar, não foi eficiente na alteração do padrão de resposta frente a esta solução, em animais normais. Ou seja, a evocação do valor de incentivo corrente da recompensa pendente, através de estímulos ambientais, não teve influência relevante sobre a expressão do efeito de contraste antecipatório de incentivo.

Apesar disso, esses resultados não implicam que a tarefa de contraste antecipatório de incentivo não envolva, de qualquer forma, o aprendizado de associações estímulo-reforço. Esses resultados somente sugerem que a evocação do valor motivacional da segunda solução, através de estímulos ambientais condicionados, não controlaria o **comportamento consumatório relativo à primeira solução**, durante a tarefa. Entretanto, essa predição poderia controlar outras respostas. Por exemplo, em uma tarefa de contraste antecipatório não-consumatório onde os animais eram apresentados a duas condições de treino envolvendo múltiplos esquemas de reforçamento, A-X e B-Y, sendo o esquema de reforçamento em A equivalente ao de B, X um esquema de extinção, e Y um esquema com taxa maior de reforçamento, verificou-se que apesar de a taxa de respostas em A ser maior do que em B quando as duas condições de treino eram apresentadas independentemente (efeito de contraste), os animais exibiram uma taxa de respostas maior em B do que em A quando tiveram a oportunidade de escolha entre os dois esquemas de reforçamento. Portanto, parece que nessa situação, as pistas que sinalizavam a pendência do melhor esquema de reforçamento funcionaram como reforçadores condicionados mais poderosos, resultando em uma taxa de respostas maior no esquema correspondente. Assim, é plausível sugerir que na tarefa de contraste antecipatório de incentivo, apesar de as pistas ambientais não controlarem o consumo da primeira solução através do acesso ao valor de incentivo corrente da segunda

solução, elas poderiam controlar outras respostas. Ou seja, a tarefa de contraste antecipatório de incentivo envolveria também o aprendizado de associações do tipo estímulo-reforço, porém ele não seria o mecanismo primordialmente relevante no controle do consumo da primeira solução, isto é, do efeito de contraste antecipatório.

Por outro lado, se a mesma tarefa envolvesse uma aprendizagem de associações do tipo estímulo-resposta, num primeiro momento do teste imediatamente após a desvalorização da sacarose, sujeitos normais produziram o mesmo comportamento anteriormente aprendido, isto é, de refrear o consumo da primeira solução. Segundo teorias vigentes, quando a aprendizagem de uma tarefa comportamental se dá por associações do tipo estímulo-resposta, o desempenho do animal é sensível ao valor do reforço somente quando ele tem **experiência** com o reforço, não sendo o animal capaz de acessar a memória sobre a representação do valor corrente de um reforço que ocorrerá no futuro. Isso porque neste tipo de aprendizagem, um evento reforçador atua fortalecendo a associação de um estímulo discriminativo com uma resposta, mas não com as suas próprias representações (ver Balleine e Dickinson, 1998 e Dayan e Balleine, 2002). Desta forma, os resultados do presente trabalho podem levar a esta segunda interpretação, isto é, de que a aprendizagem do efeito de contraste antecipatório de incentivo se daria, primordialmente, pela formação de associações do tipo estímulo-resposta, ou em outras palavras, pelo estabelecimento de um hábito. Neste caso, uma determinada pista discriminativa evocaria a produção de um certo padrão de respostas, o qual teria sido selecionado pela experiência prévia do animal com o pareamento da primeira com a segunda solução. Ou seja, o pareamento das duas soluções levaria à relativização dos valores de incentivo das duas recompensas, que ocorreria ao longo das sessões de treino, e possivelmente controlaria diretamente as respostas consumatórias do animal. Essas respostas seriam, então, associadas com as pistas discriminativas em cada uma das condições experimentais. Assim, com o treino, os estímulos discriminativos da condição sacarina-sacarose eliciariam um determinado conjunto de respostas que resultaria na supressão do consumo da primeira solução, ao passo que as pistas discriminativas da condição sacarina-sacarina eliciariam um outro padrão de respostas que levaria ao consumo aumentado da primeira solução em

comparação com a outra condição de treino. Além do mais, na sessão de teste após a desvalorização da sacarose, os animais continuariam refreando o consumo da primeira solução, no caso da condição sacarina-sacarose, exatamente porque a resposta eliciada não seria passível de modulação pela representação do valor de incentivo corrente da sacarose pendente, mas poderia ser somente alterada em função da **experiência** com o “novo” valor motivacional da sacarose, ou seja, em função de um treino adicional na tarefa envolvendo o valor aversivo da solução.

Ademais, animais com lesão da amígdala adquirem normalmente tarefas comportamentais que podem ser desempenhadas através do estabelecimento de associações do tipo estímulo-resposta (McDonald e White, 1993; White e McDonald, 2002; McDonald e Hong, 2004; Blundell *et al.*, 2001; Malkova *et al.*, 1997; Baxter e Murray, 2002). Portanto, nossos resultados seriam congruentes com esses achados: o desempenho na tarefa de contraste antecipatório de incentivo não seria alterado pela lesão seletiva do BL da mesma forma que a lesão do BLA não interfere sobre a aquisição de outras situações comportamentais que envolvem também o aprendizado de associações estímulo-resposta.

Por outro lado, é possível hipotetizar que a aquisição do efeito de contraste antecipatório de incentivo envolvesse um processo semelhante ao que se denomina “aprendizado sobre incentivo” (do inglês “*incentive learning*”). O conceito de aprendizado sobre incentivo têm sido aplicado para situações de condicionamento operante, e consiste no aprendizado sobre o valor de incentivo de uma dada recompensa que se dá pelo contato consumatório com esse reforço depois de ter ocorrido uma mudança no estado motivacional do animal (Dayan e Balleine, 2002, para revisão). Por exemplo, Dickinson e Dawson (1988), ao treinarem ratos a pressionar uma barra para ter acesso a uma solução de sacarose ou a puxar uma corrente para adquirir uma bolota de ração, verificaram que os ratos, depois de expostos à privação de água, não modificaram prontamente o seu comportamento no sentido de executar mais a ação que produziria a solução de sacarose, mas ao contrário, continuaram efetuando as duas respostas com taxas equivalentes. No entanto, se aos animais fosse permitido consumir das duas recompensas num estado de privação de água logo antes da

sessão de teste, subseqüentemente eles passavam a exibir mais a resposta que produziria a solução de sacarose do que a bolota de ração. Ou seja, o animal modifica seu comportamento operante somente depois que ele tem a oportunidade de experienciar ou consumir o reforço sob o novo estado motivacional. De acordo com a teoria do aprendizado sobre incentivo, é como se o animal tivesse que aprender sobre o significado de um dado reforço em diferentes estados motivacionais através da experiência com ele nesses respectivos estados (Balleine e Dickinson, 1998). Um raciocínio semelhante pode ser aplicado à tarefa de contraste antecipatório de incentivo: nesta situação, o animal aprenderia sobre os valores relativos das recompensas através da experiência com a relação que é estabelecida entre elas. O valor relativo da primeira solução, na tarefa de contraste, não seria dado pela antecipação diária do valor motivacional da solução pendente e a subseqüente comparação do valor motivacional da solução corrente com a representação do valor motivacional da solução pendente. Diferentemente, o valor de incentivo relativo da primeira solução seria aprendido, e modulado diariamente, através da experiência do animal com o pareamento das soluções, e por conseguinte, com o estado motivacional resultante desse pareamento.

Esta última interpretação aparentemente é a mais parcimoniosa, uma vez que os resultados do nosso trabalho indicam que o consumo da primeira solução parece se dar de uma forma bastante flexível, diferentemente das respostas geradas por um hábito, isto é, pelo aprendizado de associações estímulo-resposta. Os resultados sugerem que a seqüência de apresentação das condições de treino interferem sobre o consumo da primeira solução numa dada condição. Por exemplo, o consumo da primeira solução na condição sacarina-sacarina aumenta a medida que essa mesma condição vai sendo apresentada em seqüência. E o consumo nessa mesma condição decai logo depois que o animal é exposto à condição sacarina-sacarose. Ou seja, parece que o comportamento consumatório relativo à primeira solução não é gerado como um “programa pronto”, de uma forma inflexível semelhante a um hábito, mas ao contrário, parece ser modulado de forma bastante plástica pela experiência prévia do animal com a relação entre as recompensas.

Ademais, a amígdala parece não estar envolvida no aprendizado relativo à atribuição de valor reforçador (hedônico e de incentivo) a recompensas, mas diferentemente, parece participar da formação de associações entre estímulos e o valor reforçador de um evento com significado biológico (ver Rolls, 1999). Assim, a ausência de prejuízo de desempenho por ratos com lesão do BL na tarefa de contraste antecipatório de incentivo seria congruente com a interpretação de que o efeito de contraste antecipatório seria dependente do aprendizado sobre o valor de incentivo relativo das soluções em função da experiência do animal com a relação estabelecida entre elas, e não do aprendizado de associações entre estímulos ambientais e o valor de incentivo da recompensa pendente.

De qualquer forma, os resultados sugerem que o comportamento consumatório relativo à primeira solução durante a tarefa de contraste antecipatório de incentivo não é diretamente controlado pela antecipação diária das propriedades motivacionais da recompensa que ocorrerá no futuro, mas parece ser mais sensível à experiência prévia com a relação que se estabelece entre as duas recompensas e também com a sinalização discriminativa correspondente. Ou seja, de acordo com a hipótese relacionada ao aprendizado sobre incentivo, as pistas discriminativas sinalizariam sobre o valor relativo da primeira solução, o qual não seria dado pela antecipação diária do valor motivacional da segunda solução, mas pela história prévia do animal com a relação entre as duas recompensas. Já de acordo com a hipótese da associação estímulo-resposta, as pistas discriminativas informariam sobre um padrão de respostas motoras selecionado pela experiência prévia do animal com o pareamento entre duas recompensas. Essas interpretações são contrárias àquela proposta por Flaherty e Rowan (1985), que sugere que o efeito de contraste antecipatório seria resultante da efetiva antecipação diária do valor de incentivo da solução pendente, e da subsequente comparação da representação do valor de incentivo da solução pendente com a da recompensa corrente. Essa idéia baseou-se nos resultados de um experimento mostrando que o efeito de contraste antecipatório de incentivo ocorre mesmo em uma versão intra-sujeitos da tarefa, onde as condições sacarina-sacarina e sacarina-sacarose são apresentadas em dias alternados e sinalizadas por diferentes pistas discriminativas. Segundo a interpretação desses autores, se o

efeito de contraste antecipatório fosse baseado na memória de ter recebido sacarose no dia anterior, o consumo da primeira solução de sacarina seria diminuído em dias de condição sacarina-sacarina; mas se o efeito de contraste fosse resultado da antecipação diária da solução preferida, o consumo da sacarina seria suprimido em dias de condição sacarina-sacarose, que é de fato o que ocorre. Diferentemente, segundo nossa proposta, o efeito de contraste não seria resultado da antecipação da solução pendente, mas sim da antecipação do valor relativo da primeira solução (que é estabelecido pela experiência do animal, e não pela antecipação diária do valor motivacional da segunda solução), ou alternativamente, da evocação de um conjunto de respostas motoras selecionado pela experiência prévia do animal com a relação entre as duas recompensas. Ademais, nossa interpretação também implica que o efeito de contraste antecipatório não é resultado da memória sobre o valor de incentivo da última solução recebida, e da comparação dessa representação com o valor da recompensa corrente.

Por outro lado, os resultados também podem levar à interpretação de que o efeito de contraste antecipatório de incentivo continuou ocorrendo nos sujeitos expostos à desvalorização seletiva da sacarose simplesmente porque os animais, apesar de terem mostrado uma desvalorização significativa da sacarose, ainda apresentaram uma preferência por esta solução em comparação com a solução de sacarina. Apesar de os ratos controles e lesados, durante a fase de desvalorização seletiva da sacarose, terem apresentado o consumo da sacarose semelhante ao consumo da sacarina nas últimas exposições a essas soluções, observamos que na fase subsequente de teste, o consumo da sacarose mostrou-se maior que o da segunda solução de sacarina. Vale a pena lembrar que, na etapa de desvalorização seletiva da sacarose, o último registro do consumo da sacarose foi imediatamente anterior ao seu último pareamento com o mal-estar (LiCl), e portanto, se nessa fase, o último registro do consumo da sacarose se assemelhou ao último registro do consumo da sacarina, é muito provável que após o último pareamento com o mal-estar, o valor motivacional da sacarose tenha atingido ainda um nível inferior ao do valor da sacarina. No entanto, como mencionamos, isso não foi exatamente o observado na fase subsequente de teste, isto é, nessa

última fase, apesar de o consumo da solução de sacarose ter sido significativamente menor em ratos tratados com LiCl do que em ratos tratados com salina, o consumo da sacarose foi maior que o da segunda solução de sacarina mesmo em ratos que haviam sido expostos ao pareamento da sacarose com o mal-estar. Uma possível interpretação para esse conjunto de resultados seria de que o contexto do treino prévio, onde os ratos nunca haviam experienciado um mal-estar seguido do consumo da sacarose e onde ocorreu o teste pós-desvalorização, serviu como um estímulo condicionado sinalizando a presença de um ambiente seguro. Então, a resposta de refrear o consumo da sacarose desvalorizada competiu com a resposta de consumir da solução, que naquele contexto nunca havia produzido um mal-estar. Assim, os sujeitos pré-expostos à desvalorização seletiva da sacarose, exibiram ainda, na fase de teste, uma preferência pela solução de sacarose em comparação com a sacarina, o que pode ter sido a causa da manutenção do efeito de contraste por estes ratos na fase de teste. E sendo assim, não seria possível descartar a hipótese de que a aquisição do efeito de contraste antecipatório de incentivo envolveria a efetiva antecipação diária das propriedades motivacionais da recompensa pendente.

Adicionalmente, foram raros os estudos, até o momento, que tiveram por objetivo elucidar o envolvimento de substratos neurais na aquisição da tarefa de contraste antecipatório de incentivo. E mais raros ainda, foram os trabalhos que reportaram alguma interferência de lesões sobre o aprendizado dessa tarefa. Por exemplo, a lesão por colchicina do giro denteado hipocampal não resultou em qualquer alteração sobre a aquisição do efeito de contraste antecipatório, como reportado por Flaherty e colaboradores (1989). Além disso, a lesão eletrolítica do núcleo accumbens também não impediu o aparecimento do efeito de contraste antecipatório consumatório (Leszczuk e Flaherty, 2000). A hipótese inicial levantada por estes últimos autores era de que a lesão do núcleo accumbens resultaria numa perda do efeito de contraste, por esta região estar envolvida na modulação de respostas comportamentais diante da antecipação de futuras recompensas; entretanto, essa idéia não foi sustentada. Por outro lado, a única lesão reportada até o momento que alterou de alguma forma a ocorrência do efeito de contraste antecipatório consumatório foi a lesão do tálamo gustativo (Reilly e

Pritchard, 1996; Reilly *et al.*, 2004) – o dano nessa região levou a uma facilitação do consumo da primeira solução e não ao efeito de contraste. Sugere-se que isso se deu por conta de uma eliminação da habilidade dos animais de comparar valores hedônicos, a qual seria baseada nos efeitos pós-ingestivos das recompensas, mas não na “memória gustativa” sobre a solução pendente. Portanto, os resultados relativos aos efeitos das lesões do núcleo accumbens e do tálamo gustativo descritos acima podem ser vistos de forma congruente com uma das hipóteses levantadas pelo nosso trabalho: de que a aquisição do contraste antecipatório de incentivo seria baseado no aprendizado sobre o valor relativo da primeira solução através da experiência da relação entre as duas recompensas, e não na antecipação diária do valor motivacional da segunda solução.

Os resultados deste trabalho também mostraram que a lesão seletiva do BL não alterou a habilidade dos animais em discriminar as soluções de sacarina 0,15% e de sacarose 32%, uma vez que os ratos lesados apresentaram o consumo da solução de sacarose significativamente maior que o consumo da solução de sacarina, tal como os animais controle-operados. Por outro lado, foi observado que ratos lesados no BL apresentaram o consumo geral das soluções diminuído em comparação com os controle-operados. O consumo da solução de sacarose por ratos lesados mostrou-se menor que o dos controle-operados somente em um dos dois experimentos que avaliaram o desempenho dos animais na tarefa de contraste antecipatório. Já o consumo da solução de sacarina foi menor para ratos lesados nos dois experimentos em questão, tanto quando ela foi apresentada como primeira solução quanto como segunda solução. No entanto, o fato de animais lesados no BL consumirem menos das soluções que os controle-operados não implicou em prejuízo da aquisição do efeito de contraste antecipatório de incentivo. Esses resultados podem indicar uma alteração motivacional ou no controle motor do ato de lambeo resultante da lesão do BL, os quais não têm sido reportados por outros estudos envolvendo lesão do BLA.

Em síntese, os resultados do presente trabalho não levam a uma interpretação definitiva acerca do envolvimento de associações do tipo estímulo-reforço na aquisição do efeito de contraste antecipatório de incentivo. De qualquer forma, ratos com lesão do BL

mostraram desempenho semelhante aos seus controle-operados quanto ao efeito de contraste antecipatório, indicando que o funcionamento do BL não é fundamental para os processos subjacentes à aquisição desse fenômeno, sejam eles quais forem.

8. Conclusões Gerais

Os resultados do presente trabalho sugerem o envolvimento do BL no desempenho de ratos na tarefa de condicionamento clássico aversivo ao contexto, mas não ao som. A participação do BL nessa situação comportamental possivelmente ocorre nos processos subjacentes às associações entre as representações contextuais (ou configuracionais) de um estímulo e as representações sobre os valores motivacionais ou afetivos de um evento aversivo que havia sido pareado ao primeiro.

Já os resultados referentes à tarefa de contraste antecipatório de incentivo não levam a uma interpretação conclusiva acerca do requerimento da formação de associações do tipo estímulo-reforço para a aquisição do efeito de contraste antecipatório. É possível que estímulos ambientais teriam acesso ao valor de incentivo da solução pendente, o qual seria então comparado, diariamente, com o valor da recompensa corrente (i.e., envolvimento de associações estímulo-reforço). Porém, de acordo com esta interpretação, a ausência de prejuízo de desempenho na versão intra-sujeitos da tarefa envolvendo discriminação configuracional das condições de treino, observada em animais com lesão do BL, seria inconsistente com os resultados obtidos pelo presente trabalho na tarefa de medo condicionado; ou seja, de acordo com esta idéia, era de se esperar que animais lesados no BL também exibissem prejuízo de desempenho nesta situação específica da tarefa de contraste, da mesma forma como ocorreu no teste de medo condicionado ao contexto. Por outro lado, os resultados permitem outras duas interpretações alternativas: 1) o efeito de contraste seria resultado da antecipação do valor relativo da primeira solução, estabelecido pela experiência prévia do animal com a relação entre as duas recompensas e não pela antecipação diária do valor motivacional da segunda solução, ou alternativamente, 2) o efeito de contraste antecipatório seria resultado da evocação de um conjunto de respostas motoras selecionado pela experiência prévia do animal com a relação entre as duas recompensas. De qualquer forma, de acordo com estas últimas idéias, o comportamento consumatório relativo à primeira solução durante a tarefa de contraste antecipatório de incentivo não seria controlado diretamente pela antecipação diária das propriedades motivacionais da recompensa pendente, mas seria resultado da experiência prévia com a relação que se estabelece entre as duas

recompensas. Ademais, baseado em outros estudos, a ausência de prejuízo de desempenho na tarefa de contraste antecipatório de incentivo por ratos com lesão do BL seria congruente com essas últimas hipóteses sobre o fenômeno de contraste.

Finalmente, estas questões relativas ao efeito de contraste antecipatório podem ser posteriormente esclarecidas empregando a mesma estratégia utilizada neste estudo, porém utilizando um procedimento de desvalorização da solução de sacarose mais efetivo.

9. Referências Bibliográficas

- ALHEID, G.F. & HEIMER, L. New perspectives in basal forebrain organization of special relevance for neuropsychiatric disorders: the striatopallidal, amygdaloid, and corticopetal components of substantia innominata. **Neuroscience**, v.1, p.1-39, 1988.
- AMORAPHANT, P.; LEDOUX, J.E.; NADER, K. Different lateral amygdala outputs mediate reactions and actions elicited by a fear-arousing stimulus. **Nature Neuroscience**, v.3, p.74-79, 2000.
- ANAGNOSTARAS, S.G.; MAREN, S.; FANSELOW, M.S. Temporally graded retrograde amnesia of contextual fear after hippocampal damage in rats: within-subjects examination. **The Journal of Neuroscience**, v.19, p.1106-1114, 1999.
- ANAGNOSTARAS, S.G., GALE, G.D., FANSELOW, M.S. Hippocampus and contextual fear conditioning: recent controversies and advances. **Hippocampus**, v.11, p.8-17, 2001.
- ARMONY, J.L. & LEDOUX, J.E. How the brain processes emotional information. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.82, p.259-270, 1997.
- BALLEINE, B.W. & DICKINSON, A. Goal-directed instrumental action: contingency and incentive learning and their cortical substrates. **Neuropharmacology**, v.37, p.407-419, 1998.
- BALLEINE, B.W.; KILLCROSS, A.S.; DICKINSON, A. The effect of lesions of the basolateral amygdala on instrumental conditioning. **The Journal of Neuroscience**, v.23, p.666-675, 2003.
- BAXTER, M.G. & MURRAY, E.A. The amygdala and reward. **Nature Reviews Neuroscience**, v.3, p.563-573, 2002.
- BLAIR, H.T.; SCHAFE, G.E.; BAUER, E.P.; RODRIGUES, S.M.; LEDOUX, J.E. Synaptic plasticity in the lateral amygdala: a cellular hypothesis of fear conditioning **Learning & Memory**, v.8, p.229-242, 2001.
- BLANCHARD, D.C. & BLANCHARD, R.J. Innate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v.81, p.281-290, 1972.

- BLUNDELL, P.; HALL, G.; KILLCROSS, S. Lesions of the basolateral amygdala disrupt selective aspects of reinforcer representation in rats. **The Journal of Neuroscience**, v.21, p.9018-9026, 2001.
- BLUNDELL, P.; HALL, G.; KILLCROSS, S. Preserved sensitivity to outcome value after lesions of the basolateral amygdala. **The Journal of Neuroscience**, v.23, p.7702-7709, 2003.
- BRADY, J.V.; SCHREINER, L.; GELLER, I.; KLING, A. Subcortical mechanisms in emotional behavior: the effect of rhinencephalic injury upon the acquisition and retention of a conditioned avoidance response in cats. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v.47, p.179-186, 1954.
- CADOR, M.; ROBBINS, T.W.; EVERITT, B.J. Involvement of the amygdala in stimulus-reward associations: interactions with the ventral striatum. **Neuroscience**, v.30, p.77-86, 1989.
- CAHILL, L.; WEINBERGER, N.M.; ROOZENDAAL, B.; MCGAUGH, J.L. Is the amygdala a locus of "conditioned fear"? Some questions and caveats. **Neuron**, v.23, p.227-228, 1999.
- CALANDREAU, L.; DESMEDT, A.; DECORTE, L.; JAFFARD, R. A different recruitment of the lateral and basolateral amygdala promotes contextual or elemental conditioned association in Pavlovian fear conditioning. **Learning and Memory**, v.12, p.383-388, 2005.
- CAMPEAU, S. & DAVIS, M. Involvement of the central nucleus and basolateral complex of the amygdala in fear conditioning measured with fear-potentiated startle in rats trained concurrently with auditory and visual conditioned stimuli. **The Journal of Neuroscience**, v.15, p.2301-2311, 1995.
- CAMPEAU, S.; MISERENDINO, M.J.D.; DAVIS, M. Intra-amygdala infusion of the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist APV blocks acquisition but not expression of fear-potentiated startle to an auditory conditioned stimulus. **Behavioral Neuroscience**, v.106, p.569-574, 1992.

- CARDINAL, R.N.; PARKINSON, J.A.; HALL, J.; EVERITT, B.J. Emotion and motivation: the role of the amygdala, ventral striatum, and prefrontal cortex. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.26, p.321-352, 2002.
- CORBIT, L.H. & BALLEINE, B.W. Double dissociation of basolateral and central amygdala lesions on the general and outcome-specific forms of Pavlovian-instrumental transfer. **The Journal of Neuroscience**, v.25, p.962-970, 2005.
- COUSENS, G. & OTTO, T. Both pre- and posttraining excitotoxic lesions of the basolateral amygdala abolish the expression of olfactory and contextual fear conditioning. **Behavioral Neuroscience**, v.112, p.1092-1103, 1998.
- DAVIS, M. The role of the amygdala in conditioned and unconditioned fear and anxiety. In: AGGLETON, J.P. **The amygdala: a functional analysis**. 2a. edição. New York: Oxford University Press, 2000. p.213-288.
- DAYAN, P. & BALLEINE, B.W. Reward, motivation, and reinforcement learning. **Neuron**, v.36, p.285-298, 2002.
- DICKINSON, A. & DAWSON, G.R. Motivational control of instrumental performance: the role of prior experience of the reinforcer. **The Quarterly Journal of Experimental Psychology**, v.40, p.113-134, 1988.
- EVERITT, B.J.; CADOR, M.; ROBBINS, T.W. Interactions between the amygdala and ventral striatum in stimulus-reward associations: studies using a second-order schedule of sexual reinforcement. **Neuroscience**, v.30, p.63-75, 1989.
- EVERITT, B.J.; MORRIS, K.A.; O'BRIEN, A.; ROBBINS, T.W. The basolateral amygdala-ventral striatal system and conditioned place preference: further evidence of limbic-striatal interactions underlying reward-related processes. **Neuroscience**, v.42, p.1-18, 1991.
- EVERITT, B.J.; PARKINSON, J.A.; OLMSTEAD, M.C.; ARROYO, M; ROBLEDOS, P.; ROBBINS, T.W. Associative processes in addition and reward: the role of amygdala-ventral striatal subsystems. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.877, p.412-438, 1999.

- EVERITT, B.J. & ROBBINS, T.W. Amygdala-ventral striatal interactions and reward-related processes. In: AGGLETON, J.P. **The amygdala: neurobiological aspects of emotion, memory, and mental dysfunction**. New York: Wiley-Liss, 1992. p.401-429.
- FANSELOW, M.S. Factors governing one-trial contextual conditioning. **Animal Learning and Behavior**, v.18, p.264-270, 1990.
- FANSELOW, M.S. & KIM, J.J. Acquisition of contextual Pavlovian fear conditioning is blocked by application of an NMDA receptor antagonist D,L-2-amino-5-phosphonovaleric acid to the basolateral amygdala. **Behavioral Neuroscience**, v.108, p.210-212, 1994.
- FLAHERTY, C.F. Incentive contrast: a review of behavioral changes following shifts in reward. **Animal Learning & Behavior**, v.10, p.409-440, 1982.
- FLAHERTY, C.F. **Incentive relativity**. Cambridge: Cambridge University Press, 1996. 227pp.
- FLAHERTY C.F. & CHECKE, S. Anticipation of incentive gain. **Animal Learning & Behavior**, v.10, p.177-182, 1982.
- FLAHERTY, C.F.; COPPOTELLI, C.; GRIGSON, P.S.; MITCHELL, C.; FLAHERTY, J.E. Investigation of devaluation interpretation of anticipatory negative contrast. **Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes**, v.21, p.229-247, 1995
- FLAHERTY, C.F. & GRIGSON, P.S. From contrast to reinforcement: role of response contingency in anticipatory contrast. **Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes**, v.14, p.165-176, 1988.
- FLAHERTY C.F. & ROWAN, G.A. Anticipatory contrast: within-subjects analysis. **Animal Learning & Behavior**, v.13, p.2-5, 1985.
- FLAHERTY, C.F. & ROWAN, G.A. Successive, simultaneous, and anticipatory contrast in the consumption of saccharin solutions. **Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes**, v.12, p.381-393, 1986.

- FLAHERTY, C.F.; ROWAN, G.A.; EMERICH, D.; WALSH, T. Effects of intra-hippocampal administration of colchicine on incentive contrast and on radial maze performance. **Behavioral Neuroscience**, v.103, p.319-328, 1989.
- FLORESCO S.B.; YANG, C.R.; PHILLIPS, A.G.; BLAHA, C.D. Basolateral amygdala stimulation evokes glutamate receptor-dependent dopamine efflux in nucleus accumbens of the anaesthetized rat. **European Journal of Neuroscience**, v.10, p.1241-1251, 1998.
- GAFFAN, E.A.; GAFFAN, D.; HARRISON, S. Disconnection of the amygdala from visual association cortex impairs visual reward-association learning in monkeys. **The Journal of Neuroscience**, v.8, p.3144-3150, 1988.
- GAFFAN D. & HARRISON, S. Amygdalectomy and disconnection in visual learning for auditory secondary reinforcement by monkeys. **The Journal of Neuroscience**, v.7, p.2285-2292, 1987.
- GALLAGHER, M.; MCMAHAN, R.W.; SCHOENBAUM, G. Orbitofrontal cortex and representation of incentive value in associative learning. **The Journal of Neuroscience**, v.19, p.6610-6614, 1999.
- GOOSENS, K.A. & MAREN, S. Contextual and auditory fear conditioning are mediated by lateral, basal, and central amygdaloid nuclei in rats. **Learning and Memory**, v.8, p.148-155, 2001.
- GOTTFRIED, J.A.; O'DOHERTY, J.; DOLAN, R.J. Encoding predictive reward value in human amygdala and orbitofrontal cortex. **Science**, v.301, p.1104-1107, 2003.
- HATFIELD, T.; HAN, J.; CONLEY, M.; GALLAGHER, M.; HOLLAND, P. Neurotoxic lesions of basolateral, but not central, amygdala interfere with Pavlovian second-order conditioning and reinforcer devaluation effects. **The Journal of Neuroscience**, v.16, p.5256-5265, 1996.
- HITCHCOTT, P.K.; PHILLIPS, G.D. Double dissociation of the behavioural effects of R(+) 7-OH-DPAT infusions in the central and basolateral amygdala nuclei upon Pavlovian and instrumental conditioned appetitive behaviours. **Psychopharmacology**, v.140, p.458-469, 1998.

- HOWLAND, J.G.; TAEPAVARAPRUK, P.; PHILLIPS, A.G. Glutamate receptor-dependent modulation of dopamine efflux in the nucleus accumbens by basolateral, but not central, nucleus of the amygdala in rats. **The Journal of Neuroscience**, v.22, p.1137-1145, 2002.
- IWATA, J.; LEDOUX, J.E.; MEELEY, M.P.; ARNERIC, S.; REIS, D.J. Intrinsic neurons in the amygdala field projected to by the medial geniculate body mediate emotional responses conditioned to acoustic stimuli. **Brain Research**, v.383, p.195-214, 1986.
- JONES, B. & MISHKIN, M. Limbic lesions and the problem of stimulus-reinforcement associations. **Experimental Neurology**, v.36, p.362-377, 1972.
- KILLCROSS, S.; ROBBINS, T.W.; EVERITT, B.J. Different types of fear-conditioned behaviour mediated by separate nuclei within amygdala. **Nature**, v.388, p.377-380, 1997.
- KIM, J.J. & FANSELOW, M.S. Modality-specific retrograde amnesia of fear. **Science**, v.256, p.675-676, 1992.
- KIM, J.J.; RISON, R.A.; FANSELOW, M.S. Effects of amygdala, hippocampus, and periaqueductal gray lesions on short- and long-term contextual fear. **Behavioral Neuroscience**, v.107, p.1093-1098, 1993.
- KLÜVER, H. & BUCY, P.C. 'Psychic blindness' and other symptoms following bilateral temporal lobectomy in rhesus monkeys. **American Journal of Physiology**, v.119, p.352-353, 1937.
- KLÜVER, H. & BUCY, P.C. Preliminary analysis of functions of the temporal lobes in monkeys. **Archives of Neurology and Psychiatry**, v.42, p.979-1000, 1939.
- KOO, J.W.; HAN, J.; KIM, J.J. Selective neurotoxic lesions of basolateral and central nuclei of the amygdala produce differential effects on fear conditioning. **The Journal of Neuroscience**, v.24, p.7654-7662, 2004.
- LEDOUX, J.E. Emotion: clues from the brain. **Annual Review of Psychology**, v.46, p.209-235, 1995.

- LEDOUX, J.E. The amygdala and emotion: a view through fear. In: AGGLETON, J.P. **The amygdala: a functional analysis**. 2a. edição. New York: Oxford University Press, 2000. p.289-310.
- LEE, H. & KIM, J. Amygdalar NMDA receptors are critical for new fear learning in previously fear-conditioned rats. **The Journal of Neuroscience**, v.18, p.8444-8454, 1998.
- LESZCZUK, M.H. & FLAHERTY, C.F. Lesions of the nucleus accumbens reduce instrumental but not consummatory negative contrast in rats. **Behavioural Brain Research**, v.116, p.61-79, 2000.
- LINDGREN, J.L.; GALLAGHER, M.; HOLLAND, P.C. Lesions of basolateral amygdala impair extinction of CS motivational value, but not of explicit conditioned responses, in Pavlovian appetitive second-order conditioning. **European Journal of Neuroscience**, v.17, p.160-166, 2003.
- MALKOVA, L.; GAFFAN, D.; MURRAY, E.A. Excitotoxic lesions of the amygdala fail to produce impairments in visual learning for auditory secondary reinforcement but interfere with reinforcer devaluation effects in rhesus monkeys. **Journal of Neuroscience**, v.17, p.6011-6020, 1997.
- MAREN, S. Long-term potentiation in the amygdala: a mechanism for emotional learning and memory. **Trends in Neuroscience**, v.22, p.561-567, 1999.
- MAREN, S. Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. **Annual Review of Neuroscience**, v.24, p.897-931, 2001.
- MAREN, S.; AHARONOV, G.; FANSELOW, M.S. Retrograde abolition of conditional fear after excitotoxic lesions in the basolateral amygdala of rats: absence of a temporal gradient. **Behavioral Neuroscience**, v.110, p.718-726, 1996(a).
- MAREN, S.; AHARONOV, G.; STOTE, D.L.; FANSELOW, M.S. N-methyl-D-aspartate receptors in the basolateral amygdala are required for both acquisition and expression of conditional fear in rats. **Behavioral Neuroscience**, v.110, p.1365-1374, 1996(b).

- MAREN, S.; ANAGNOSTARAS, S.G.; FANSELOW, 1998. The startled seahorse: is the hippocampus necessary for contextual fear conditioning? **Trends in Cognitive Sciences**, v.2, p.39-42, 1998.
- MAREN, S. & FANSELOW, M.S. Eletrolytic lesions of the dorsal hippocampus, fimbria-fornix, or entorhinal cortex produce anterograde deficit in contextual fear conditioning in rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, v.67, p.142-149, 1997.
- MCDONALD, A.J. Cortical pathways to the mammalian amygdala. **Progress in Neurobiology**, v.55, p.257-332, 1998.
- MCDONALD, R.J. & HONG, N.S. A dissociation of dorso-lateral striatum and amygdala function on the same stimulus-response habit task. **Neuroscience**, v.124, p.507-513, 2004.
- MCDONALD R.J. & WHITE, N.M. A triple dissociation of memory systems: hippocampus, amygdala, and dorsal striatum. **Behavioral Neuroscience**, v.107, p.3-22, 1993.
- MISERENDINO, M.J.D.; SANANES, C.B.; MELIA, K.R.; DAVIS M. Blocking of acquisition but not expression of conditioned fear-potentiated startle by NMDA antagonists in the amygdala. **Nature**, v.345, p.716-718, 1990.
- MURAMOTO, K.; ONO, T.; NISHIJO, H.; FUKUDA, M. Rat amygdaloid neuron responses during auditory discrimination. **Neuroscience**, v.52, p.621-636, 1993.
- MURRAY, E.A. & WISE, S.P. Role of the hippocampus plus subjacent cortex but not amygdala in visuospatial conditional learning in rhesus monkeys. **Behavioral Neuroscience**, v.110, p.1261-1270, 1996.
- NADEL, L.; WILLNER, J.; KURZ, E. Cognitive maps and environmental context. In: BALSAM, P.D. & TOMIE, A. **Context and Learning**. 1a. edição. Hillsdale: Erlbaum, 1985. p.385-406.
- NADER, K.; MAJIDISHAD, P.; AMORAPHANT, P.; LEDOUX, J.E. Damage to the lateral and central, but not other, amygdaloid nuclei prevents the acquisition of auditory fear conditioning. **Learning and Memory**, v.8, p.156-163, 2001.

- NISHIJO, H.; ONO, T.; NISHINO, H. Single neuron responses in amygdala of alert monkey during complex sensory stimulation with affective significance. **The Journal of Neuroscience**, v.8, p.3570-3583, 1988.
- O'KEEFE, J & NADEL, L. **The hippocampus as a cognitive map**. New York: Oxford University Press, 1978.
- ONO, T; NISHIJO, H.; UWANO, T. Amygdala role in conditioned associative learning. **Progress in Neurobiology**, v.46, p.401-422, 1995.
- PARÉ, D.; QUIRK, G.J.; LEDOUX, J.E. New vistas on amygdala networks in conditioned fear. **Journal of Neurophysiology**, v.92, p.1-9, 2004.
- PARKINSON, J.A.; CROFTS, H.S.; MCGUIGAN, M.; TOMIC, D.L.; EVERITT, B.J.; ROBERTS, A.C. The role of the primate amygdala in conditioned reinforcement. **The Journal of Neuroscience**, v.21, p.7770-7780, 2001.
- PARKINSON, J.A.; ROBBINS, T.W.; EVERITT, B.J. Dissociable roles of the central and basolateral amygdala in appetitive emotional learning. **European Journal of Neuroscience**, v.12, p.405-413, 2000.
- PETROVICH, G.D. Organization of amygdalar projections in the rat. Tese (Doutorado) – University of Southern California, 1997.
- PHELPS, E.A. Human emotion and memory: interactions of the amygdala and hippocampal complex. **Current Opinion in Neurobiology**, v.14, p.198-202, 2004.
- PHILLIPS, R.G. & LEDOUX, J.E. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. **Behavioral Neuroscience**, v.106, p.274-285, 1992.
- PICKENS, C.L. & HOLLAND, P.C. Conditioning and cognition. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.28, p.651-661, 2004.
- PICKENS, C.L.; SADDORIS, M.P.; SETLOW, B.; GALLAGHER, M.; HOLLAND, P.C.; SHOENBAUM, G. Different roles for orbitofrontal cortex and basolateral amygdala in a reinforcer devaluation task. **The Journal of Neuroscience**, v.23, p.11078-11084, 2003.

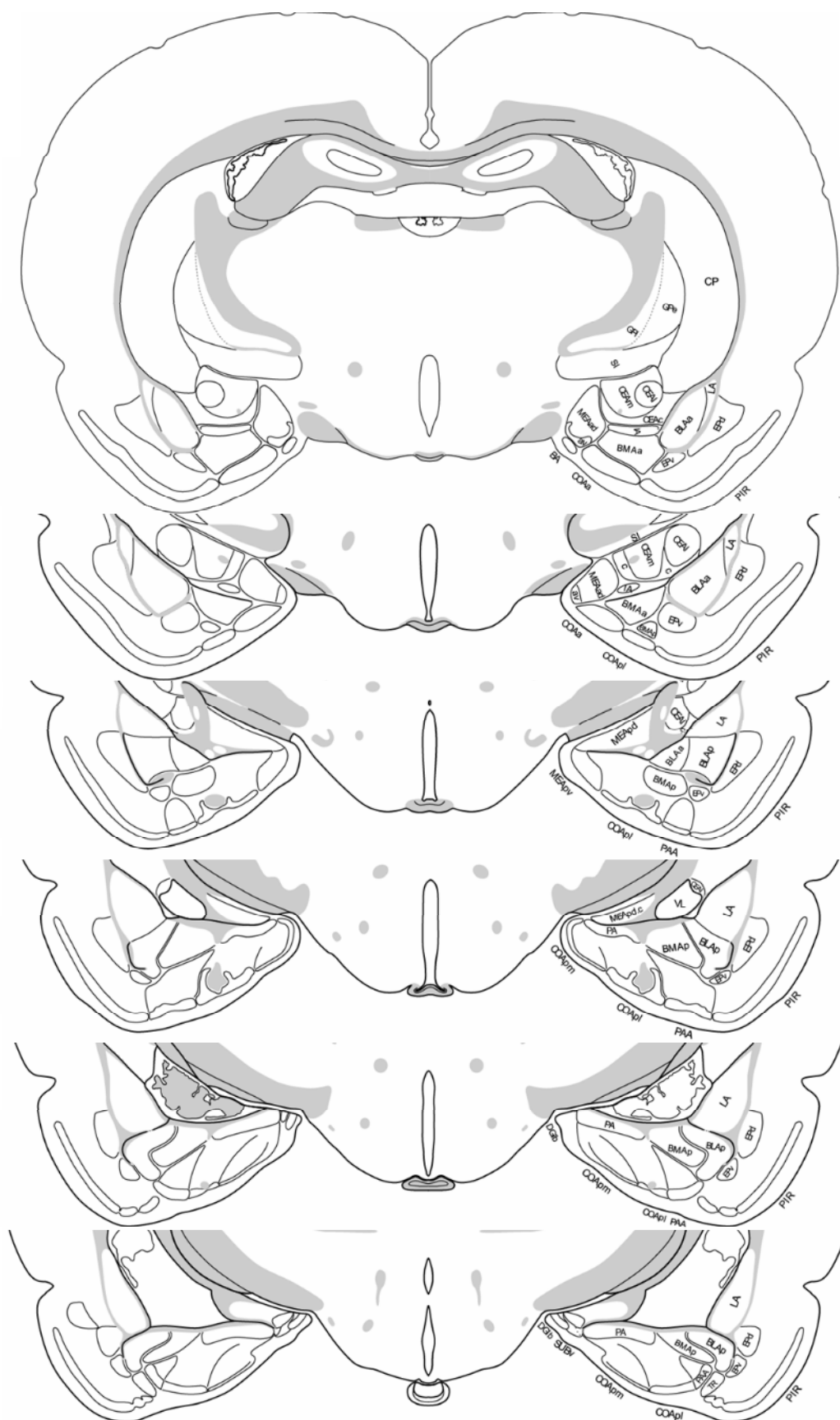
- PITKÄNEN, A. Connectivity of the rat amygdaloid complex. In: AGGLETON, J.P. **The amygdala: a functional analysis**. 2a. edição. New York: Oxford University Press, 2000. p.31-116.
- PITKÄNEN A.; SAVANDER, V.; LEDOUX, J.E. Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala. **Trends in Neuroscience**, v.20, p.517-523, 1997.
- QUIRK, G.J.; ARMONY, J.L.; LEDOUX, J.E. Fear conditioning enhances different temporal components of tone-evoked spike trains in auditory cortex and lateral amygdala. **Neuron**, v.19, p.613-624, 1997.
- QUIRK, G.J.; REPA, C.; LEDOUX, J.E. Fear conditioning enhances short-latency auditory responses of lateral amygdala neurons: parallel recordings in the freely behaving rat. **Neuron**, v.15, p.1029-1039, 1995.
- REILLY, S.; BORNOVALOVA, M.; TRIFUNOVIC, R. Excitotoxic lesions of the gustatory thalamus spare simultaneous contrast effects but eliminate anticipatory negative contrast: evidence against a memory deficit. **Behavioral Neuroscience**, v.118, p.365-376, 2004.
- REILLY, S. & PRITCHARD, T.C. Gustatory thalamus lesions in the rat: II. Aversive and appetitive taste conditioning. **Behavioral Neuroscience**, v. 110, p.746-759, 1996.
- ROGAN, M.T. & LEDOUX, J.E. Emotion: systems, cells, synaptic plasticity. **Cell**, v.85, p.469-475, 1996.
- ROLLS, E.T. Neurophysiology and functions of the primate amygdala. In: AGGLETON, J.P. **The amygdala: neurobiological aspects of emotion, memory, and mental dysfunction**. 1a. edição. New York: Wiley-Liss, 1992. p.143-165.
- ROLLS, E.T. The brain control of feeding and reward. In: _____. **The brain and emotion**. 1a. edição. New York: Oxford University Press, 1999. p.8-58.
- ROLLS, E.T. Neurophysiology and functions of the primate amygdala, and the neural basis of emotion. In: AGGLETON, J.P. **The amygdala: a functional analysis**. 2a. edição. New York: Oxford University Press, 2000. p.447-478.

- ROMANSKI, L.M.; LEDOUX, J.E.; CLUGNET, M.C.; BORDI, F. Somatosensory and auditory convergence in the lateral nucleus of the amygdala. **Behavioral Neuroscience**, v.107, p.444-450, 1993.
- ROOZENDAAL, B.; KOOLHAAS, J.M.; BOHUS, B. Attenuated cardiovascular, neuroendocrine and behavioral response after a single footshock in central amygdaloid lesioned male rats. **Physiology and Behavior**, v.50, p.771-775, 1991.
- RUDY, J.W.; HUFF, N.C.; MATUS-AMAT, P. Understanding contextual fear conditioning: insights from a two-process model. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 28, p.675-685, 2004.
- RUDY , J.W. & SUTHERLAND, R.J. The hippocampal formation is necessary for rats to learn and remember configural discriminations. **Behavioural Brain Research**, v.34, p.97-109, 1989.
- RUDY, J.W. & SUTHERLAND, R.J. Configural association theory and the hippocampal formation: an appraisal and reconfiguration. **Hippocampus**, v.5, p.375-389, 1995.
- SETLOW, B.; GALLAGHER, M.; HOLLAND, P.C. The basolateral complex of the amygdala is necessary for acquisition but not expression of CS motivational value in appetitive Pavlovian conditioning. **European Journal of Neuroscience**, v.15, p.1841-1853, 2002.
- SCHOENBAUM, G.; CHIBA, A.A.; GALLAGHER, M. Orbitofrontal cortex and basolateral amygdala encode expected outcomes during learning. **Nature Neuroscience**, v.1, p.155-159, 1998.
- SCHOENBAUM, G.; CHIBA, A.A.; GALLAGHER, M. Neural encoding in orbitofrontal cortex and basolateral amygdala during olfactory discrimination learning. **The Journal of Neuroscience**, v.19, p.1876-1884, 1999.
- SCHOENBAUM, G.; CHIBA, A.A.; GALLAGHER, M. Changes in functional connectivity in orbitofrontal cortex and basolateral amygdala during learning and reversal training. **The Journal of Neuroscience**, v.20, p.5179-5189, 2000.
- SCHOENBAUM G.; SETLOW, B.; NUGENT, S.L.; SADDORIS, M.P.; GALLAGHER, M. Lesions of orbitofrontal cortex and basolateral amygdala complex disrupt acquisition

- of odor-guided discriminations and reversals. **Learning and Memory**, v.10, p.129-140, 2003a.
- SCHOENBAUM, G.; SETLOW, B.; SADDORIS, M.P.; GALLAGHER, M. Encoding predicted outcome and acquired value in orbitofrontal cortex during cue sampling depends upon input from basolateral amygdala. **Neuron**, v.39, p.855-867, 2003b.
- SENDEN, N.R.W.; EVERITT, B.J.; JARRARD, L.E.; ROBBINS, T.W. Complementary roles for the amygdala and hippocampus in aversive conditioning to explicit and contextual cues. **Neuroscience**, v.42, p.335-350, 1991.
- SUTHERLAND, R.J. & MCDONALD, R.J. Hippocampus, amygdala, and memory deficits in rats. **Behavioural Brain Research**, v.37, p.57-79, 1990.
- SUTHERLAND, R.J. & RUDY, J.W. Configural association theory: the role of the hippocampal formation in learning, memory, and amnesia. **Psychobiology**, v.17, p.129-144, 1989.
- SWANSON, L.W. **Brain maps: structure of the rat brain**. 1a. edição. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V., 1992.
- SWANSON, L.W. & PETROVICH, G.D. What is the amygdala? **Trends in Neuroscience**, v.21, p.323-331, 1998.
- TOYOMITSU, Y, NISHIJO, H., UEANO, T., KARATSU, J., ONO, T. Neuronal response of the rat amygdala during extinction and reassociation learning in elementary and configural associative tasks. **European Journal of Neuroscience**, v.15, p.753-768, 2002.
- VAZDARJANOVA, A.; CAHILL, L.; MCGAUGH, J.L. Disrupting basolateral amygdala function impairs unconditioned freezing and avoidance in rats. **European Journal of Neuroscience**, v.14, p.709-718, 2001.
- WEISKRANTZ, L. Behavioral changes associated with ablation of the amygdaloid complex in monkeys. **Journal of Comparative Physiological Psychology**, v.49, p.381-391, 1956.

- WELLMAN, L.L.; GALE, K.; MALKOVA, L. GABA_A- mediated inhibition of basolateral amygdala blocks reward devaluation in macaques. **The Journal of Neuroscience**, v.25, p.4577-4586, 2005.
- WHITE, N.M. & MCDONALD, R.J. Multiple parallel memory systems in the brain of the rat. **Neurobiology of Learning and Memory**, v.77, p.125-184, 2002.
- WHITELAW, R.B.; MARKOU, A.; ROBBINS, T.W.; EVERITT, B.J. Excitotoxic lesions of the basolateral amygdala impair the acquisition of cocaine-seeking behaviour under a second-order schedule of reinforcement. **Psychopharmacology**, v.127, p.213-224, 1996.
- WILENSKY, A.E.; SCHAFE, G.E.; LE DOUX, J.E. Functional inactivation of the amygdala before but not after auditory fear conditioning prevents memory formation. **The Journal of Neuroscience**, v.19, p.1-5, 1999.
- WILENSKY, A.E.; SCHAFE, G.E.; LEDOUX, J.E. The amygdala modulates memory consolidation of fear-motivated inhibitory avoidance learning but not classical fear conditioning. **The Journal of Neuroscience**, v.20, p.7059-7066, 2000.
- WILLIAMS, B.A. Conditioned reinforcement: experimental and theoretical issues. **The Behavior Analyst**, v.17, p.261-285, 1994.
- WILLIAMS, B.A. Behavioral contrast redux. **Animal Learning and Behavior**, v.30, p.1-20, 2002.
- YANIV, D.; DESMEDT, A.; JAFFARD, R.; RICHTER-LEVIN, G. The amygdala and appraisal processes: stimulus and response complexity as an organizing factor. **Brain Research Reviews**, v.44, p.179-186, 2004.
- YANIV, D.; SCHAFE, G.E.; LEDOUX, J.E.; RICHTER-LEVIN, G. A gradient of plasticity in the amygdala revealed by cortical and subcortical stimulation in vivo. **Neuroscience**, v.106, p.613-620, 2001.
- YOUNG, S.L.; BOHENEK, D.L.; FANSELOW, M.S. NMDA processes mediate anterograde amnesia of contextual fear conditioning induced by hippocampal damage: immunization against amnesia by context procedure. **Behavioral Neuroscience**, v.108, p.19-29, 1994.

10. Apêndice



APÊNDICE A. Representações esquemáticas de secções coronais de encéfalo de rato no nível da amígdala. Abreviaturas na página seguinte.

Abreviaturas do Apêndice A: **BLAa**, núcleo basal (anterior) da amígdala; **BLAp**, núcleo basal (posterior) da amígdala; **BMAa**, núcleo basal acessório (anterior) da amígdala; **BMAp**, núcleo basal acessório (posterior) da amígdala; **CEAc**, núcleo central (capsular) da amígdala; **CEAl**, núcleo central (lateral) da amígdala; **CEAm**, núcleo central (medial) da amígdala; **COAa**, núcleo cortical (anterior) da amígdala; **COApl**, núcleo cortical (pôstero-lateral) da amígdala; **COApm**, núcleo cortical (pôstero-medial) da amígdala; **CP**, caudado-putamen; **DG**, giro dentado; **EPd**, núcleo endopiriforme (dorsal); **EPv**, núcleo endopiriforme (ventral); **GPl**, globo pálido (lateral); **GPM**, globo pálido (medial); **IA**, núcleo intercalado da amígdala; **LA**, núcleo lateral da amígdala; **MEAad**, núcleo medial (ântero-dorsal) da amígdala; **MEApv**, núcleo medial (pôstero-ventral) da amígdala; **PA**, núcleo posterior da amígdala; **PAA**, área piriforme amigdalóide; **PIR**, córtex piriforme; **SI**, substância inominata; **SUBv**, subículo (ventral); **TR**, área de transição pós-piriforme.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)