

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO  
DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA E EDUCAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOBIOLOGIA

**Discriminação condicional e bi-seção temporal em ratos com  
lesão hipocampal**

Lézio Soares Bueno Júnior

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Psicobiologia.

Ribeirão Preto – SP  
2008

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO  
DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA E EDUCAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOBIOLOGIA

Lézio Soares Bueno Júnior

**Discriminação condicional e bi-seção temporal em ratos com  
lesão hipocampal**

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Psicobiologia.

Ribeirão Preto – SP  
2008



Lézio Soares Bueno Júnior

**Discriminação condicional e bi-seção temporal em ratos com  
lesão hipocampal**

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Psicobiologia.

Orientador: Prof. Dr. José Lino Oliveira Bueno

Ribeirão Preto – SP  
2008

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTA TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO OU PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

### FICHA CATALOGRÁFICA

Bueno Júnior, Lézio Soares

Discriminação condicional e bi-seção temporal em ratos com lesão hipocampal / Lézio Soares Bueno Júnior; orientador José Lino Oliveira Bueno. Ribeirão Preto – SP, 2008.

100 p.: il.; 30 cm

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-graduação em Psicobiologia) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

1. Discriminação condicional. 2. Bi-seção temporal. 3. Comportamento operante. 4. Giro denteado do hipocampo. 5. Lesão seletiva. 6. Colchicina. 7. Privação de água.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Lézio Soares Bueno Júnior

Discriminação condicional e bi-seção temporal em ratos com lesão hipocampal

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Psicobiologia.

Aprovado em:

### Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_



*Dedico a Gabriela Campos Darahem,*

*a maior testemunha de meu esforço.*



## **AGRADECIMENTOS**

*À minha mãe, Sheila Valadão Carvalheiro, por ter apoiado minha continuidade na academia.*

*Ao Prof. Dr. José Lino Oliveira Bueno, por agregar o conhecimento da psicologia experimental à minha formação de biólogo.*

*Aos novos doutores Danilo Ramos e Francisco Nather, pela hospitalidade na minha entrada ao laboratório, em 2003.*

*Ao técnico João Luis Segala Borin, pelo dedicado apoio e preocupação em manter todo o equipamento funcionando, apesar das dificuldades.*

*À Juliana Coli e Luana Georgete, pelo apoio técnico e burocrático.*

*Ao Leno Luis Dima, por me ensinar a fazer cirurgias e perfusões.*

*Às doutoras Taíza Helena Figueiredo e Valéria Catelli Infantozzi Costa, pelo apoio teórico e dicas sobre estatística.*

*Às novas mestras Danielle Marcílio Judice Daher e Tatiane Ferreira Tavares, por apoiarem minha entrada ao Programa de Pós-graduação em Psicobiologia.*

*Às colegas Vivian Maria Calderan, Steffi Pein, Alessandra Duarte da Silva e Melina Matthiesen, pela convivência e cooperação no dia-a-dia do biotério.*

*Aos amigos Caio Margarido Moreira, Cleiton Lopes Aguiar, Luis Fernando Scozzafave de Souza Pinto, Milton Ávila e Rafael Naime Ruggiero, pela interlocução sobre neurociências que ajudou a moldar minhas idéias.*

*Ao Prof. Dr. Gilberto Fernando Xavier, de São Paulo, pelas dicas sobre anestésicos.*



*Ao técnico Dalmo César Presta Nicola, do Prof. Dr. Luiz Marcelino de Oliveira, pelo auxílio nas modelagens de pressão às barras.*

*À Gabriela Campos Darahem, por ajudar no experimento durante fins-de-semana e feriados.*

*Ao Eldereis de Paula, pelo programa computacional preparado em VisualBASIC para controlar as sessões experimentais e registrar os dados.*

*Ao Amauri Ramos Pinhal e José Luiz Liberato, técnico e aluno, respectivamente, do Prof. Dr. Wagner Ferreira dos Santos, pelo auxílio durante o procedimento histológico.*

*À Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP e ao Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia, por possibilitarem os trabalhos.*

*Aos órgãos federais Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo financiamento das pesquisas.*



BUENO JÚNIOR, L. S. **Discriminação condicional e bi-seção temporal em ratos com lesão hipocampal**. 2008. 100 p. Dissertação (Mestrado em Psicobiologia) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

### RESUMO

O efeito da lesão seletiva citotóxica do giro denteado hipocampal foi avaliado durante tarefa operante de discriminação condicional e bi-seção temporal com duas barras. Foram utilizados ratos lesados no giro denteado com microinjeções de colchicina e ratos controle-operados. Sob regime de privação de água, os ratos foram submetidos a treino cujas práticas apresentaram luz de 4 s ou 16 s como estímulos condicionais. Independentemente da duração, a luz foi sempre seguida de intervalo vazio de 5 s e, depois, de tom puro de 5 s. Pressões à barra A foram reforçadas com gotas de água somente se emitidas durante o tom puro precedido pela luz de 4 s e pressões à barra B foram reforçadas somente durante o tom puro precedido pela luz de 16 s. No mesmo treino, foram apresentadas práticas com o tom puro de 5 s não precedido por luz, durante as quais pressões em qualquer barra não causaram efeito algum. O teste empregou práticas sem liberação de reforçador, iniciadas com luz de 4,0 s, 5,0 s, 6,4 s, 8,0 s, 10,0 s, 12,8 s e 16,0 para a obtenção de uma curva psicofísica de bi-seção temporal. Escolhendo a barra A ou B, os ratos dos dois grupos adquiriram a discriminação entre as duas durações de luz (4 e 16 s) apresentadas no treino. Independentemente das duas barras, os ratos aprenderam a responder durante tons precedidos por luz de qualquer duração e a não responder durante tons apresentados sozinhos. Além disto, o decurso das respostas operantes ao longo das práticas mostrou que a atividade operante aumentava durante o intervalo vazio entre luz e tom, indicando que a escolha entre as duas barras não foi mediada apenas por mero controle temporal, mas por uma relação condicional entre o sinal temporal (luz) e o estímulo condicionado (tom puro). A lesão do giro denteado não prejudicou nem a aquisição da discriminação condicional de durações nem o desempenho no teste de bi-seção temporal.

Palavras-chave: Discriminação condicional, bi-seção temporal, comportamento operante, giro denteado do hipocampo, lesão seletiva, colchicina, privação de água.



**BUENO JÚNIOR, L. S. Conditional discrimination and temporal bisection in rats with hippocampal lesion.** 2008. 100 p. Dissertation (Master degree in Psychobiology) – Faculty of Philosophy, Sciences and Letters of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

#### **ABSTRACT**

The effect of a selective cytotoxic lesion of the hippocampus' dentate gyrus was evaluated during an operant conditional discrimination and temporal bisection task with two levers. Rats lesioned in the dentate gyrus with colchicine microinjections and sham-operated rats were used. Under water deprivation, the rats were submitted to training trials with 4 and 16 s light as conditional stimuli. Both the 4 s and the 16 s light were always followed by an empty interval of 5 s, and then a 5 s pure tone. Lever A responses were reinforced with water only if emitted during the pure tone preceded by the 4 s light, and lever B responses were reinforced only during the pure tone preceded by the 16 s light. In the same training procedure, trials with the 5 s pure tone not preceded by light were presented, during which the responses were useless. In the test, trials without reinforcement, with 4,0 s, 5,0 s, 6,4 s, 8,0 s, 10,0 s, 12,8 s, and 16,0 s light, were presented in order to obtain a psychophysical temporal bisection curve. Choosing A or B levers, the rats of both groups acquired the duration discrimination between the 4 and 16 s light presented in the training phase. The rats learned to respond (in lever A or B) with high taxes during tones preceded by light of any duration and to emit low number of responses during pure tones presented alone. Also, the operant responding during the trials showed that the operant activity was higher in the empty interval between light and tone, indicating that the behavior of choosing between the two levers was not mediated only by a simple timing process, but was also mediated by a conditional relation between the time signal (light) and the conditioned stimulus (pure tone). The dentate gyrus lesion do not affected the conditional discrimination acquisition and the temporal bisection performance.

**Keywords:** Conditional discrimination, temporal bisection, operant behavior, hippocampal dentate gyrus, selective lesion, colchicine, water deprivation.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do circuito hipotético de controle temporal envolvendo os núcleos da base, retirada e adaptada a partir de Matell e Meck (2004).	31
Figura 2. Representação esquemática do modelo do tempo espectral, retirada e adaptada a partir de Grossberg e Merrill (1992).	35
Figura 3. Curvas de ativação nas várias etapas do modelo do tempo espectral, de Grossberg e Merrill (1992).	37
Figura 4. Esquemas representativos das práticas de pré-treino e treino, com a indicação das respostas corretas, e das práticas de teste.	59
Figura 5. Fotomicrografias de seções coronais do hipocampo coradas com cresil violeta.	66
Figura 6. Porcentagem média de pressões a qualquer barra durante o tom puro em relação ao total de respostas em cada sessão diária do pré-treino.	68
Figura 7. Números totais médios de pressões a qualquer barra em cada bloco de cinco sessões diárias do treino, independentemente dos estímulos, intervalos vazios e intervalos entre práticas.	70
Figura 8. Porcentagem média de tons puros durante os quais qualquer barra foi pressionada em cada bloco de cinco sessões do treino, comparando-se tons precedidos por luz de qualquer duração com tons apresentados sozinhos.	72
Figura 9. Números médios de respostas durante luz de 4 s, últimos 4 s da luz de 16 s, intervalo vazio de 5 s após luz de 4 s e intervalo vazio de 5 s após luz de 16 s, comparando-se a 1ª sessão diária do treino com a 60ª.	74
Figura 10. Porcentagem média de pressões à barra B durante tons em relação ao total de respostas emitidas somente durante tons precedidos por luz de 4 s ou luz de 16 s em cada bloco de cinco sessões do treino.	76
Figura 11. Porcentagem média de pressões à barra B durante tons em relação ao total de respostas emitidas somente durante tons pertencentes a práticas de teste em função das sete durações da luz precedente.	77



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Coordenadas estereotáticas para injeções de colchicina no giro denteado.	52
Tabela 2 – Procedimento experimental.	58
Tabela 3 – Áreas médias (em mm <sup>2</sup> ) das camadas piramidais de CA1 e CA3 e da camada granular do giro denteado em três níveis ântero-posteriores do hipocampo.	67



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	23
<b>1.1. Discriminação condicional</b>	23
<b>1.2. Durações como representações amodais</b>	25
<b>1.3. Manipulação de durações em discriminação condicional</b>	27
<b>1.4. Neurobiologia do controle temporal</b>	29
<i>1.4.1. Os circuitos dos núcleos da base</i>	29
<i>1.4.2. O modelo do tempo espectral</i>	34
<i>1.4.3. A propriedade escalar</i>	41
<b>1.5. Envolvimento do hipocampo em tarefas temporais</b>	42
<b>1.6. Objetivos</b>	49
<b>2. MATERIAL E MÉTODO</b>	51
<b>2.1. Sujeitos</b>	51
<b>2.2. Lesão seletiva bilateral</b>	51
<b>2.3. Equipamento experimental</b>	53
<b>2.4. Treino de pressão às barras</b>	54
<b>2.5. Pré-treino de discriminação simples</b>	55
<b>2.6. Treino de discriminação condicional</b>	55
<b>2.7. Teste de bi-seção temporal</b>	57
<b>2.8. Histologia</b>	59
<b>2.9. Análise dos dados</b>	60
<b>3. RESULTADOS</b>	65
<b>3.1. Histologia</b>	65
<b>3.2. Pré-treino de discriminação simples</b>	67
<b>3.3. Treino de discriminação condicional</b>	68
<b>3.4. Teste de bi-seção temporal</b>	76
<b>4. DISCUSSÃO</b>	79
<b>4.1. Desempenho em discriminação condicional e bi-seção temporal</b>	79
<b>4.2. Efeitos da lesão seletiva do giro denteado</b>	85
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	93



## 1. INTRODUÇÃO

### **1.1. Discriminação condicional**

Os elementos do condicionamento pavloviano clássico são: (1) uma relação inata entre determinado estímulo  $S_1$  e determinada resposta  $R_1$  (por exemplo, comida e salivação); e (2) um estímulo  $S_2$  sem relação inata com a resposta  $R_1$  (por exemplo, uma luz, que a princípio não elicia salivação). No condicionamento clássico, após pareamento repetido de  $S_2$  com  $S_1$ ,  $S_2$  passa a eliciar a resposta condicionada (por exemplo, a luz passa a eliciar salivação) (MILLENSON, 1977).

Enquanto procedimentos pavlovianos condicionam respostas eliciadas, procedimentos operantes aumentam a probabilidade da emissão de determinada resposta, desde que repetidamente pareada com uma consequência reforçadora. Assim, um rato sob privação de água, por exemplo, pode aprender a pressionar uma barra caso este comportamento seja consistentemente pareado com a oferta de água. Neste caso, a água adquire propriedade de estímulo reforçador, pois reforça o comportamento de pressionar a barra, aumentando a probabilidade de esta resposta ser emitida (CATANIA, 1999).

Um procedimento em que podem ser estudadas as respostas operantes é o de discriminação simples. A operação básica consiste em reforçar determinada resposta operante na presença de um estímulo A, mas não liberar reforçador caso a mesma resposta seja emitida na ausência do estímulo A. O processo resultante é o aumento da taxa da resposta operante durante a apresentação de A e a diminuição da taxa da mesma resposta quando A está ausente (MILLENSON, 1977).

Enquanto procedimentos de discriminação simples estudam associações básicas entre o estímulo discriminativo e o estímulo incondicionado, procedimentos de

discriminação condicional estudam as relações condicionais que podem ser estabelecidas entre dois estímulos discriminativos. Jenkins e Sainsbury (1969) realizaram procedimentos pavlovianos de discriminação condicional positiva que consistiram de: (1) apresentação de dois estímulos (X e A) formando um composto simultâneo (XA) seguido de estímulo incondicionado (XA+); e (2) apresentação do estímulo A sozinho e não seguido de estímulo incondicionado (A-). Os resultados mostraram que, dependendo da condição em que A é apresentado, se acompanhado de X ou não, o estímulo A pode adquirir, respectivamente, propriedade excitatória ou inibitória. De forma semelhante, na discriminação condicional negativa, XA não é seguido de estímulo incondicionado (XA-), enquanto A sozinho é seguido de estímulo incondicionado (A+). Porém, na discriminação condicional negativa, A adquire propriedade inibitória se acompanhado de X, e propriedade excitatória se apresentado sozinho. Tanto na discriminação condicional positiva quanto na negativa, X é denominado estímulo condicional (ou estímulo-característica) e A é denominado estímulo condicionado ou (estímulo-alvo).

Ross e Holland (1981), utilizando arranjos simultâneos (XA+/A-) em um procedimento pavloviano semelhante ao de Jenkins e Sainsbury (1969), fizeram um teste cujo resultado mostrou que o treino que apresenta arranjos simultâneos estabelece uma associação direta entre X e o estímulo incondicionado. Portanto, na verdade, X não adquire a propriedade de estímulo condicional em arranjos simultâneos. Em um segundo experimento no mesmo trabalho, utilizou-se um procedimento pavloviano de discriminação condicional positiva em que X e A foram apresentados em série e separados por um intervalo vazio (X→A). Neste procedimento, a série X→A foi seguida de estímulo incondicionado (X→A+) enquanto A apresentado sozinho não foi seguido de estímulo incondicionado (A-). Os dados da fase de treino mostraram que a

freqüência de respostas de orientação ao comedouro durante A precedido por X foi maior do que durante A apresentado sozinho. Num teste de transferência, a substituição do estímulo condicionado A por um estímulo B prejudicou a discriminação condicional, o que indicou que em procedimentos seriados ocorre associação básica do estímulo condicionado com o estímulo incondicionado, enquanto o estímulo condicional X define a ocasião (*occasion setting*) em que A será seguido de estímulo incondicionado.

No caso da discriminação condicional positiva, o estímulo condicional adquire propriedade excitatória. Porém, um estímulo condicional também pode adquirir propriedade inibitória durante treino de discriminação condicional negativa seriada. A discriminação condicional negativa foi examinada por diversos autores (HOLLAND, 1984; HOLLAND, 1985; PEARCE; HALL, 1980; RESCORLA; HOLLAND, 1977; WAGNER; RESCORLA, 1972). Holland e Lamarre (1984) submeteram animais ao procedimento simultâneo (XA- e A+) e seriado ( $X \rightarrow A-$  e A+) de discriminação condicional negativa e mostraram que a substituição de A por um estímulo B durante o teste prejudicou a discriminação somente de animais treinados com procedimento simultâneo. Deste modo, em discriminação condicional negativa seriada, X sinaliza a ausência de estímulo incondicionado após a apresentação do estímulo condicionado, já que, com o treino, a freqüência de respostas após A apresentado sozinho torna-se maior do que a freqüência de respostas após A precedido por X.

## **1.2. Durações como representações amodais**

Na relação do animal com o ambiente, os estímulos não são definidos somente pelas características físicas detectadas pelo aparato sensorial, mas também pelo processamento subsequente no sistema nervoso central (GIBSON, 1960). Apesar de os

receptores sensoriais serem sensíveis a muitos aspectos de um estímulo, somente alguns destes aspectos podem ser relevantes para o processamento da resposta comportamental. Este processo mediador do sistema nervoso central gera as representações dos estímulos externos (LAWRENCE, 1963).

Uma representação corresponde a uma espécie de cópia de um estímulo, armazenada e topograficamente organizada em áreas sensoriais do cérebro. É o caso das representações modais, originadas de estímulos luminosos, sonoros, etc. Quando um animal desenvolve a representação modal de uma informação adquirida do ambiente, esta representação pode ser usada futuramente, mesmo na ausência da informação que a originou (GALLISTEL, 1990). Esta capacidade cognitiva possibilita uma flexibilidade comportamental importante diante das mudanças imprevistas do meio (VAUCLAIR, 1996).

As áreas associativas do cérebro são capazes de produzir representações amodais dos estímulos. As representações amodais resultariam da abstração a partir de atributos físicos dos estímulos, independentemente das modalidades dos estímulos que as originaram (BUENO, 1997). Meck e Church (1982) tornaram a idéia consistente ao mostrarem que ratos são capazes de transferir a representação de uma duração adquirida com um estímulo luminoso para um estímulo sonoro. Neste caso, a representação amodal da duração mostrou-se independente da modalidade luminosa, que a originou. Isto indica, portanto, que ratos podem processar representações amodais, como as durações.

### 1.3. Manipulação de durações em discriminação condicional

Componentes temporais em procedimentos de discriminação condicional pavloviana foram examinados por Holland (1998) por meio da manipulação da duração do intervalo vazio, que separa o estímulo condicional do condicionado em arranjos seriados. Bueno, Wagatsuma e Martins (2007) também examinaram os efeitos de durações em um procedimento pavloviano de discriminação condicional. Diferentemente de Holland (1998), o objetivo de Bueno, Wagatsuma e Martins (2007) foi investigar se diferentes durações de um estímulo condicional de mesma modalidade podem adquirir propriedades excitatórias ou inibitórias. No trabalho de Bueno, Wagatsuma e Martins (2007) o procedimento pavloviano de discriminação condicional positiva envolveu dois tipos de práticas: (1) a apresentação de luz (L) como estímulo condicional com duração de 15 s (L15) seguida de um intervalo vazio de 5 s ( $\rightarrow$ ) precedendo um tom como estímulo condicionado (T) de 5 s (T5) e seguido de estímulo incondicionado (L15 $\rightarrow$ T5+); e (2) a apresentação de um tom de 5 s sozinho e sem estímulo incondicionado (T5-). Durante as mesmas sessões, os mesmos ratos também foram treinados em práticas de discriminação condicional negativa, com L5 $\rightarrow$ R15- (onde R é ruído branco) e R15+. Os resultados do treino mostraram que a frequência de respostas durante T5 precedido por L15 foi maior do que a frequência de respostas durante T5 sozinho. Além disto, a taxa de respostas durante R15 sozinho foi maior do que durante R15 precedido por L5. Estes resultados sugerem a aquisição de propriedade excitatória pela luz de 15 s e inibitória pela luz de 5 s. Portanto, uma mesma modalidade de estímulo, como a luz, pode adquirir propriedade excitatória e inibitória dependendo da duração com que é apresentada em treino de discriminação condicional positiva e negativa, respectivamente.

Os efeitos de durações de estímulos em discriminação condicional também foram examinados com procedimentos de condicionamento operante. Martins (2001) empregou o mesmo treino usado por Bueno, Wagatsuma e Martins (2007), porém utilizando um procedimento em que as respostas medidas foram pressões à barra. Deste modo, no trabalho de Martins (2001) era liberado um estímulo reforçador contingente a pressões à barra emitidas durante os estímulos condicionados. Após o treino, os animais foram testados em práticas em que os estímulos condicionados foram precedidos por diferentes durações do estímulo condicional, intermediárias entre as empregadas no treino (L5→T5-, L7→T5-, L9→T5-, L11→T5-, L13→T5-, L15→T5-, L5→R15-, L7→R15-, L9→R15-, L11→R15-, L13→R15- e L15→R15-). Os resultados do teste mostraram que a frequência de respostas durante a apresentação do estímulo condicionado variou conforme a duração do estímulo condicional precedente. A frequência de respostas emitidas durante T5 foi significativamente maior quando este estímulo condicionado era precedido por L15, L13 e L11, em comparação com as respostas durante T5 precedido por L9, L7 e L5. Estes resultados indicaram a aquisição de propriedade excitatória por L com duração próxima ou igual a 15 s, pois esta duração do estímulo condicional foi empregada nas práticas de discriminação condicional positiva. Além disto, foi mostrada a aquisição da propriedade inibitória por L com duração próxima ou igual a 5 s, já que esta duração foi empregada nas práticas de discriminação condicional negativa. O fato de o número de respostas emitidas após L15, L13 e L11 ter sido diferente do número de respostas emitidas após L9, L7 e L5 indicou a possibilidade de o comportamento dos ratos submetidos a este teste ter sido controlado por um processo de bi-seção temporal (CHURCH; DELUTY, 1977).

Os resultados de Bueno, Wagatsuma e Martins (2007) e Martins (2001) indicaram a aquisição de propriedade excitatória pela luz de 15 s e inibitória pela luz de

5 s, tanto com o emprego de um procedimento pavloviano (BUENO; WAGATSUMA; MARTINS, 2007) quanto de um procedimento operante (MARTINS, 2001). Portanto, um estímulo de mesma modalidade, como a luz, pode adquirir, para um mesmo animal e em condições experimentais semelhantes, propriedade excitatória e inibitória dependendo da duração com que é apresentado em treino de discriminação condicional positiva e negativa, respectivamente. De modo geral, os resultados dos dois trabalhos mostram que a manipulação de durações de estímulos afeta o desempenho de ratos em procedimentos de aprendizagem complexa.

## **1.4. Neurobiologia do controle temporal**

### *1.4.1. Os circuitos dos núcleos da base*

Os núcleos da base (estriado, *substantia nigra*, globo pálido e núcleo subtalâmico) são uma série de estruturas subcorticais que recebem informações, principalmente, do córtex, tálamo e mesencéfalo. São tradicionalmente conhecidos por seu papel no controle motor (CARLSSON, 1993; GRAYBIEL et al., 1994; PHILLIPS et al., 1993), mas seu envolvimento em vários processos motivacionais e cognitivos também tem sido descrito (GRAYBIEL, 1997; LAWRENCE; SAHAKIAN; ROBBINS, 1998; MIDDLETON; STRICK, 1994). Um dos processos cognitivos que têm sido atribuídos aos núcleos da base é o controle temporal de segundos, minutos e até horas (revisões: BUHUSI; MECK, 2005; MATELL; MECK, 2004).

O estriado funciona como estação de entrada de informações aos núcleos da base. Cada um de seus neurônios espinhosos médios possui ampla árvore dendrítica rica em espinhos sinápticos que recebem, em maior parte, aferências glutamatérgicas

excitatórias provenientes de todo o córtex e, em menor parte, aferências glutamatérgicas do tálamo, dopaminérgicas da *substantia nigra pars compacta* e GABAérgicas de axônios colaterais dos neurônios espinhosos médios da vizinhança. Cada neurônio espinhoso médio recebe de 10.000 a 30.000 axônios corticais, o que indica que eles funcionam como importantes pontos de convergência de excitações corticais (MATELL; MECK, 2004). Apesar desta grande influência excitatória cortical, os neurônios espinhosos médios são mantidos em estado hiperpolarizado em torno de -90 mV por meio da influência inibitória GABAérgica da vizinhança. No entanto, dependendo do padrão de excitação cortical que um neurônio espinhoso médio recebe, a polarização pode diminuir para até -60 mV, um estado que possibilita o potencial de ação (MATELL; MECK, 2004).

Neurônios dopaminérgicos da *substantia nigra pars compacta* também enviam projeções ao estriado, estabelecendo sinapses nos mesmos espinhos dendríticos que recebem as aferências corticais. Uma parte dos neurônios espinhosos médios possui receptores dopaminérgicos D1 e envia projeções ao segmento interno do globo pálido e à *substantia nigra pars reticulata*; outra parte possui receptores dopaminérgicos D2 e envia projeções ao segmento externo do globo pálido. Tanto os receptores D1 quanto os receptores D2 são ativados pela dopamina proveniente da *substantia nigra pars compacta*. Mas a ativação dos receptores D1 favorece a despolarização do neurônio espinhoso médio, enquanto a ativação dos receptores D2 tem efeito inibitório sobre o neurônio espinhoso médio (PURVES et al., 2005). Desta forma, a comunicação dopaminérgica nigro-estriatal é responsável por uma modulação bi-direcional da influência excitatória glutamatérgica córtico-estriatal (Figura 1).

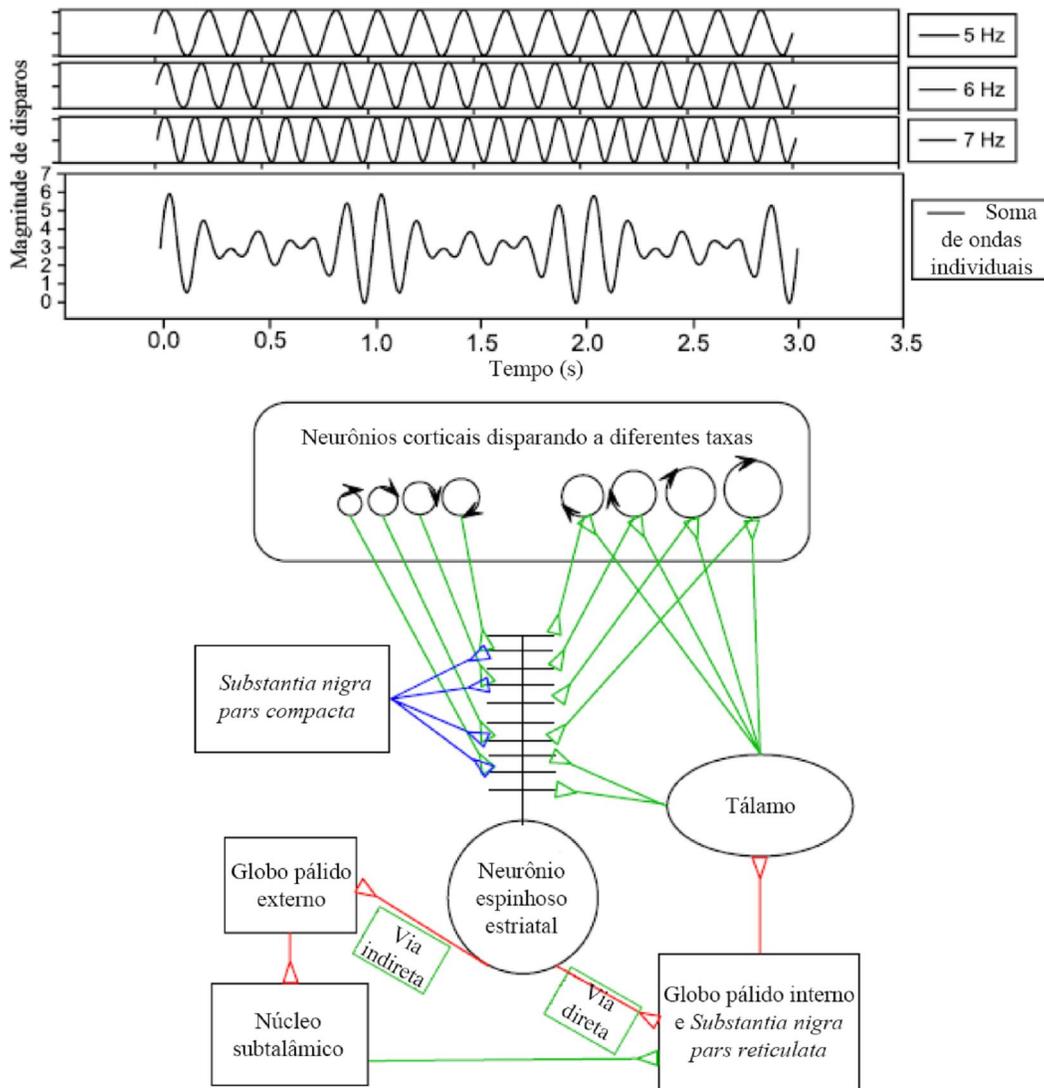


Figura 1. Representação esquemática do suposto circuito de controle temporal envolvendo os núcleos da base, retirada e adaptada a partir de Matell e Meck (2004). O topo da figura mostra três diferentes sinais corticais hipotéticos, bem como a soma destes sinais ao longo do tempo. Esta soma de sinais é transmitida a um único neurônio espinhoso médio estriatal, cuja árvore dendrítica está representada na parte inferior da figura. A parte inferior da figura também mostra o fluxo de informações dentro do circuito que envolve os núcleos da base. Linhas verdes = projeções glutamatérgicas; linhas vermelhas = projeções GABAérgicas; linhas azuis = projeções dopaminérgicas. O esquema simplificado mostra um único neurônio espinhoso médio estriatal participando das vias direta e indireta; no entanto, cada via recruta diferentes grupos de neurônios espinhosos médios.

São cada vez maiores as evidências de que a atividade estriatal, com seu conjunto de entradas excitatórias e inibitórias envolvendo glutamato, GABA e dopamina, é modulada por mecanismos hebbianos de fortalecimento sináptico: potenciação de longo prazo (*long term potentiation*, ou LTP) ou depressão de longo prazo (*long term depression*, LTD) (MATELL; MECK, 2004). Segundo Ljungberg, Apicella, Schultz (1992), que estudaram o comportamento pavloviano de macacos, um estímulo reforçador era acompanhado por aumento de atividade fásica de neurônios dopaminérgicos. Ao longo de um treino que pareou consistentemente o estímulo reforçador com um estímulo condicionado, os mesmos neurônios dopaminérgicos passavam a responder junto com o acionamento do estímulo condicionado, mantendo sua atividade fásica até a liberação do reforçador, quando eles paravam de disparar. De acordo com Matell e Meck (2004), isto seria uma evidência de como a influência dopaminérgica nigro-estriatal pode acontecer conforme as contingências temporais estabelecidas no ambiente. Os neurônios espinhosos médios estriatais, embora sujeitos a uma influência glutamatérgica cortical oscilante (Figura 1), se mantêm hiperpolarizados. Cada neurônio espinhoso médio pode interromper seu estado hiperpolarizado, emitindo disparos desencadeados por determinados padrões de atividade cortical. Estes padrões de atividade cortical são temporalmente organizados, e as sinapses que os transmitem a um determinado neurônio espinhoso médio são passíveis de fortalecimento via LTP. Este fortalecimento seria devido à coincidência temporal dos padrões de atividade cortical e da liberação de dopamina pela *substantia nigra pars compacta*, informações incidentes sobre grupos específicos de neurônios espinhosos médios estriatais (MATELL; MECK, 2004). Portanto, o estabelecimento da contingência temporal entre um estímulo condicionado e um estímulo incondicionado ocorreria por meio do fortalecimento das sinapses que transmitem um padrão particular

de oscilação de atividade cortical a um grupo de neurônios espinhosos médios estriatais. Neste fortalecimento sináptico hebbiano, o papel modulador da dopamina nigro-estriatal seria fundamental.

A partir dos neurônios espinhosos médios estriatais contendo receptores dopaminérgicos D1 (que promovem excitação se ligados à dopamina), a informação inibitória GABAérgica que trafega pela via direta dos núcleos da base chega à *substantia nigra pars reticulata* e ao segmento interno do globo pálido (Figura 1). Como estas duas estruturas mantêm uma inibição, também GABAérgica, tonicamente ativa em direção a núcleos do tálamo, a ativação da via direta inibe a inibição promovida pela *substantia nigra pars reticulata* e pelo segmento interno do globo pálido, desinibindo, assim, os núcleos do tálamo (Figura 1). Conseqüentemente, os núcleos do tálamo se despolarizam o suficiente para emitirem disparos excitatórios glutamatérgicos em direção, principalmente, a várias regiões do córtex, fechando a alça composta pelo córtex, núcleos da base e tálamo, de volta ao córtex (Figura 1). Por outro lado, a partir dos neurônios espinhosos médios estriatais contendo receptores dopaminérgicos D2 (que promovem inibição se ligados à dopamina), a informação inibitória GABAérgica que trafega pela via indireta dos núcleos da base chega ao segmento externo do globo pálido que, por sua vez, inibe o núcleo subtalâmico (Figura 1). Como o núcleo subtalâmico envia projeções excitatórias glutamatérgicas à *substantia nigra pars reticulata* e ao segmento interno do globo pálido, a inibição tônica recebida pelos núcleos do tálamo é favorecida, o que desfavorece a excitação glutamatérgica talâmica em direção, principalmente, ao córtex (Figura 1) (revisões: PARENT; HAZRATI, 1995a, 1995b).

No âmbito do controle temporal, estas duas vias de informações processadas pelos núcleos da base modulam, em última análise, a excitação tálamo-cortical que pode

ser responsável: (1) pela facilitação/inibição de uma resposta condicionada por uma contingência temporal; (2) pela alteração da atividade oscilatória cortical recebida pelos neurônios espinhosos estriatais, o que pode levar a um término do padrão oscilatório subjacente a um esquema temporal de reforço e, conseqüentemente, ao reinício do processo que recrutou um grupo específico de neurônios espinhosos médios estriatais (MATELL; MECK, 2004). Esta modulação da excitação tálamo-cortical seria, por sua vez, influenciada pelo fortalecimento de sinapses córtico-estriatais através da LTP promovida pelas vias dopaminérgicas nigro-estriatais (no caso da aquisição de um esquema temporal) ou pelo enfraquecimento sináptico via LTD envolvendo as mesmas vias (no caso da extinção de um esquema temporal) (MATELL; MECK, 2004).

#### *1.4.2. O modelo do tempo espectral*

Diferentemente da interpretação neurobiológica que considera os núcleos da base como centralizadores do controle temporal, o modelo do tempo espectral, desenvolvido por Grossberg e Schmajuk (1989) e aperfeiçoado por Grossberg e Merrill (1992), inclui o hipocampo no circuito temporal. O modelo do tempo espectral, como qualquer rede neural computacional, simula dados comportamentais através de uma série de equações, cada uma correspondente a uma etapa de um circuito.

Segundo Grossberg e Merrill (1992), uma representação sensorial talâmica é constituída por uma população integrada de neurônios que é ativada pelo estímulo ambiental correspondente. Esta ativação pode ser temporariamente auto-sustentada, pois a representação exerce uma retroalimentação positiva sobre ela mesma (Figura 2A). Além disto, cada representação sensorial talâmica se comunica diretamente com uma representação correspondente no córtex, com a qual mantém excitação recíproca (Figura

2A). Porém, diferentes representações talâmicas, com suas respectivas correspondências corticais, exercem efeitos inibitórios entre si (Figura 2A). Assim, a representação sensorial talâmica mais estimulada pelo ambiente é a que mais se mantém ativada, pela sua retroalimentação positiva interna e pela retroalimentação positiva recíproca com a correspondente cortical; simultaneamente, a representação talâmica mais estimulada pelo ambiente é a que mais inibe as representações talâmicas concorrentes. Deste modo, dependendo da estimulação ambiental, determinadas representações sensoriais tálamo-corticais vencem a competição, e a recorrência temporária da ativação de seus circuitos consiste na memória de curto prazo (GROSSBERG; MERRILL, 1992).

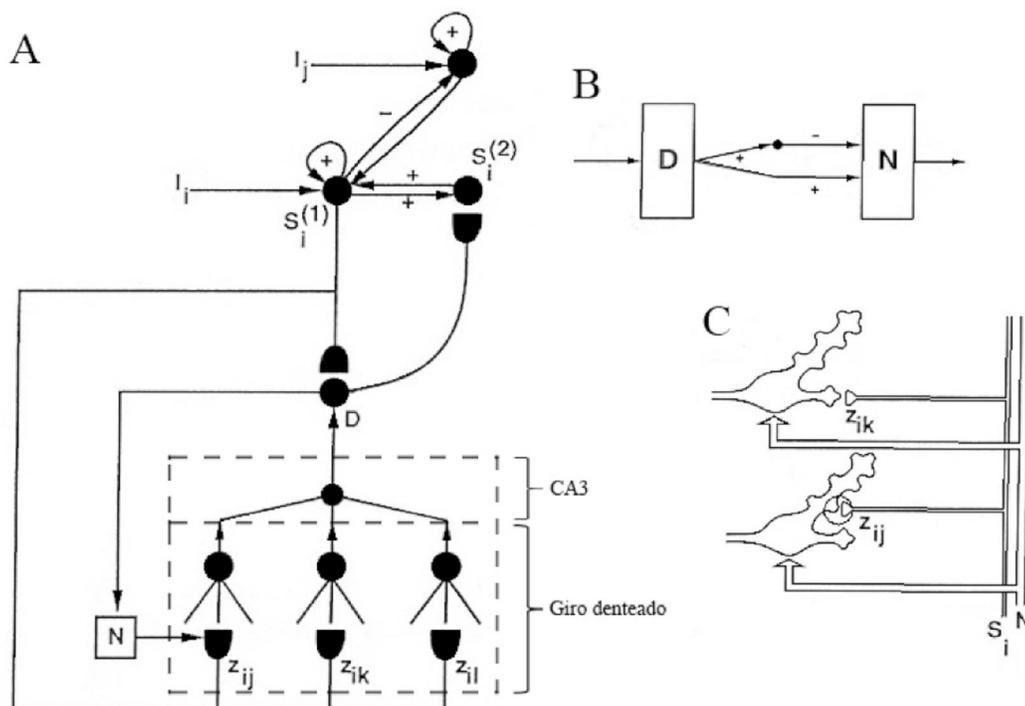


Figura 2. Representação esquemática do modelo do tempo espectral, retirada e adaptada a partir de Grossberg e Merrill (1992). Painel A: círculos pretos = etapas, ou nós, da rede neural simulada; semicírculos pretos = terminações sinápticas; + e - = vias excitatórias e inibitórias, respectivamente;  $I_i$  e  $I_j$  = entradas, ou *inputs*, sensoriais  $i$  e  $j$ , respectivamente;  $S_i^{(1)}$  e  $S_i^{(2)}$  = representações sensoriais talâmicas e corticais, respectivamente, do *input*  $i$ ;  $D$  = *drive* motivacional;  $N$  = sinalizador *Now print*; CA3 = corno de Ammon 3 do hipocampo;  $z_{ij}$ ,  $z_{ik}$  e  $z_{il}$  = aferências à camada granular do giro denteado hipocampal conduzindo potenciais de ação a diferentes taxas. Painel B: detalhamento da comunicação entre o *drive* motivacional e o sinalizador *Now print*, mediada por uma via excitatória direta e uma via inibitória indireta. Painel C: detalhamento de duas células granulares do giro denteado recebendo aferências do sinalizador *Now print* e de representações sensoriais.

Determinado estímulo ambiental ativa uma determinada representação sensorial tálamo-cortical. Contudo, se o estímulo tem valor motivacional, sendo reforçador ou punitivo, sua representação tálamo-cortical se comunica, adicionalmente, a representações de *drive* contidas em estruturas límbicas, como o hipotálamo, a amígdala e o hipocampo (Figura 2A). Se um estímulo neutro é consistentemente pareado com um estímulo incondicionado que possui valor motivacional, o estímulo inicialmente neutro assume a propriedade de estímulo condicionado, desencadeando respostas semelhantes às respostas que, outrora, eram desencadeadas somente pelo estímulo incondicionado. Segundo Grossberg e Merrill (1992), esta aprendizagem se deve a mecanismos hebbianos de plasticidade sináptica em que a representação sensorial do estímulo condicionado passa a ativar as representações de *drive* inicialmente ativadas somente pelo estímulo incondicionado. Tal plasticidade sináptica, caracterizada pela criação e fortalecimento de novas conexões, consiste na aquisição de memórias de longo prazo.

No nível tálamo-cortical, a apresentação do estímulo condicionado faz com que sua representação sensorial mantenha-se ativada por certo tempo, em função de suas retroalimentações positivas inerentes (Figura 3A). No caso do estímulo incondicionado, este processo de manutenção temporária da ativação ocorre não só no nível tálamo-cortical, mas também no nível das representações límbicas de *drive* (Figura 3A). No entanto, já que o estímulo condicionado passa a ativar, indiretamente, as representações de *drive* correspondentes ao estímulo incondicionado, a ativação temporária desencadeada pelo estímulo condicionado se soma, em seguida, à ativação temporária promovida pelo estímulo incondicionado no nível do *drive* (Figura 3A).

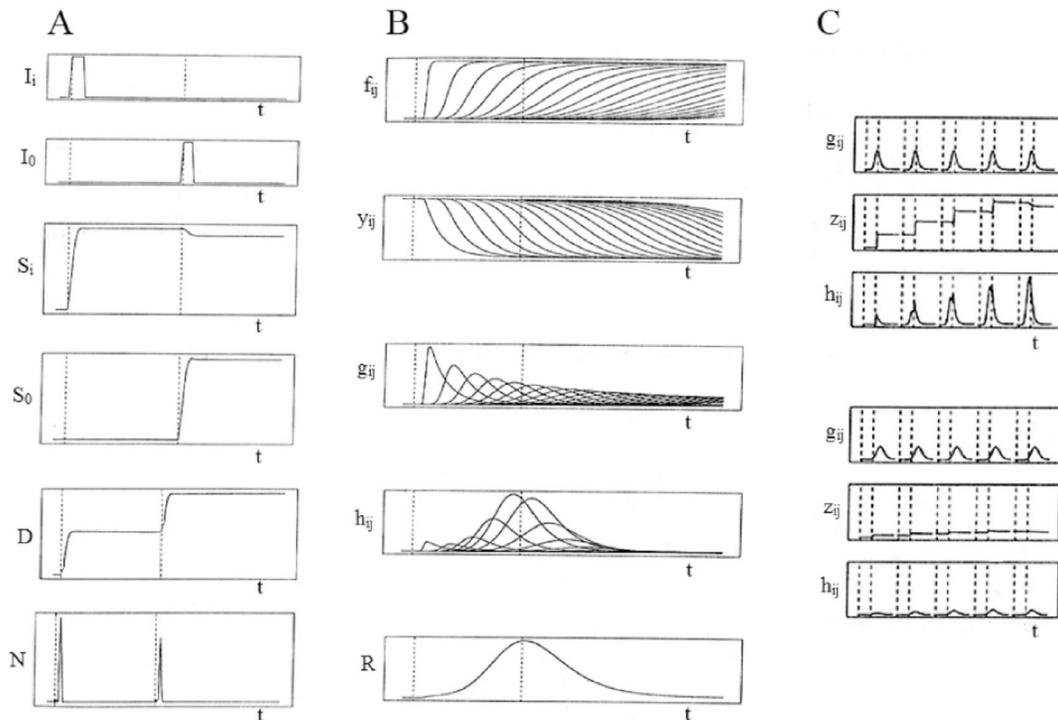


Figura 3. Curvas de ativação nas várias etapas do modelo do tempo espectral, retiradas e adaptadas a partir de Grossberg e Merrill (1992). Em todos os gráficos a linha pontilhada esquerda indica o momento de apresentação do estímulo condicionado  $I_i$  e a linha pontilhada direita, do estímulo incondicionado  $I_0$ , com valor motivacional. Paineil A:  $I_i$  e  $I_0$  = estímulos condicionado e incondicionado, respectivamente;  $S_i$  e  $S_0$  = representações sensoriais correspondentes aos estímulos condicionado e incondicionado, respectivamente, mostrando ativação sustentada;  $D$  = *drive* motivacional, onde as ativações provenientes de  $S_i$  e  $S_0$  são somadas;  $N$  = sinalizador *Now print*, com suas ativações não sustentadas. Paineil B:  $f_{ij}$  = curvas de ativação representando diferentes taxas de potenciais de ação provenientes da representação sensorial  $S_i$  e direcionados a uma célula granular do giro denteado;  $y_{ij}$  = curvas de habituação dos neurotransmissores liberados pelas terminações pré-sinápticas provenientes de  $S_i$ ;  $g_{ij}$  = soma de  $f_{ij}$  e  $y_{ij}$ , resultando em um espectro de ativação pós sináptica;  $h_{ij}$  = viés do espectro de ativação pós-sináptica promovido pela ativação de  $S_0$ , através do sinal *Now print* correspondente ao estímulo incondicionado;  $R$  = resultado da convergência dos espectros de ativação em direção ao CA3 hipocampal. Paineil C: gráficos mostrando duas curvas individuais  $g_{ij}$  do espectro de ativação, sendo que os gráficos superiores mostram uma curva cujo pico é altamente coincidente com o momento do estímulo incondicionado, enquanto nos gráficos inferiores, a coincidência temporal é baixa.  $z_{ij}$  = sinapses aferentes à camada granular do giro denteado sendo fortalecidas ao longo da aprendizagem do sistema;  $h_{ij}$  = resultado do gradual fortalecimento sináptico sobre a curva integrante do espectro de ativação  $g_{ij}$ .

No modelo de Grossberg e Merrill (1992), as representações de *drive* são conectadas a um sinalizador *Now print*, cuja interpretação neurobiológica não chegou a

ser esclarecida pelos autores. De qualquer forma, o sinalizador *Now print* é uma etapa do modelo que recebe aferências das representações de *drive* através de duas vias: uma via direta excitatória e uma via indireta mediada por um interneurônio inibitório com propagação lenta de potenciais de ação (Figura 2B). A ativação presente nas representações de *drive* é rapidamente transmitida ao sinalizador *Now print* por meio da via excitatória direta. Simultaneamente, a ativação presente nas representações de *drive* também trafega pela outra via, excitando o interneurônio inibitório lento, que, por sua vez, inibe a excitação do sinalizador *Now print* que havia acabado de ser transmitida pela via direta excitatória. Desta forma, em contraste com a ativação temporariamente sustentada das representações de *drive* (Figura 3A), a ativação do sinalizador *Now print* é curta (Figura 3A). Considerando-se o caso em que é apresentado um estímulo condicionado seguido de um estímulo incondicionado, o sinal *Now print* é ativado duas vezes: a primeira ativação se deve ao estímulo condicionado e a segunda, ao incondicionado (Figura 3A). E estas duas ativações, diferentemente do que ocorre nas representações de *drive*, não se somam, já que são curtas.

As representações de *drive* incluem os circuitos do hipocampo. Uma parte importante da comunicação entre as representações sensoriais e o hipocampo se dá através da via perfurante, que contém projeções à camada granular do giro denteado (HARRY; D'HELLENCOURT, 2003). Segundo Grossberg e Merrill (1992), os espinhos dendríticos das células granulares do giro denteado recebem informações de várias representações sensoriais (Figuras 2A e 2C). Deste modo, as células granulares do giro denteado funcionam como pontos de convergência, para os quais são conduzidas informações provenientes de diferentes representações sensoriais, com diferentes taxas de potenciais de ação (Figuras 2A e 2C). Como as células granulares recebem estes potenciais de ação a diferentes taxas, cada célula granular corresponde a

uma média específica de taxas de potenciais de ação pré-sinápticos. Estas ativações médias pré-sinápticas que chegam ao giro denteado são distribuídas ao longo de um espectro de ativação que é limitado pela quantidade máxima de neurotransmissores (glutamato) que podem ser liberados na fenda sináptica (Figura 3B). O teto de ativação imposto pela quantidade disponível de neurotransmissores é o mesmo ao longo de todo o espectro de ativação pré-sináptica. Porém, cada curva do espectro atinge este teto somente após uma duração específica (Figura 3B). As curvas de ativação mais íngremes, que correspondem às taxas mais altas de potenciais de ação pré-sinápticos, são as que atingem o teto de ativação mais rapidamente. Como os neurotransmissores das terminações pré-sinápticas para as quais chegam as taxas mais altas de potenciais de ação são liberados mais rapidamente, a eliminação destes neurotransmissores na fenda sináptica também é mais rápida. O oposto acontece no caso das terminações pré-sinápticas, para as quais chegam taxas mais baixas de potenciais de ação (Figura 3B). O resultado pós-sináptico da soma da condução eletroquímica pré-sináptica com o processo de habituação dos neurotransmissores na fenda sináptica é um espectro de curvas de ativação aproximadamente gaussianas, cada uma correspondendo a uma aferência sináptica à célula granular. Cada uma destas curvas de ativação pós-sinápticas possui um pico de ativação com localização temporal específica (Figura 3B).

Além de serem excitadas pelas representações sensoriais conforme um espectro de ativação, as células granulares do giro denteado também são influenciadas pelo sinalizador *Now print*, que envia informações acerca do posicionamento temporal do estímulo incondicionado ao giro denteado (Figuras 2A e 2C). A ativação curta do sinalizador *Now print* gerada pelo estímulo incondicionado é transmitida às células granulares de maneira geral, podendo encontrar maior ou menor coincidência com os picos de ativação pós-sinápticos correspondentes a cada aferência à célula granular.

Como os picos de ativação pós-sinápticos também são posicionados no tempo, as aferências às células granulares cujos picos de ativação coincidem mais fortemente com a ativação do sinal *Now print* são fortalecidas por potenciação de longo prazo, ou LTP (Figura 3C). Deste modo, segundo Grossberg e Merrill (1992) o condicionamento temporal ocorreria no nível do giro denteado, onde determinados grupos de células granulares passariam a responder mais intensamente no momento exato do reforço ou punição esperada (Figura 3C).

Segundo o modelo de Grossberg e Merrill (1992), muitas células granulares do giro denteado convergem suas ativações em direção a células piramidais individuais do CA3 hipocampal através das fibras musgosas. Esta noção de convergência de informações do giro denteado ao CA3 é consistente com o fato de que, em ratos, existem cerca de 1.000.000 de células granulares do giro denteado, enquanto no CA3, as células piramidais não passam de, aproximadamente, 160.000 (BOSS; PETERSON; COWAN, 1985; BOSS et al., 1987). Assim, a ativação espectral pós-sináptica das células granulares, enviesada pela posição temporal do estímulo incondicionado, é resumida pela convergência de informações nas células piramidais do CA3, que se comunicam com as representações de *drive* e, indiretamente, com as representações sensoriais corticais (Figura 2A). Esta comunicação de retorno contribui para o fortalecimento hebbiano das representações sensoriais que são relevantes para a contingência temporal em questão e, desta forma, o sistema é capaz de aprender durante o treino de um esquema temporal de reforço.

Apesar de o modelo de simulação matemática de Grossberg e Schmajuk (1989) ser originalmente destinado a explicar dados comportamentais de condicionamento clássico com esquemas temporais envolvendo milissegundos a poucos segundos, Grossberg e Merrill (1992), ao aperfeiçoarem o modelo, indicaram que ele pode ser

generalizado para processos comportamentais envolvendo durações da faixa de segundos a minutos, como os processos subjacentes aos procedimentos de intervalo fixo e DRL. Elementos das simulações matemáticas de Grossberg e Schmajuk (1989) e Grossberg e Merrill (1992) também foram usados por Grossberg e Merrill (1996) e Gorchetchnikov e Grossberg (2007) como integrantes de uma rede neural mais ampla que inclui o papel do hipocampo no controle espacial. No entanto, informações sobre o envolvimento do hipocampo no controle espacial e detalhes adicionais sobre as maneiras com que estes sistemas simulados aprendem não serão descritos aqui por não fazerem parte do escopo do presente trabalho.

#### *1.4.3. A propriedade escalar*

Embora a neurobiologia subjacente ao controle temporal ainda seja debatida, é bem conhecida a propriedade escalar dos dados comportamentais obtidos com procedimentos temporais (GIBBON, 1977). A propriedade escalar temporal é caracterizada pelo fato de o desvio-padrão de uma curva de respostas ao longo do tempo ser proporcional à média desta curva de respostas; esta média corresponde ao pico do número de respostas, posicionado em determinado momento da tarefa de estimação temporal. Assim, a propriedade escalar temporal obedece à lei de Weber, segundo a qual uma mudança na magnitude física de um estímulo só pode ser percebida se esta mudança da magnitude física for maior do que uma determinada proporção da magnitude original (MATELL; MECK, 2004). No caso do controle temporal, quanto maiores as durações a serem estimadas, maiores as variações das curvas de respostas em torno das médias e, portanto, maior a diferença física necessária para que haja a percepção de uma diferença sensorial.

A propriedade escalar mostra-se ubíqua, pois além de ser encontrada em vários tipos de procedimentos temporais, como procedimento de pico e DRL, ela é fielmente simulada tanto através do modelo do tempo espectral, que inclui o hipocampo e outros circuitos límbicos (GROSSBERG; SCHMAJUK, 1989; GROSSBERG; MERRILL, 1992), quanto através do modelo que envolve os circuitos dos núcleos da base, com sua modulação dopaminérgica sobre a comunicação tálamo-cortical (MATELL; MECK, 2004).

### **1.5. Envolvimento do hipocampo em tarefas temporais**

Ratos com lesões hipocámpais mostram deficiência no desempenho de diversas tarefas. Estudos com lesões seletivas do hipocampo têm indicado que suas diferentes regiões estão envolvidas em processos comportamentais distintos (por exemplo, XAVIER; OLIVEIRA-FILHO; SANTOS, 1999). Um processo que tem sido relacionado ao hipocampo é a memória para durações na faixa de milissegundos a segundos e um procedimento operante amplamente utilizado para investigar este controle temporal sobre o comportamento é o procedimento de pico. Neste procedimento, o sujeito é submetido a dois tipos de práticas que ocorrem em seqüência aleatória e com a mesma probabilidade: práticas de intervalo fixo e práticas de pico. Nos dois tipos de práticas, ocorre um sinal temporal exteroceptivo (luz ou som). Nas práticas de intervalo fixo, a primeira pressão à barra emitida após uma duração mínima do sinal temporal exteroceptivo (por exemplo, 20 s) resulta em interrupção do sinal e liberação de reforçador. Em contraste, nas práticas de pico o sinal permanece ligado por um período relativamente longo após a duração mínima e o reforço é omitido, independentemente das respostas operantes. Deste modo, as práticas de pico fornecem

curvas de respostas aproximadamente gaussianas, com um aumento gradual da taxa de respostas durante o período mínimo, um pico de respostas localizado sobre o final do período mínimo e posterior declínio gradual da taxa de respostas. Utilizando ratos previamente treinados em práticas de pico, Meck, Church e Olton (1984), Olton, Meck e Church (1987) e Meck (1988) estudaram os efeitos da lesão eletrolítica da fímbria, sobre o controle temporal do comportamento. Os autores apresentaram a lesão eletrolítica da fímbria como maneira de prejudicar o funcionamento do hipocampo como um todo, pois esta lesão interrompe uma das principais vias de comunicação do hipocampo com o septo (HARRY; D'HELLEN COURT, 2003). No caso de Meck (1988), ratos lesados na fímbria e ratos de um grupo controle foram treinados em procedimento de pico com a duração mínima de 20 s. Após a aquisição dos picos de respostas, os ratos foram transferidos para uma nova etapa de treino com a duração mínima de 10 s, até os picos de respostas se deslocarem em torno da nova duração. No fim do treino com duração mínima de 20 s, os ratos lesados mantiveram picos de respostas ao redor de 16 s; e no fim do treino com duração mínima de 10 s, os picos de respostas dos ratos lesados se mantiveram em torno de 8 s. Adiantamentos dos picos de respostas provocados pela lesão da fímbria também foram encontrados por Meck, Church e Olton (1984) e Olton, Meck e Church (1987). Os autores destes três estudos que utilizaram procedimento de pico mostraram que apesar de as curvas de respostas dos ratos lesados terem sido deslocadas, sua variação em torno do pico não foi afetada em relação aos grupos-controle. Estes resultados foram interpretados, nos três trabalhos, como indícios de que a função hipocampal é importante para a memória de eventos temporais, mas não para o mecanismo que mede tempo. Afinal, o fato de a variação em torno dos picos de respostas não ter sido afetada pela lesão indicaria a manutenção da

propriedade escalar weberiana, amplamente descrita pela literatura sobre controle temporal e teorizada inicialmente por Gibbon (1977).

Os trabalhos de Dietrich, Allen e Bunnell (1997) e Dietrich e Allen (1998), em que também foram estudados os efeitos da lesão hipocampal sobre o desempenho de ratos em procedimento de pico, mostram resultados contraditórios em comparação com os de Meck, Church e Olton (1984), Olton, Meck e Church (1987) e Meck (1988). Nos experimentos de Dietrich, Allen e Bunnell (1997) e Dietrich e Allen (1998), ratos com todo o hipocampo dorsal lesado por aspiração foram submetidos a um procedimento de pico com período mínimo de 40 s. Os ratos lesados no hipocampo dorsal mostraram aquisição do pico de respostas igual ao processo de aquisição do grupo controle. Segundo Dietrich, Allen e Bunnell (1997) e Dietrich e Allen (1998), o contraste entre seus resultados negativos quanto à participação do hipocampo em procedimento de pico e os resultados positivos obtidos por Meck, Church e Olton (1984), Olton, Meck e Church (1987) e Meck (1988) sugere que os diferentes componentes do sistema septo-hipocampal, em que a fímbria é a principal via de comunicação, têm participações distintas na memória de eventos temporais. Além disto, as diferentes durações mínimas empregadas nestes trabalhos sobre lesão hipocampal e procedimento de pico também podem ter influenciado os resultados.

Jarrard e Becker (1977) já haviam estudado efeitos de lesões em diferentes subdivisões do hipocampo sobre o desempenho de ratos em uma tarefa temporal. Estes autores utilizaram DRL (*differential reinforcement of low rates*), uma tarefa diferente do procedimento de pico por não apresentar sinal temporal exteroceptivo. Em DRL, o período mínimo para que uma pressão à barra resulte em liberação de reforçador é iniciado pela resposta anterior. Deste modo, uma pressão à barra só é reforçada se separada da resposta anterior pelo período mínimo, e isto faz com que respostas

precoces sejam punidas pelo reinício do período mínimo e conseqüente prorrogação da oportunidade de obtenção de reforçador. Jarrard e Becker (1977) mostraram que a interrupção de conexões entre CA3 e septo por meio de lesão na fímbria, similar às lesões de Meck, Church e Olton (1984), Olton, Meck e Church (1987) e Meck (1988), prejudicaram a aquisição de DRL. Por outro lado, lesões no CA1 e nas projeções do hipocampo para o *subiculum* não produziram prejuízos. Os resultados de DRL de Jarrard e Becker (1977), junto com os resultados de procedimento de pico de Meck, Church e Olton (1984), Olton, Meck e Church (1987) e Meck (1988) indicam que a fímbria, que comunica o hipocampo com o septo (HARRY; D'HELLEN COURT, 2003), pode estar envolvida no controle temporal. As idéias de Jarrard e Becker (1977) quanto à participação do CA3 foram corroboradas pelo trabalho de Kishimoto et al. (2006), cujos sujeitos experimentais foram camundongos mutantes quanto a receptores NMDA nas células piramidais do CA3. Quando submetidos a um condicionamento clássico que pareou um estímulo auditivo com choque elétrico em uma das pálpebras, os camundongos mutantes mostraram precisão temporal prejudicada ao emitirem as respostas condicionadas.

O prejuízo de desempenho em DRL provocado por lesões hipocampais de vários tipos é encontrado com grande freqüência na literatura (HADDAD; RABE, 1967; ELLEN; AITKEN, 1970; JOHNSON et al., 1977; ACSÁDI et al., 1986; SINDEN et al., 1986; WOODRUFF et al., 1987; JALDOW; OAKLEY, 1990). Sem utilizar lesão, Young e McNaughton (2000) evidenciaram ainda mais a participação do hipocampo em DRL ao registrarem a atividade elétrica de grupos de neurônios piramidais de CA1 e CA3 em ratos desempenhando a tarefa. Young e McNaughton (2000) encontraram um padrão eletrofisiológico caracterizado por um aumento de atividade em CA1 e CA3 imediatamente após uma resposta (reforçada ou não), seguido de diminuição gradual até

um patamar mínimo consistentemente acompanhado da resposta seguinte (reforçada ou não).

De acordo com o modelo do tempo espectral (GROSSBERG; SCHMAJUK, 1989; GROSSBERG; MERRILL, 1992), o giro denteado do hipocampo também pode estar envolvido no controle temporal sobre o comportamento. Suas células granulares exercem importante papel no fluxo de informações que ocorre dentro do hipocampo, pois recebem informações do córtex entorrinal (através da via perfurante) excitando os cornos de Ammon, ou CA (HARRY; D'HELLEN COURT, 2003). Goldschmidt e Steward (1980, 1982) forneceram um modelo para o estudo dos efeitos de lesão seletiva do giro denteado ao mostrarem que injeções de colchicina no giro denteado produzem eliminação seletiva de suas células granulares, causando danos pequenos em outras regiões hipocampais e em axônios de passagem. A colchicina se liga às tubulinas destas células granulares bloqueando o processo mitótico e o transporte ao longo dos axônios (HANSON; ESTROM, 1978). Utilizando DRL, Costa, Bueno e Xavier (2005) e Bueno et al. (2006) realizaram experimentos envolvendo lesão seletiva do giro denteado do hipocampo por aplicações de colchicina. Costa, Bueno e Xavier (2005) realizaram as lesões entre a fase de treino e a de teste, enquanto Bueno et al. (2006) o fizeram antes do treino. Os dados do teste pós-lesão de Costa, Bueno e Xavier (2005) indicaram que os animais com lesão no giro denteado mantiveram a capacidade de espaçar suas respostas por um determinado intervalo. Porém, em relação aos controle-operados, os animais lesados encurtaram para, em média, 16 s a duração do intervalo de espaçamento entre respostas treinado antes das cirurgias, que foi de 20 s, um resultado semelhante ao encontrado por Meck, Church e Olton (1984) e Meck (1988) em procedimento de pico. Os dados da aquisição de DRL de Bueno et al. (2006) indicaram que o desempenho dos ratos lesados foi permanentemente prejudicado.

Tendo em vista os resultados obtidos por Costa, Bueno e Xavier (2005) e Bueno et al. (2006), o estudo de Bueno e Bueno-Júnior (2007) visou à avaliação do desempenho de ratos com lesão do giro denteado do hipocampo durante outra tarefa temporal, que utilizou discriminação condicional com manipulação da duração do estímulo condicional. Neste trabalho, foi retomado o procedimento de Martins (2001), porém com a comparação entre os desempenhos de ratos lesados no giro denteado do hipocampo e de ratos controle-operados. Os resultados do treino e do teste foram idênticos aos obtidos por Martins (2001) e, em contraste com os dados obtidos com DRL, não foi encontrado prejuízo no desempenho dos ratos lesados. Utilizando radiação ionizante para lesar o giro denteado de ratos recém-nascidos, Moreira e Bueno (2003) também mostraram que o giro denteado não é necessário para o desempenho em discriminação condicional. Os resultados do teste de Bueno e Bueno-Júnior (2007) indicaram, assim como Martins (2001), a possibilidade de o comportamento dos ratos ter sido controlado por um processo de bi-seção temporal. Esta possível bi-seção temporal também não se mostrou prejudicada nos ratos lesados.

O procedimento de bi-seção temporal é um dos métodos utilizados para mostrar de que maneira a representação de tempo muda conforme as mudanças das durações físicas (CHURCH; DELUTY, 1977). Neste tipo de procedimento, o sujeito é treinado para distinguir uma duração curta de uma duração longa, emitindo uma resposta A reforçada somente após a duração curta e uma resposta B reforçada somente após a duração longa. Estabelecida a aquisição, é iniciado um teste em que são introduzidas durações intermediárias às duas durações previamente treinadas. No teste, o ponto de bi-seção temporal, ou ponto de igualdade subjetiva, é indicado pela duração intermediária correspondente à igual probabilidade de emissão da resposta A e da resposta B. Stubbs (1968, 1976) mostrou que o ponto de bi-seção temporal de pombos corresponde a

durações intermediárias próximas da média geométrica entre as durações curta e longa apresentadas no treino, o que indicou que a representação de durações em pombos cresce com função logarítmica em relação às durações físicas. Church e Deluty (1977) mostraram que o ponto de bi-seção temporal de ratos também corresponde à média geométrica entre as durações curta e longa apresentadas no treino, o que indicou que a representação de durações em ratos também cresce com função logarítmica em relação às durações físicas. Autores como Meck, Church e Olton (1984), Raslear (1983, 1985), Siegel (1986), Morrissey et al. (1993), Ho et al. (1995, 1996) e Al-Zahrani et al. (1997) também obtiveram este resultado com ratos.

Assim como procedimento de pico e DRL, o procedimento de bi-seção temporal também pode ser utilizado na investigação sobre o envolvimento do hipocampo no comportamento temporal. Meck, Church e Olton (1984) mostraram que a lesão eletrolítica da fímbria, semelhantemente aos efeitos de lesões hipocampais sobre o desempenho em procedimento de pico e DRL, não destruiu o controle temporal sobre o comportamento, já que os ratos lesados continuaram a discriminar as durações em teste de bi-seção temporal. Porém, o ponto de bi-seção temporal de ratos lesados foi deslocado em direção à duração mais curta, o que indicou que ratos lesados na fímbria tendem a categorizar as durações intermediárias como mais duradouras do que realmente são. Este resultado é condizente com o adiantamento dos picos de respostas de ratos lesados no hipocampo durante tarefas de procedimento de pico e DRL.

Martins (2001) e Bueno e Bueno Júnior (2007) também utilizaram um procedimento cujo treino apresentou uma duração curta e uma duração longa e cujo teste introduziu durações intermediárias. No entanto, o objetivo destes estudos não foi o de investigar a bi-seção temporal, e sim o de investigar as propriedades excitatórias e inibitórias de duas diferentes durações em práticas de discriminação condicional

seriada. Diferentemente dos procedimentos de bi-seção temporal, Martins (2001) e Bueno e Bueno-Júnior (2007) utilizaram somente uma classe de resposta operante (pressão à barra) e durações intermediárias de teste programadas em uma progressão aritmética ao invés de uma progressão geométrica, como fizeram Church e Deluty (1977), Meck, Church e Olton (1984), Raslear (1983, 1985), Siegel (1986), Morrissey et al. (1993), Ho et al. (1995, 1996) e Al-Zahrani et al. (1997).

### **1.6. Objetivos**

Utilizando discriminação condicional seriada, Bueno e Bueno Júnior (2007) mostraram que a lesão seletiva do giro denteado do hipocampo não prejudica a discriminação de durações de estímulos condicionais em ratos. Utilizando DRL, Costa, Bueno e Xavier (2005) e Bueno et al. (2006) também mostraram que ratos lesados no giro denteado do hipocampo não perdem a capacidade de estimar tempo, porém mostraram que a precisão da estimacão temporal é prejudicada. Considerando-se: (1) a possibilidade de o giro denteado estar envolvido em estimacão temporal, o que foi teorizado por Grossberg e Schmajuk (1989) e Grossberg e Merrill (1992) e sugerido empiricamente por Costa, Bueno e Xavier (2005) e Bueno et al. (2006); e (2) a possibilidade de um eventual deslocamento do ponto de bi-seção temporal não poder ser mostrado pelo procedimento de Bueno e Bueno Júnior (2007), o presente estudo visou a uma adaptacão do procedimento de discriminação condicional usado por Bueno e Bueno Júnior (2007) no sentido de acessar o ponto de bi-seção temporal de ratos em função da lesão seletiva do giro denteado do hipocampo. Para isto, foram comparados os desempenhos de dois grupos de ratos: lesados e controle-operados.



## **2. MATERIAL E MÉTODO**

### **2.1. Sujeitos**

Foram utilizados 29 ratos Wistar adultos machos provenientes do biotério central do *campus* de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, experimentalmente ingênuos e pesando de 350 a 400 g no início do experimento. Durante todo o experimento, os ratos foram mantidos em caixas plásticas individuais sob ciclo diário de iluminação das 6:00 às 18:00. A partir da chegada dos ratos ao laboratório, todos receberam dieta *ad libitum* e, durante o ganho de peso, cada animal teve seu peso monitorado até a observação de cinco dias consecutivos de oscilação menor ou igual a 10 g. O peso estável de cada rato foi definido pela média de pesos registrados nestes cinco dias de estabilização. A partir de então, os ratos passaram pela fase de cirurgias e, após a recuperação pós-cirúrgica, um regime de privação de água manteve os animais com cerca de 85% de seus pesos estáveis até o fim do experimento.

A utilização dos ratos para o experimento foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do *campus* de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, segundo o protocolo 06.1.1406.53.9.

### **2.2. Lesão seletiva bilateral**

Os ratos foram submetidos à cirurgia antes da fase experimental. Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de uma solução anestésica composta por cloridrato de cetamina 10%, cloridrato de xilazina 2% e diazepam, na dose de 3,3 mL por 1.000 g de animal. Após a anestesia e após injeção intramuscular de um antibiótico veterinário (*Pentabiótico*), a cabeça dos animais foi presa em aparelho estereotáxico, o

couro cabeludo sofreu incisão longitudinal com bisturi e o bregma do crânio foi tomado como ponto zero para o eixo ântero-posterior. Os pontos zero do eixo meso-lateral fizeram parte da linha mediana, evidenciada pela sutura sagital do crânio. A partir de então, toda a face dorsal do crânio delimitada anteriormente pelo bregma e posteriormente pelo lambda foi, para cada rato, removida por desgaste utilizando-se uma broca, com cuidado especial para não danificar o córtex. Desta forma, a face dorsal do encéfalo subjacente à área craniana desgastada ficava exposta para a aplicação de microinjeções da neurotoxina colchicina dissolvida em tampão fosfato-salina na concentração de 7 mg/mL e pH 7,4. As microinjeções foram aplicadas com microsseringas *Hamilton* de 5 µL com micropipetas de vidro acopladas à extremidade da agulha de metal, a fim de minimizar a lesão tecidual decorrente dos trajetos dorso-ventrais até o giro denteado. Os pontos zero do eixo dorso-ventral foram tomados com base na superfície da dura-máter, indicada pela mesma micropipeta de vidro. Os pontos de injeção, orientados de maneira geral por Paxinos e Watson (2007), foram os mesmos usados por Xavier, Oliveira-Filho e Santos (1999) e Costa, Bueno e Xavier (2005) e estão indicados na Tabela 1. A lesão do giro denteado foi bilateral.

Tabela 1 – Coordenadas estereotáxicas para injeções de colchicina no giro denteado

AP	ML (ambos os hemisférios)	DV (dura-máter = 0)
-2,3	1,0	-3,4
-3,0	1,4	-3,4
-4,0	2,0	-3,3
-4,8	3,1	-3,5
-4,8	3,9	-7,2
-5,7	4,1	-3,8
-5,7	4,9	-4,0
-5,7	4,9	-4,8
-5,7	4,9	-5,6

AP = eixo ântero-posterior; ML = eixo meso-lateral; DV = eixo dorso-ventral, com ponto zero no nível da dura-máter.

O trajeto da micropipeta de vidro em direção a cada ponto estereotáxico foi percorrido lentamente. Com a extremidade da micropipeta devidamente posicionada, foram injetados 60 nL da solução de colchicina em cada ponto estereotáxico. Após cada microinjeção, a posição da micropipeta era mantida por 60 s para evitar o refluxo da neurotoxina ao longo do trato causado pelo trajeto da própria micropipeta. Durante toda a seqüência de microinjeções, a superfície da dura-máter era mantida umedecida com solução salina. Ao final de cada cirurgia, o couro cabeludo era suturado e cada rato recebia injeção subcutânea de *Banamine*, um analgésico antiinflamatório e antipirético. Os ratos controle-operados foram submetidos aos mesmos procedimentos, exceto pelas microinjeções.

Dos 29 ratos submetidos à cirurgia, sete morreram após a injeção do anestésico. Os demais 22 ratos (10 controle-operados e 12 lesados) sobreviveram sem infecções até o fim do experimento.

### **2.3. Equipamento experimental**

Foram empregadas seis caixas operantes com interior medindo 28 cm de comprimento, 21 cm de altura e 21 cm de profundidade, com teto, frente e fundo de acrílico, laterais metálicas e piso de grade metálica. A parede metálica esquerda de cada caixa operante continha um bebedouro, formado por um reservatório inserido em uma abertura circular de 5 cm de diâmetro a 2 cm do piso, dentro do qual eram liberadas as gotas de água. O bebedouro ficava equidistante entre duas barras (A e B), distanciadas uma da outra por 8 cm e permanentemente inseridas a 7 cm do piso. Em cada caixa operante foi mantida iluminação ininterrupta com uma lâmpada vermelha de 7 W sobre o teto de acrílico. Ao lado da lâmpada vermelha, foi instalada uma lâmpada de teto

branca de 7 W, acionada de acordo com o controle experimental. Externamente a cada caixa operante, foi instalada uma caixa de som de 20 W para a emissão de um tom puro de 1.000 Hz e 95 dB. As caixas de som foram acionadas por um gerador de áudio. Cada caixa operante, junto com suas lâmpadas e sua caixa de som, foi acusticamente isolada dentro de uma caixa de madeira com interior medindo 50 cm x 50 cm x 50 cm. Cada uma destas caixas de madeira possuíam ventoinhas, que serviram tanto para a ventilação interna quanto para a produção de um ruído mascarador de 65 dB. Os seis conjuntos de aparatos experimentais foram, por sua vez, mantidos dentro de um cubículo isolado acusticamente. Todo o experimento foi controlado em uma sala adjacente através de uma interface conectada a um microcomputador, acionada por um programa computacional preparado com *Microsoft VisualBASIC*. As respostas dos ratos foram registradas pelo mesmo programa computacional.

#### **2.4. Treino de pressão às barras**

Depois de uma recuperação pós-cirúrgica de duas semanas, os ratos foram treinados para localizar o bebedouro e pressionar uma barra única. Para metade dos ratos do grupo experimental e metade dos ratos do grupo controle, foi inserida somente a barra A, à esquerda do bebedouro; para a outra metade dos ratos, foi inserida somente a barra B, à direita do bebedouro. Em seguida, os ratos foram submetidos a duas sessões de reforço contínuo com alternância forçada, em que as duas barras foram permanentemente inseridas na caixa operante. Em cada uma destas duas sessões de reforço contínuo com alternância forçada, as primeiras duas pressões a uma das barras eram reforçadas com uma gota de água, enquanto nenhuma pressão à barra oposta era reforçada. Após o segundo reforço, os dois reforçadores seguintes eram liberados

somente após pressão à outra barra. Esta alternância entre as duas barras de dois em dois reforços foi mantida até a totalização de 50 reforços para cada barra em cada sessão.

## **2.5. Pré-treino de discriminação simples**

Os ratos do grupo experimental e do grupo controle foram submetidos a um pré-treino de discriminação simples (Tabela 2) com sessões diárias de, em média, 60 min. Em cada sessão do pré-treino, um tom puro com duração máxima de 5 s (T5) foi apresentado 50 vezes, sendo que a primeira pressão a qualquer barra durante T5 resultava em desligamento imediato do estímulo sonoro. Em metade das apresentações de T5, somente a pressão à barra A resultava em liberação de água no bebedouro (T5\_A+/B-); na outra metade, somente pressões à barra B eram reforçadas (T5\_B+/A-) (Figura 4). Tons com respostas corretas à barra A e à barra B foram apresentados em ordem aleatória. Os intervalos entre tons, com ausência de estímulos, foram de 51,2 s, 64,0 s ou 80,0 s em seqüência aleatória. O pré-treino durou três sessões diárias, realizadas com regularidade de horário.

## **2.6. Treino de discriminação condicional**

Após o pré-treino de discriminação simples, os ratos foram submetidos a um treino de discriminação condicional (Tabela 2) com sessões diárias de, em média, 60 min. Em cada sessão do treino, foram apresentados três tipos de práticas. Dois deles eram iniciados pelo acionamento da luz branca de teto (estímulo condicional), sendo que a duração da luz poderia ser de 4 s ou de 16 s (L4 ou L16, respectivamente). Com o desligamento da luz, não importando sua duração, ocorria um intervalo vazio de 5 s

(representado por  $\rightarrow$ ) seguido de um tom puro (estímulo condicionado) de, no máximo, 5 s (T5). Pressões a qualquer barra não produziam efeito algum durante o período com luz e durante o intervalo vazio. Se a prática fosse iniciada com luz de 4 s e se a resposta durante o tom puro fosse emitida na barra A, o estímulo sonoro era imediatamente interrompido, a prática era terminada e havia liberação de água no bebedouro ( $L4 \rightarrow T5\_A+$ ); se a prática fosse iniciada com a mesma duração e se a resposta durante o tom puro fosse emitida na barra B, os eventos eram os mesmos, mas não havia liberação de reforçador ( $L4 \rightarrow T5\_B-$ ) (Figura 4). Nas práticas iniciadas com luz de 16 s, a cadeia de eventos era a mesma. Porém, somente a pressão à barra B durante o tom puro era reforçada ( $L16 \rightarrow T5\_B+/L16 \rightarrow T5\_A-$ ) (Figura 4). No terceiro tipo de prática, era apresentado o tom puro sozinho com duração de, no máximo, 5 s. Pressões a qualquer barra emitidas durante o tom puro apresentado sozinho apenas interrompiam-no, sem produzir liberação de água ( $T5\_A-/B-$ ) (Figura 4). Em cada sessão diária, tanto a prática  $L4 \rightarrow T5\_A+/B-$  quanto a prática  $L16 \rightarrow T5\_B+/A-$  ocorriam 20 vezes cada uma, enquanto  $T5\_A-/B-$  era apresentada somente 10 vezes, a fim de tornar mais rápida a aquisição da discriminação entre as duas durações de luz. Tanto as práticas quanto os intervalos entre práticas, de 51,2 s, 64,0 s ou 80,0 s, foram apresentados em seqüências aleatórias. O treino durou 60 sessões diárias, realizadas com regularidade de horário, sendo que nas primeiras 50 sessões foi empregado um método de correção em que práticas  $L4 \rightarrow T5\_A+/B-$  e  $L16 \rightarrow T5\_B+/A-$  terminadas com respostas incorretas eram repetidas na tentativa seguinte, suspendendo-se a seqüência aleatória de práticas. Tal repetição de correção persistia até que fosse emitida a resposta correta, quando era retomada a seqüência aleatória de práticas. Nas últimas 10 sessões do treino, este método de correção foi suspenso. A posição das barras A e B foi contrabalanceada entre

os sujeitos, ou seja, para metade do grupo experimental e metade do grupo controle, a barra A foi a esquerda e para a outra metade dos ratos a barra A foi a direita.

## 2.7. Teste de bi-seção temporal

Na fase de teste (Tabela 2), as condições do treino foram mantidas, porém com as seguintes mudanças: (1) o método de correção manteve-se suspenso, assim como nas últimas 10 sessões do treino; (2) as práticas T5\_A-/B- foram eliminadas e tanto as práticas L4→T5\_A+/B- quanto as práticas L16→T5\_B+/A- passaram a ser apresentadas 18 vezes por sessão; (3) em meio às seqüências aleatórias de práticas padrão L4→T5\_A+/B- e L16→T5\_B+/A-, foram introduzidas práticas de teste sem liberação de reforçador que apresentaram as seguintes durações de luz: 4,0 s, 5,0 s, 6,4 s, 8,0 s, 10,0 s, 12,8 s e 16,0 s (L4,0→T5\_A-/B-, L5,0→T5\_A-/B-, L6,4→T5\_A-/B-, L8,0→T5\_A-/B-, L10,0→T5\_A-/B-, L12,8→T5\_A-/B- e L16,0→T5\_A-/B-) (Figura 4); em cada sessão, cada uma destas sete práticas de teste foi apresentada somente duas vezes, totalizando 50 práticas junto com as práticas padrão; (4) nas práticas de teste, especificamente, o estímulo condicionado tom puro não era interrompido antes de completar 5 s de duração, independentemente das respostas dos ratos. O teste durou nove sessões diárias, realizadas com regularidade de horário.

Tabela 2 – Procedimento experimental

	Pré-treino		Treino		Teste	
	Práticas	Apresentações	Práticas	Apresentações	Práticas	Apresentações
Número de apresentações de cada prática por sessão diária	T5_A+/B- T5_B+/A-	25 25	L4→T5_A+/B- L16→T5_B+/A- T5_A-/B-	20 20 10	L4→T5_A+/B- L16→T5_B+/A- L4,0→T5_A-/B- L5,0→T5_A-/B- L6,4→T5_A-/B- L8,0→T5_A-/B- L10,0→T5_A-/B- L12,8→T5_A-/B- L16,0→T5_A-/B-	18 18 2 2 2 2 2 2 2 2
Intervalos entre práticas	51,2 s, 64,0 s e 80,0 s		51,2 s, 64,0 s e 80,0 s		51,2 s, 64,0 s e 80,0 s	
Número de sessões diárias	3		60		9	
Método de correção	Ausente		Presente até a 50ª sessão diária		Ausente	
Duração das sessões diárias	60 min em média		60 min em média		60 min em média	

T5 = tom puro de 5 s; L = luz branca; números após L = durações da luz branca em segundos; → = intervalo vazio de 5 s; A+ = pressão à barra A durante tom puro reforçada; A- = pressão à barra A durante tom puro não reforçada; B+ = pressão à barra B durante tom puro reforçada; B- = pressão à barra B durante tom puro não reforçada.

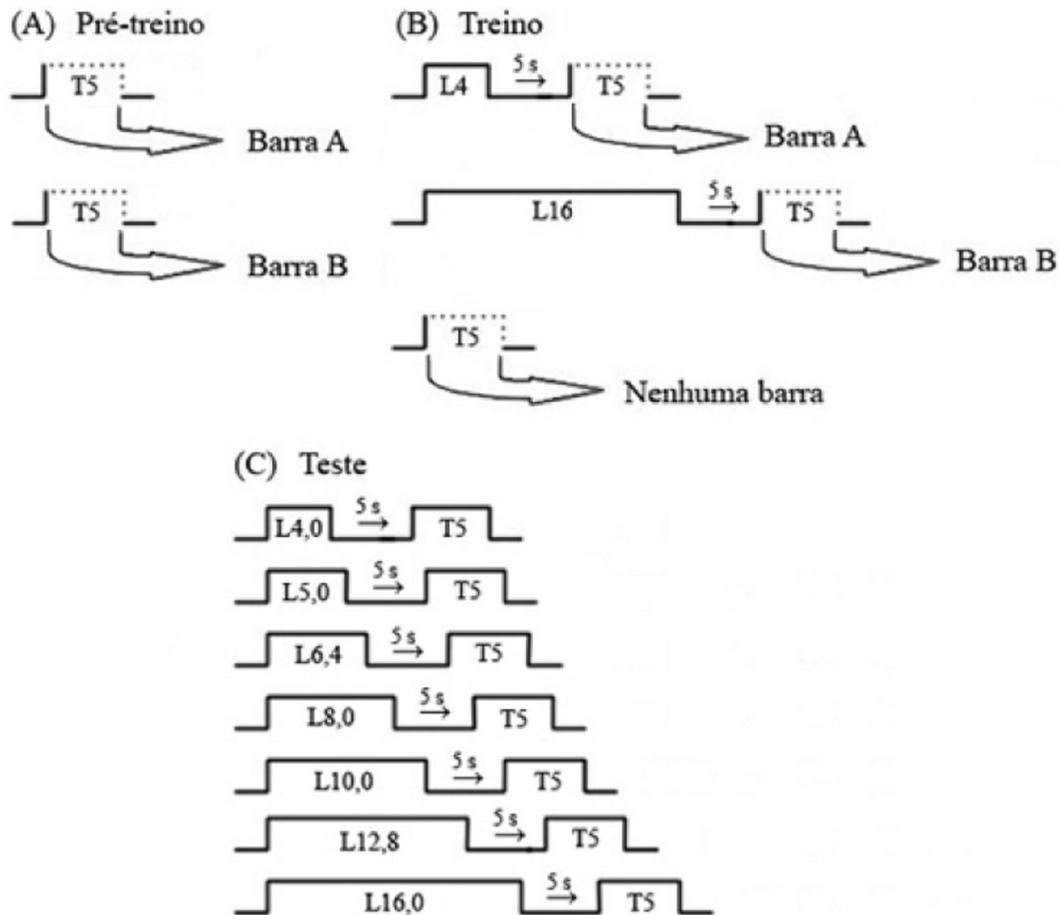


Figura 4. Esquemas representativos das práticas de pré-treino (painel A) e treino (painel B), com a indicação das respostas corretas, e das práticas de teste (painel C). T5 = tom puro de 5 s; L = luz branca; números após L = durações da luz branca em segundos;  $\rightarrow$  = intervalo vazio de 5 s. Nos painéis A e B, as linhas pontilhadas sobre T5 indicam que, apesar de a duração do tom puro ser de 5 s, ele podia ser interrompido mais cedo por uma pressão a qualquer barra. No painel C, as linhas contínuas sobre T5 indicam que o tom puro não era interrompido antes dos 5 s, independentemente de pressões a qualquer barra.

## 2.8. Histologia

Ao término do procedimento experimental, os ratos foram anestesiados, por injeção intraperitoneal, com a mesma solução anestésica utilizada nas cirurgias. Sob o início do efeito da anestesia, os ratos foram perfundidos com solução tampão de sulfeto de sódio. Seus encéfalos foram retirados dos crânios, passaram por pós-fixação em uma solução à base de álcool etílico absoluto, clorofórmio absoluto, ácido acético glacial e

sulfeto de sódio (*carney*) e foram incluídos em parafina. Os cortes histológicos coronais, de 20  $\mu\text{m}$ , foram feitos ao micrótomo. A cada 10 fatias, uma foi colocada em lâmina histológica e as demais foram descartadas, para a obtenção de cortes distanciados em 200  $\mu\text{m}$  entre si. Utilizou-se a coloração de violeta de cresil para visualização de corpúsculos de Nissl e, portanto, dos corpos celulares hipocâmpais.

As fotomicrografias dos cortes histológicos de todos os ratos foram capturadas digitalmente por meio de um microscópio óptico *Leica*. O enquadramento das imagens evidenciou as camadas piramidais de CA1 e CA3 e a camada granular do giro denteado em ambos os hemisférios. A fim de se mostrar a extensão ântero-posterior da lesão ao longo de todo o giro denteado, foram fotografadas as seções correspondentes a três níveis do hipocampo no eixo ântero-posterior: -2,52 mm, -4,36 mm e -6,00 mm (PAXINOS; WATSON, 2007). Para cada nível ântero-posterior do hipocampo, foi medida a área, em  $\text{mm}^2$ , das camadas piramidais de CA1 e CA3 e da camada granular do giro denteado de cada rato, utilizando-se o programa computacional *Image Tool*, desenvolvido pela UTHSCSA (*The University of Texas Health Science Center in San Antonio*). Especificamente no nível ântero-posterior de aproximadamente -4,36 mm, cujos cortes incluem uma porção ventral do hipocampo, as medições foram feitas somente na parte dorsal do hipocampo.

## **2.9. Análise dos dados**

Para cada um dos três níveis ântero-posteriores do hipocampo, as áreas das camadas piramidais de CA1 e CA3 e da camada granular do giro denteado de ratos lesados e controle-operados foram comparadas por meio do teste *t* de *Student* para amostras independentes.

Com base no registro de pressões a qualquer barra emitidas por ratos do grupo experimental e do grupo controle no pré-treino, foi calculada, para cada sessão, a porcentagem média de respostas durante T5 em relação ao total de respostas. A análise de variância de dois fatores (ANOVA), tomando-se as três sessões diárias como medidas repetidas, foi usada para avaliar o efeito de grupos, o efeito de sessões e o efeito de interação grupos/sessões. A comparação pós *hoc* de Newman-Keuls foi utilizada para a comparação entre os dois grupos de ratos em cada sessão.

Os dados do treino foram analisados de quatro maneiras, sempre incluindo a comparação entre os desempenhos de ratos do grupo experimental e do grupo controle. Na primeira, foram calculadas as médias dos números totais de pressões a qualquer barra em cada sessão, independentemente dos estímulos, intervalos vazios e intervalos entre práticas. Na segunda, também para cada sessão, foram obtidas as porcentagens médias de tons durante os quais foi emitida pressão a qualquer barra, de modo a se comparar tons precedidos por luz de qualquer duração com tons apresentados sozinhos. O uso da porcentagem de tons ao invés das respostas nesta segunda análise se justifica por tornar comparáveis os tons sozinhos, apresentados somente 10 vezes por sessão, com os tons precedidos por luz de qualquer duração, apresentados 40 vezes por sessão. A terceira análise também considerou as respostas sem diferenciar as barras, mas comparando-se somente os dados da primeira sessão de treino com os dados da última sessão de treino. Nesta terceira análise, foram calculadas as médias dos números de respostas emitidas durante: (1) L4; (2) os últimos 4 segundos de L16; (3) o intervalo vazio após L4; e (4) o intervalo vazio após L16. Na quarta e última análise, foram obtidas, para cada sessão, as porcentagens de pressões à barra B emitidas durante tom precedido por L4 ou L16 em relação ao total de respostas emitidas somente durante tons precedidos por luz, de maneira a se comparar o responder à barra A e à barra B durante

os tons de acordo com a duração da luz precedente. Na primeira, segunda e quarta análises, as comparações foram feitas à luz da análise de variância de dois fatores (ANOVA), tomando-se blocos de cinco sessões diárias como medidas repetidas, para avaliação do efeito de grupos, efeito de blocos de cinco sessões e efeito de interação grupos/blocos, seguidas do teste pós *hoc* de Newman-Keuls para comparações dentro de blocos individualmente. Na terceira análise, especificamente, foi utilizado o teste *t* de *Student* para amostras dependentes, entre a 1<sup>a</sup> e a 60<sup>a</sup> sessão, e para amostras independentes, entre grupos de ratos.

A análise do teste lidou somente com as práticas de teste, desprezando-se as respostas emitidas durante práticas de treino e durante intervalos entre práticas. Na somatória das respostas emitidas durante os tons de todas as práticas de teste apresentadas nas nove sessões da fase de teste, foi calculada a porcentagem de pressões à barra B posteriores a cada duração de L (4,0 s, 5,0 s, 6,4 s, 8,0 s, 10,0 s, 12,8 s e 16,0 s). Isto gerou, para cada rato, uma curva psicométrica: a porcentagem média de pressões à barra B durante tons em função da duração da luz precedente. Dentro da escala contendo as durações de L, o ponto de bi-seção temporal, ou ponto de igualdade subjetiva, foi definido pela duração de L correspondente a 50% de probabilidade de pressão à barra B durante o tom. À semelhança de Raslear (1983, 1985), o ponto de bi-seção temporal foi definido por simples interpolação gráfica, pois a irregularidade das curvas psicométricas individuais de alguns ratos não permitiria o uso da estimação dos mínimos quadrados, responsável pelas curvas psicométricas sigmóides obtidas por trabalhos envolvendo ratos (CHURCH; DELUTY, 1977; MECK; CHURCH; OLTON, 1984; MORRISSEY et al., 1993; HO et al., 1995, 1996; AL-ZAHRANI et al., 1997). A análise de variância de dois fatores (ANOVA), tomando-se as durações de L como medidas repetidas, foi usada para comparar as curvas psicométricas referentes ao grupo

controle e ao grupo experimental quanto ao efeito de grupos, efeito de durações de L e efeito de interação grupos/durações. O nível  $\alpha$  de significância estatística foi  $P \leq 0,05$ .

Dos 22 ratos que sobreviveram à fase de cirurgias, três lesados jamais adquiriram a discriminação entre as duas durações de luz, apesar de terem adquirido a discriminação condicional entre tons precedidos por luz de qualquer duração e tons apresentados sozinhos. Portanto, estes três ratos não foram submetidos ao teste de biseção temporal e seus dados foram excluídos da análise final do pré-treino e do treino de discriminação condicional. Desta forma, todos os resultados referem-se a 10 ratos controle-operados e nove ratos lesados.



### **3. RESULTADOS**

#### **3.1. Histologia**

A avaliação por microscopia óptica das seções coronais submetidas à coloração com cresil violeta (Figura 5) revelou que os ratos lesados sofreram extensa perda bilateral de células granulares do giro dentado, em comparação com ratos do grupo controle. Esta perda foi observada ao longo de todo o eixo ântero-posterior. Junto com esta redução da camada granular do giro dentado em toda a extensão do hipocampo, houve uma redução menor da camada piramidal do CA1 somente no nível ântero-posterior de -4,36 mm. Além disto, também foi observada diminuição pequena da camada piramidal de CA3 apenas a -2,52 mm e -4,36 mm. Não houve dano tecidual aparente no córtex suprajacente.

Como mostra a Tabela 3, a área média bilateral da camada granular do giro dentado nos ratos lesados ficou significativamente menor do que nos controle-operados nos três níveis ântero-posteriores do hipocampo: -2,52 mm ( $t=6,53$ ;  $P<0,05$ ), -4,36 mm ( $t=16,38$ ;  $P<0,05$ ) e 6,00 mm ( $t=12,70$ ;  $P<0,05$ ). Em seções posteriores ao bregma em 2,52 mm, 4,36 mm e 6,00 mm, a redução da área da camada granular do giro dentado foi, respectivamente, de 51,11%, 80,95% e 62,76%. Quanto à camada piramidal de CA1, houve redução significativa de 43,26% somente a -4,36 mm ( $t=3,96$ ;  $P<0,05$ ). Quanto à camada piramidal de CA3, reduções menores, porém significativas, foram encontradas apenas a -2,52 mm e -4,36 mm: 19,81% ( $t=2,54$ ;  $P<0,05$ ) e 16,76% ( $t=2,62$ ;  $P<0,05$ ) respectivamente (Tabela 3). Estes resultados histológicos são semelhantes aos descritos por Xavier et al. (1999) e Costa et al. (2005).

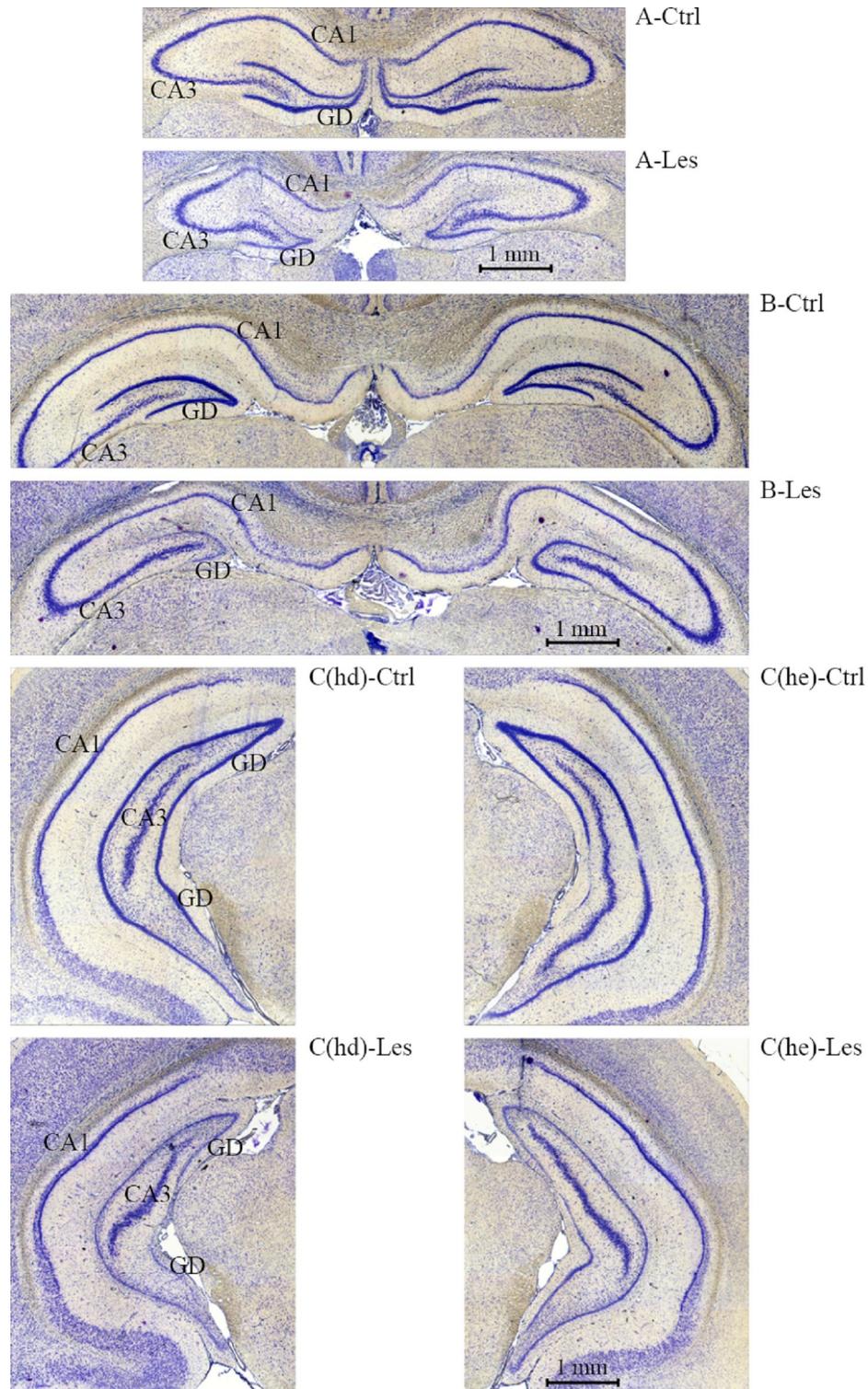


Figura 5. Fotomicrografias de seções coronais do hipocampo coradas com cresil violeta. Ctrl = rato controle-operado; Les = rato lesado; painéis A = seções posteriores ao bregma em aproximadamente 2,52 mm; painéis B = seções posteriores ao bregma em aproximadamente 4,36 mm; painéis C = seções posteriores ao bregma em aproximadamente 6,00 mm; hd = hemisfério direito; he = hemisfério esquerdo. GD = camada granular do giro denteado; CA1 e CA3 = camadas piramidais de CA1 e CA3, respectivamente.

Tabela 3 – Áreas médias (em mm<sup>2</sup>) das camadas piramidais de CA1 e CA3 e da camada granular do giro denteado em três níveis ântero-posteriores do hipocampo

Nível ântero-posterior <sup>+</sup>	CA1			CA3			Giro denteado		
	-2,52	-4,36	-6,00	-2,52	-4,36	-6,00	-2,52	-4,36	-6,00
Ratos controle-operados	0,201± 0,027	0,466± 0,032	0,706± 0,041	0,424± 0,033	0,610± 0,034	0,518± 0,101	0,382± 0,018	0,437± 0,031	1,354± 0,067
Ratos lesados	0,199± 0,023	0,264± 0,073*	0,610± 0,061	0,340± 0,039*	0,508± 0,050*	0,477± 0,068	0,187± 0,050*	0,083± 0,018*	0,504± 0,089*

<sup>+</sup> = em mm, tomando o bregma como referência, segundo Paxinos e Watson (2007); \* = nível de significância  $P < 0,05$  entre ratos controle-operados ( $n=10$ ) e lesados ( $n=9$ ).

### 3.2. Pré-treino de discriminação simples

Três sessões diárias de pré-treino foram suficientes para a instalação da discriminação simples, pois a probabilidade de pressões a qualquer barra aumentou durante as apresentações de T5 ao longo das três sessões de pré-treino (Figura 6) (efeito de sessões:  $F_{2,34}=24,11$ ;  $P < 0,05$ ). A Figura 6 também mostra aquisição menos eficaz dos ratos lesados ( $n=9$ ) em comparação com os controle-operados ( $n=10$ ), pois as porcentagens de respostas durante T5 emitidas por ratos lesados foram significativamente menores ao longo do pré-treino (efeito de grupos:  $F_{1,17}=5,11$ ;  $P < 0,05$ ; efeito de interação:  $F_{2,34}=5,87$ ;  $P < 0,05$ ). A comparação pós *hoc* mostrou que esta diferença entre os desempenhos dos dois grupos foi significativa na 1<sup>a</sup> e na 3<sup>a</sup> sessão, especificamente (teste de Newman-Keuls) (Figura 6).

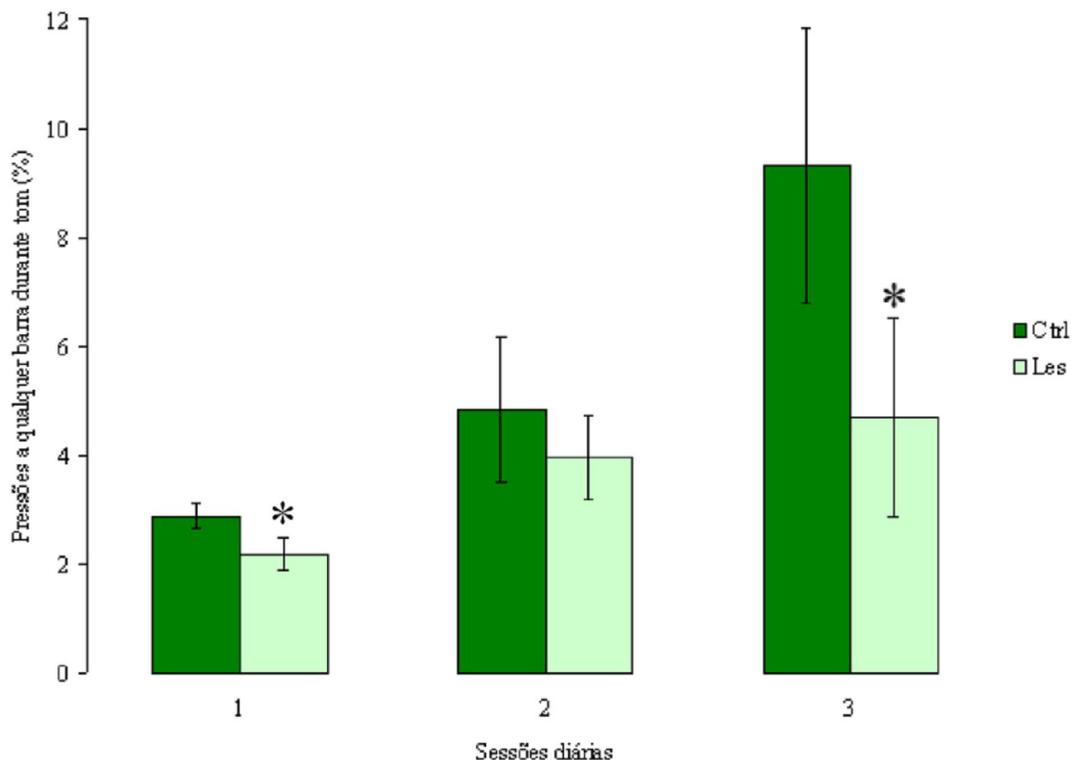


Figura 6. Porcentagem média de pressões a qualquer barra durante o tom puro em relação ao total de respostas em cada sessão diária do pré-treino. Ctrl = ratos controle-operados ( $n=10$ ); Les = ratos lesados ( $n=9$ ); \* = nível de significância  $P<0,05$  entre grupos de ratos; barras = desvio-padrão.

### 3.3. Treino de discriminação condicional

Na primeira sessão de treino, aproximadamente metade dos ratos dos dois grupos apresentou preferência casual pela barra A e a outra metade pela barra B, independentemente das luzes de 4 ou 16 s que precediam o tom. Assim, apesar do uso do método de correção, todos os ratos, com a exceção de somente um controle-operado, se engajaram em um comportamento supersticioso que poderia dificultar a aquisição da discriminação das duas durações de luz. Aliás, com o método de correção, a insistência nas respostas incorretas e a conseqüente seqüência de tentativas sem liberação de água poderia levar à extinção do comportamento de pressão às barras durante os tons. Por isto, decidiu-se alternar sessões diárias de treino com e sem método de correção. Porém,

esta alternância, que durou 12 sessões, também foi ineficaz para a eliminação da preferência supersticiosa por uma barra ou outra. A partir de então, foram realizadas sessões extras de pré-treino em que foram removidas justamente as barras preferidas por cada rato, o que os forçou a pressionar a barra não preferida durante os tons para a obtenção de água. Duas ou três sessões extras de pré-treino, dependendo do rato, foram suficientes para que o treino fosse reiniciado com as duas barras inseridas em cada caixa operante, pois todos os ratos deixaram de preferir uma barra ou outra. Como a probabilidade média de pressões a cada barra se aproximou de 50%, o treino pôde ser continuado. Portanto, a partir de agora, os resultados descreverão o treino somente a partir de seu reinício.

Sem diferenciar as duas barras na análise e desconsiderando-se os estímulos, intervalos vazios e intervalos entre práticas, os ratos lesados ( $n=9$ ) mantiveram-se regularmente mais responsivos do que os ratos controle-operados ( $n=10$ ) em todo o treino (efeito de grupos:  $F_{1,17}=6,29$ ;  $P<0,05$ ), como mostra a Figura 7, em que pode se observar as médias dos totais de respostas ao longo do treino. A significância deste efeito de grupos encontra-se no 1º bloco de cinco sessões diárias e do 7º ao 10º bloco, de acordo com a comparação pós *hoc* (teste de Newman-Keuls) (Figura 7).

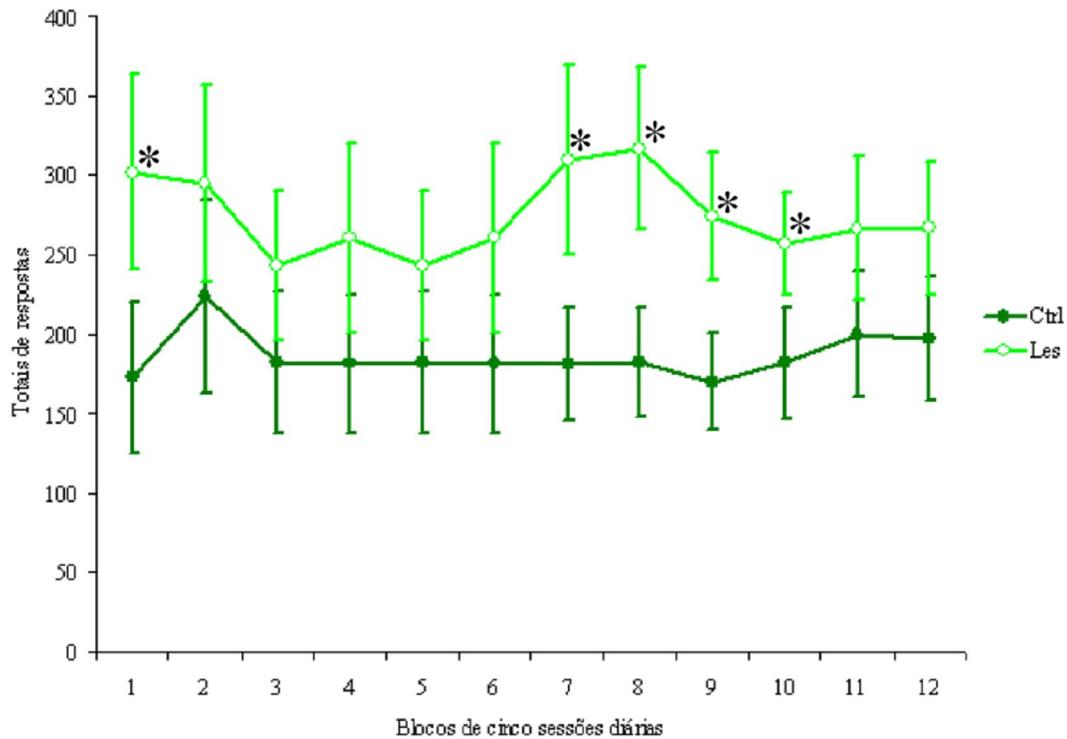


Figura 7. Números totais médios de pressões a qualquer barra em cada bloco de cinco sessões diárias do treino, independentemente dos estímulos, intervalos vazios e intervalos entre práticas. Ctrl = ratos controle-operados ( $n=10$ ); Les = ratos lesados ( $n=9$ ); \* = nível de significância  $P<0,05$  entre grupos de ratos; barras = desvio-padrão.

Ainda sem diferenciar as duas barras na análise, a Figura 8 mostra que nos primeiros quatro blocos de cinco sessões do treino a porcentagem de tons durante os quais foi emitida pressão a qualquer barra manteve-se irregularmente alta, tanto para tons precedidos por luz de qualquer duração, quanto para tons apresentados sozinhos. Isto indica que a contingência estabelecida no pré-treino continuou a influenciar o comportamento dos ratos até o 4º bloco, quando, a partir de então, as curvas correspondentes aos tons pós L passaram a se estabilizar em torno de 95%, enquanto as curvas correspondentes aos tons sozinhos passaram a declinar gradualmente. Um efeito de sessões ( $F_{11,187}=4,93$ ;  $P<0,05$ ) indica que houve aumento gradual e significativo da quantidade de respostas durante tons precedidos por luz de qualquer duração. Não houve efeito de grupos nem de interação quanto às curvas de tons pós L, o que mostra ausência de diferença entre ratos lesados e controle-operados quanto a este parâmetro. A

diminuição do número de respostas durante os tons sozinhos também foi significativa (efeito de sessões:  $F_{11,187}=17,31$ ;  $P<0,05$ ), mas ocorreu de maneiras diferentes entre os dois grupos de ratos. Do 7º até o 10º bloco de cinco sessões, a diminuição da quantidade de respostas durante os tons sozinhos foi significativamente mais acentuada para ratos controle-operados (efeito de grupos:  $F_{1,17}=5,06$ ;  $P<0,05$ ; efeito de interação:  $F_{11,187}=3,40$ ;  $P<0,05$ ). Isto estaria mostrando, possivelmente, uma maior resistência à extinção dos ratos lesados, o que seria coerente com a maior atividade operante do mesmo grupo de ratos, já mostrada na Figura 8. Embora os ratos lesados tenham respondido mais do que os controle-operados durante os tons sozinhos do 7º ao 10º bloco, todos os ratos, ao longo do treino, responderam gradualmente menos durante tons sozinhos do que durante tons precedidos por luz de qualquer duração, o que indica aquisição da discriminação condicional positiva. A comparação pós *hoc* confirmou que as curvas referentes aos tons sozinhos dos dois grupos de ratos começaram a declinar em relação às curvas referentes aos tons pós L a partir do 5º bloco de cinco sessões diárias (teste de Newman-Keuls) (Figura 8). Além disto, a mesma comparação pós *hoc* também confirmou que os ratos lesados responderam significativamente mais do que os controle-operados durante tons sozinhos do 7º ao 10º bloco (teste de Newman-Keuls) (Figura 8). Nos últimos dois blocos, as curvas dos dois grupos de ratos quanto aos tons sozinhos se igualaram estatisticamente (Figura 8).

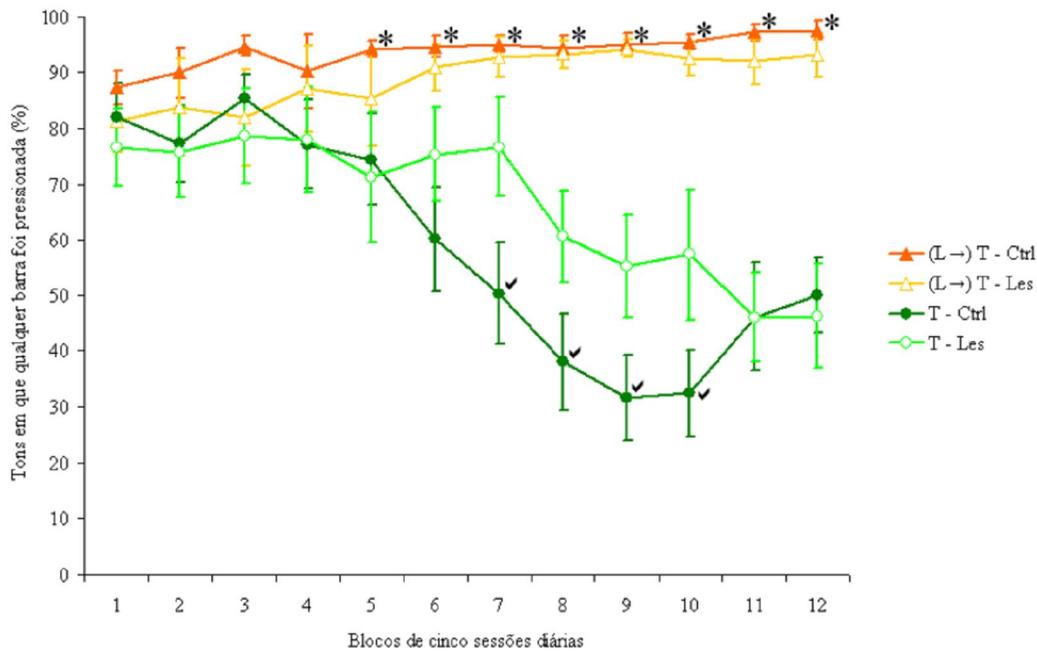


Figura 8. Porcentagem média de tons puros durante os quais qualquer barra foi pressionada em cada bloco de cinco sessões do treino, comparando-se tons precedidos por luz de qualquer duração com tons apresentados sozinhos. (L→) T = tons precedidos por luz de qualquer duração; T = tons sozinhos; Ctrl = ratos controle-operados ( $n=10$ ); Les = ratos lesados ( $n=9$ ); \* = nível de significância  $P<0,05$  entre as duas curvas de tons precedidos por luz de qualquer duração e as duas curvas de tons sozinhos; ✓ = nível de significância  $P<0,05$  entre ratos controle-operados e lesados somente para curvas de tons sozinhos; barras = desvio-padrão.

Mantendo-se a indiferença quanto às duas barras na análise, a Figura 9A mostra que não houve diferença entre ratos controle-operados e lesados quanto ao número de respostas durante L4, nem na primeira nem na última sessão. Ainda em relação a L4, se comparados os desempenhos dos dois grupos de ratos entre a primeira e a última sessão, também não é encontrada diferença significativa. Quanto ao número de respostas durante os últimos quatro segundos de L16 (Figura 9B), também não há diferenças entre os desempenhos de ratos controle-operados e lesados na primeira e na última sessão de treino. Porém, os ratos dos dois grupos responderam significativamente mais na última sessão do que na primeira ( $t=-8,69$ ;  $P<0,05$ ). Em relação ao intervalo vazio posterior a L4 (Figura 9C), não há diferenças entre os desempenhos de ratos controle-operados e lesados na primeira e na última sessão de treino. No entanto, os ratos dos dois grupos

responderam significativamente mais na última sessão do que na primeira ( $t=-4,66$ ;  $P<0,05$ ). No gráfico correspondente ao intervalo vazio posterior a L16 (Figura 9D) é encontrada a única diferença entre ratos controle-operados e lesados desta análise, dentro da 1ª sessão ( $t=2,33$ ;  $P<0,05$ ). Apesar disto, a Figura 9D transmite uma informação semelhante à Figura 9C, pois os dois grupos de ratos também emitiram significativamente mais respostas na última sessão do que na primeira (controle-operados:  $t=-3,47$ ;  $P<0,05$ ; lesados:  $t=-5,33$ ;  $P<0,05$ ). Na última sessão, os números de respostas durante o intervalo vazio posterior a L16 não diferiu significativamente entre ratos controle-operados e lesados (Figura 9D). A comparação entre os gráficos A e C da Figura 9 evidencia o aumento do número de respostas durante o intervalo vazio posterior a L4 em função do treino, indicando que o desligamento da luz com o término de L4 modulava o comportamento dos ratos. Por outro lado, este contraste não é tão claro quando a comparação é feita entre os gráficos B e D da mesma figura, pois houve aumento do número de respostas ao longo do treino tanto nos últimos 4 s de L16 quanto no intervalo vazio após L16. Mesmo assim, os resultados mostram que o desligamento da luz com o término de L16 também modulava o comportamento dos ratos. Afinal, para ratos controle-operados, o aumento do número médio de respostas da 1ª para a 60ª sessão mostrado na Figura 9B foi de  $66,67\pm 5,82\%$  e o da Figura 9D foi de  $135,68\pm 12,32\%$ , uma diferença significativa ( $t=-3,92$ ;  $P<0,05$ ); e para ratos lesados, o aumento do número médio de respostas da 1ª para a 60ª sessão mostrado na Figura 9B foi de  $164,47\pm 7,34\%$  e o da Figura 9D foi de  $270,00\pm 9,29\%$ , uma diferença também significativa ( $t=-6,73$ ;  $P<0,05$ ). De modo geral, os dados mostrados na Figura 9 confirmam a aquisição da discriminação condicional positiva pelos ratos dos dois grupos, já que o aumento da atividade operante em função do término dos estímulos

condicionais L4 e L16 constitui indício adicional de que o treino conferiu, às luzes de 4 e 16 s, a propriedade de *occasion setters* em relação ao estímulo condicionado T5.

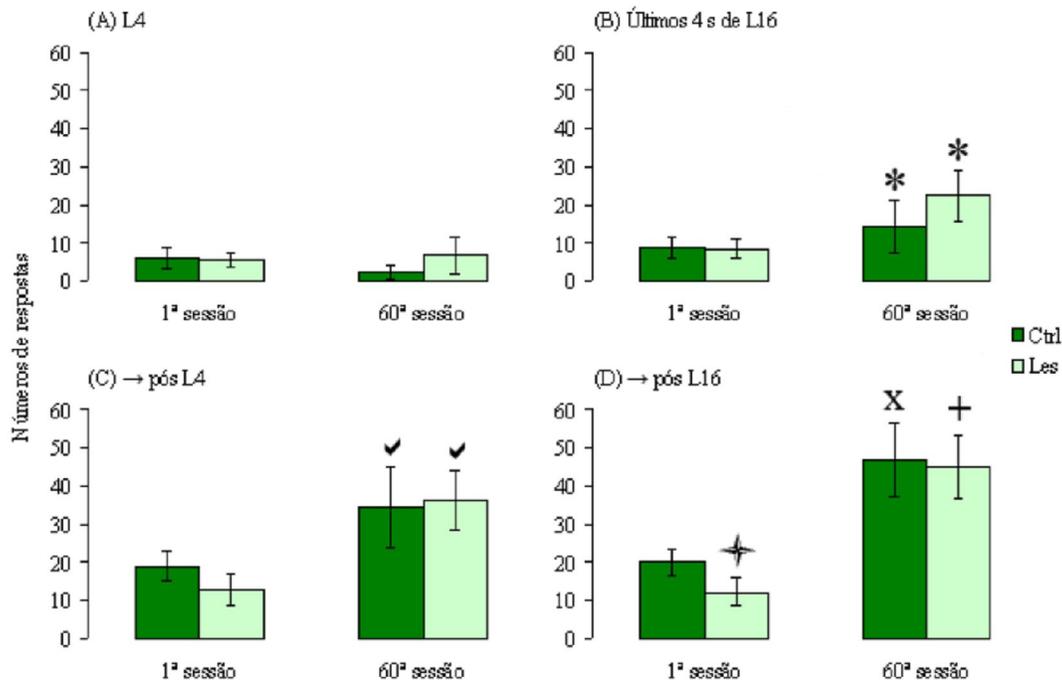


Figura 9. Números médios de respostas durante luz de 4 s (gráfico A), últimos 4 s da luz de 16 s (gráfico B), intervalo vazio de 5 s após luz de 4 s (gráfico C) e intervalo vazio de 5 s após luz de 16 s (gráfico D), comparando-se a 1ª sessão diária do treino com a 60ª em cada gráfico. Ctrl = ratos controle-operados ( $n=10$ ); Les = ratos lesados ( $n=9$ ); → = intervalo vazio de 5 s; \* = nível de significância  $P<0,05$  entre a 60ª e a 1ª sessão para ambos os grupos de ratos quanto aos últimos 4 s de L16; ✓ = nível de significância  $P<0,05$  entre a 60ª e a 1ª sessão para ambos os grupos de ratos quanto ao intervalo vazio pós L4; ✦ = nível de significância  $P<0,05$  entre ratos lesados e controle-operados somente na 1ª sessão quanto ao intervalo vazio pós L16; X = nível de significância  $P<0,05$  entre a 60ª e a 1ª sessão somente para ratos controle-operados quanto ao intervalo vazio pós L16; + = nível de significância  $P<0,05$  entre a 60ª e a 1ª sessão somente para ratos lesados quanto ao intervalo vazio pós L16; barras = desvio-padrão.

Considerando-se o comportamento de escolha à barra A ou à barra B dependendo de L4 ou L16, a Figura 10 mostra que até o 3º bloco de cinco sessões do treino não houve tendência clara de aumento da porcentagem de pressões à barra B durante tons pós L16 junto à concomitante diminuição de pressões à mesma barra durante tons pós L4. Assim, independentemente da duração da luz precedente, a porcentagem de pressões à barra B durante todos os tons manteve-se próxima a 50% até

o 3º bloco, quando, a partir de então, as curvas de tons pós L4 e tons pós L16 começaram a seguir tendências opostas. A significância do aumento da porcentagem de pressões à barra B durante tons pós L16 foi confirmada pelo efeito de sessões ( $F_{11,187}=12,31$ ;  $P<0,05$ ) e não houve diferença significativa entre as curvas de tons pós L16 de ratos controle-operados e lesados. A diminuição da porcentagem de pressões à barra B durante tons pós L4 também foi significativa (efeito de sessões:  $F_{11,187}=21,70$ ;  $P<0,05$ ) e também não houve diferença significativa entre as curvas de tons pós L4 dos dois grupos de ratos. A comparação pós *hoc* indicou que, de fato, a oposição de tendências entre as curvas referentes aos tons pós L16 e L4 se iniciou no 4º bloco de cinco sessões diárias (teste de Newman-Keuls) (Figura 10). Portanto, os ratos dos dois grupos adquiriram a discriminação entre as durações de 4 e 16 s. Como mostra a Figura 10, a retirada do método de correção nos últimos dois blocos de cinco sessões não afetou os dados, o que constitui garantia adicional de que o comportamento de escolha dos ratos estava realmente sendo modulado pela duração da luz.

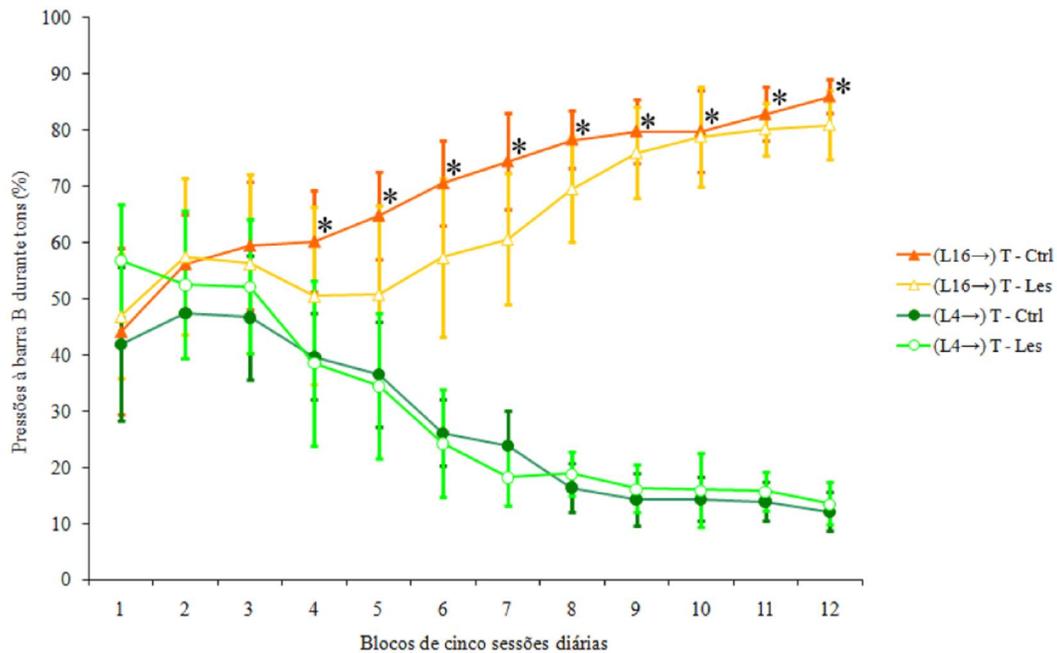


Figura 10. Porcentagem média de pressões à barra B durante tons em relação ao total de respostas emitidas somente durante tons precedidos por luz de 4 s ou luz de 16 s em cada bloco de cinco sessões do treino. (L16→) T = tons precedidos por luz de 16 s; (L4→) T = tons precedidos por luz de 4 s; Ctrl = ratos controle-operados ( $n=10$ ); Les = ratos lesados ( $n=9$ ); \* = nível de significância  $P<0,05$  entre as duas curvas de tons precedidos por luz de 16 s e as duas curvas de tons precedidos por luz de 4 s; barras = desvio-padrão.

### 3.4. Teste de bi-seção temporal

A Figura 11 mostra a porcentagem de pressões à barra B durante tons em função das sete durações da luz precedente. As curvas psicométricas dos dois grupos de ratos mostram aumento significativo da porcentagem de pressões à barra B conforme a escala de durações de 4 até 16 s (efeito de durações de L:  $F_{6,102}=88,98$ ;  $P<0,05$ ). O desempenho dos ratos lesados ( $n=9$ ) não diferiu do desempenho dos controle-operados ( $n=10$ ), já que não houve efeito de grupos nem de interação. Este resultado indica que a precisão da estimação temporal foi estatisticamente igual entre os ratos controle-operados e lesados. O ponto de bi-seção temporal, ou ponto de igualdade subjetiva, dos

dois grupos de ratos corresponde à duração de 10 s da luz precedente, que é a média aritmética entre as duas durações extremas: 4 e 16 s (Figura 11).

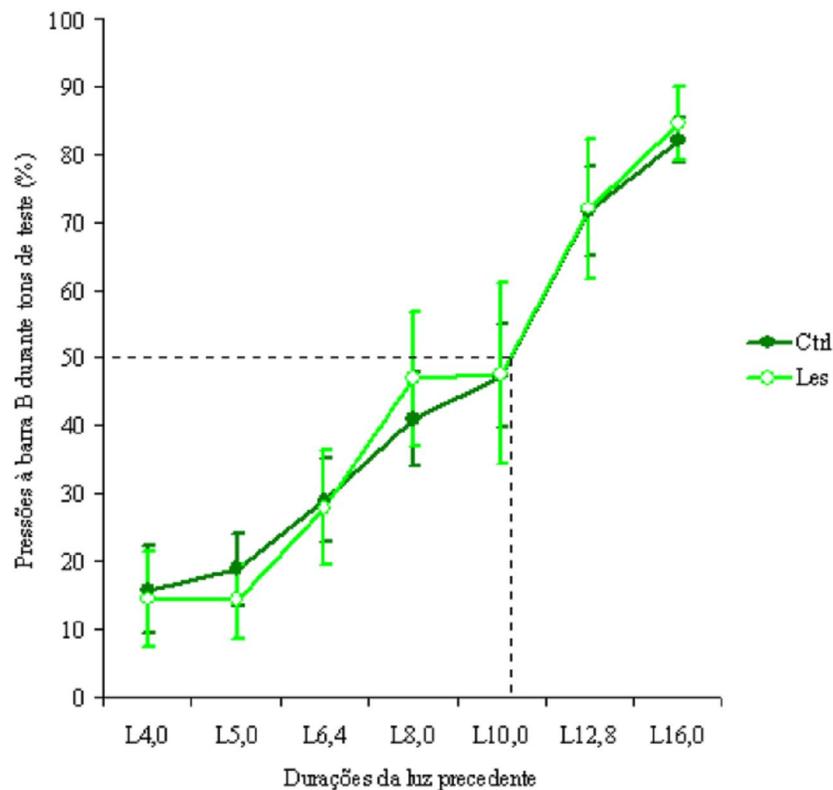


Figura 11. Porcentagem média de pressões à barra B durante tons em relação ao total de respostas emitidas somente durante tons pertencentes a práticas de teste em função das sete durações da luz precedente. Ctrl = ratos controle-operados ( $n=10$ ); Les = ratos lesados ( $n=9$ ); linha tracejada = correspondência entre 50% de pressões à barra B e as curvas psicométricas, apontando a duração de 10 s de luz como ponto de bi-seção temporal; barras = desvio-padrão.



## **4. DISCUSSÃO**

### **4.1. Desempenho em discriminação condicional e bi-seção temporal**

No início do treino, foi alta a probabilidade de os ratos dos dois grupos pressionarem qualquer barra durante todas as apresentações do tom puro, precedidas por luz ou não. Isto se explica pela aquisição da discriminação simples, no pré-treino, de responder durante os tons. Contudo, enquanto a probabilidade de responder durante tons precedidos por luz de qualquer duração manteve-se alta até o fim do treino, a de responder durante tons apresentados sozinhos diminuiu gradualmente para os dois grupos de ratos. Isto indica que a luz, qualquer que fosse sua duração, adquiriu a função de *occasion setter* em relação à oportunidade de reforço sinalizada pelo tom puro, cuja propriedade excitatória estabelecida previamente pelo pré-treino de discriminação simples passou a ser modulada em função da luz precedente. Assim, a presença ou ausência da luz precedente passou a ser a condição para, respectivamente, responder ou não durante o tom, o que caracteriza a aquisição da discriminação condicional (ROSS; HOLLAND, 1981). A discriminação condicional treinada neste experimento foi do tipo positiva, pois a presença da luz definia a ocasião para que a resposta fosse reforçada durante o estímulo sonoro subsequente, ao contrário da discriminação condicional negativa, em que a ausência do estímulo condicional é que definiria a ocasião para o reforço (HOLLAND; LAMARRE, 1984).

Os trabalhos de Ross e Holland (1981) e Holland e Lamarre (1984) mostraram que a relação de *occasion setting* só é estabelecida em treino de discriminação condicional quando um intervalo vazio é interposto entre o estímulo condicional e o estímulo condicionado, constituindo-se uma discriminação condicional seriada. No presente trabalho, foi utilizado um treino de discriminação condicional seriada, já que

um intervalo vazio de 5 s era apresentado após o desligamento do estímulo condicional luminoso. A comparação entre as quantidades de pressões a qualquer barra durante a luz de 4 s, durante os últimos 4 s da luz de 16 s e durante os intervalos vazios posteriores às duas durações de luz mostrou que, após a estabilização da aquisição no fim do treino, a evolução do número de respostas ao longo das práticas não era indiferente ao desligamento da luz e início do intervalo vazio. Ao invés disto, apesar de algumas respostas serem emitidas durante as luzes de 4 e 16 s, os ratos dos dois grupos passavam a emitir maior número de respostas em função do desligamento da luz. Isto mostra que, durante o intervalo vazio, o comportamento operante dos ratos foi modulado por uma associação entre a representação de um estímulo condicional não mais presente com a expectativa de um estímulo condicionado vindouro. Este resultado constitui mais um indício de que o procedimento do presente trabalho estabeleceu a aquisição de uma discriminação condicional e que o intervalo vazio não foi neutro na modulação do comportamento operante.

Diferenciando-se as respostas à barra A e à barra B durante tons e desconsiderando-se as respostas durante tons apresentados sozinhos, os ratos dos dois grupos adquiriram a discriminação entre a duração curta e a duração longa de luz. Ao longo do treino, a probabilidade de pressionar a barra B durante tons precedidos por luz de 16 s aumentou gradualmente e o inverso ocorreu com a probabilidade de pressionar a barra B durante tons precedidos por luz de 4 s. A partir do último terço do treino, aproximadamente, a precisão da discriminação de durações se estabilizou em torno de 85% de acertos, desconsiderando-se as respostas emitidas fora dos tons precedidos por luz. A aquisição da discriminação entre durações de uma mesma modalidade sensorial baseada na escolha entre duas respostas operantes, aliada à constatação de que os ratos adquiriram a discriminação condicional positiva, favorece a hipótese de que é

improvável que o comportamento de escolha dos ratos tenha sido influenciado apenas por mero controle temporal, independentemente do tom e do intervalo vazio entre luz e tom. Ou seja, ao invés de obedecer a um controle temporal simplesmente desencadeado pelo acionamento da luz, o comportamento operante dos ratos foi modulado por uma relação de *occasion setting* entre duas durações de mesma modalidade e um estímulo condicionado de modalidade diferente. Tradicionalmente, os estudos em que se treinam ratos a discriminarem entre duas durações, escolhendo entre duas respostas operantes, utilizam barras retráteis, que são inseridas nas caixas operantes somente após o término do sinal temporal curto ou longo, sendo novamente retraídas imediatamente após a resposta, correta ou não (por exemplo, MECK; CHURCH; OLTON, 1984; SIEGEL, 1986; MORRISSEY et al., 1993; HO et al., 1995, 1996; AL-ZAHRANI et al., 1997). Em contraste, no presente trabalho as duas barras mantiveram-se permanentemente disponíveis dentro das caixas operantes, o que permitiu a avaliação de como evolui o comportamento operante desde o início do estímulo condicional até o estímulo condicionado, passando pelo intervalo vazio. Raslear (1983, 1985) também fez testes de bi-seção temporal utilizando barras fixas. Contudo, nestes trabalhos, as pressões às barras fixas eram efetivas durante um período de 10 s iniciado com o término do sinal temporal; assim, não houve relação condicional entre estímulos. Além disto, Raslear (1983, 1985) não estudou o decurso do comportamento operante durante os sinais temporais, quando as respostas não podiam ser reforçadas. No presente trabalho, a análise desta evolução do comportamento operante ao longo das práticas iniciadas com luz mostrou que ratos são capazes de adquirir a discriminação entre duas durações, pressionando uma barra ou outra, mesmo quando submetidos a um procedimento de aprendizagem complexa, como o de discriminação condicional. Desta forma, os ratos mostraram-se capazes de, durante o intervalo vazio de 5 s, reter a informação acerca da

duração recém apresentada a fim de escolher a barra correta durante o estímulo sonoro esperado. Estes resultados são semelhantes aos apresentados por Bueno e Bueno Júnior (2007).

Bueno e Bueno Júnior (2007) treinaram ratos a não responderem durante o estímulo condicionado precedido por luz de 5 s e a responderem durante o estímulo condicionado precedido por luz de 15 s. Os autores também interpuseram um intervalo vazio de 5 s entre os estímulos condicionais e os condicionados. Utilizando um teste parecido com o do presente trabalho, apresentaram luz com as durações 5 s, 7 s, 9 s, 11 s, 13 s e 15 s e mediram somente o número de respostas durante o estímulo condicionado em função da duração da luz precedente, já que treinaram os ratos a pressionarem uma barra única. Ao invés de encontrarem um gradiente na relação entre o número de respostas e a duração intermediária de luz, observaram que os ratos categorizaram metade das durações intermediárias como curtas e a outra metade como longas. Assim, ao invés de resultar em um gradiente linear, o teste de Bueno e Bueno Júnior (2007) resultou em dois patamares distintos: o de baixo número de respostas após luz de 5 s, 7 s e 9 s e o de alto número de respostas após luz de 11 s, 13 s e 15 s. Este resultado sugere um ponto de bi-seção localizado sobre a média aritmética entre 15 s e 5 s, que é 10 s.

No presente estudo, as durações de teste (4,0 s, 5,0 s, 6,4 s, 8,0 s, 10,0 s, 12,8 s e 16,0 s) foram diferenciadas como unidades de uma progressão geométrica à semelhança de Church e Deluty (1977), que, assumindo que a representação interna de tempo aumenta como função logarítmica em relação ao tempo físico, utilizaram este tipo de espaçamento entre as durações intermediárias a fim de igualá-las subjetivamente, tornando comparáveis as respostas emitidas após cada duração de teste. A utilização deste método pelos autores permitiu que, em meio às durações intermediárias, houvesse

uma duração correspondente à média geométrica entre as durações extremas apresentadas no treino e outra duração correspondente à média aritmética (no caso do presente trabalho, a média geométrica é 8,0 e a aritmética, 10,0). Os resultados de Church e Deluty (1977) mostraram que o ponto de bi-seção temporal de ratos treinados a escolher uma barra retrátil ou outra se localizou sobre a duração correspondente à média geométrica. Subseqüentemente, este resultado foi replicado em estudos com procedimentos semelhantes (MECK; CHURCH; OLTON, 1984; MORRISSEY et al., 1993; HO et al., 1995, 1996; AL-ZAHRANI et al., 1997). Porém, tanto os resultados de Bueno e Bueno Júnior (2007) quanto os resultados do presente trabalho indicam um ponto de bi-seção temporal localizado sobre a média aritmética entre as durações extremas apresentadas nos respectivos treinos.

Tal deslocamento à direita do ponto de bi-seção temporal pode ser comparado com as observações de Meck, Church e Olton (1984), em cujo primeiro experimento, ratos foram treinados e testados sob um procedimento tradicional de bi-seção temporal: com duas barras retráteis e dois sinais temporais, 2 e 8 s, sem relações condicionais com outros estímulos. Em um experimento posterior do mesmo estudo com os mesmos sujeitos, o teste incluiu intervalos de retenção de 5 s entre o sinal temporal e a inserção das barras dentro da caixa operante. No teste, os ratos tenderam a classificar todas as durações intermediárias como longas, pressionando, na maioria das oportunidades, a barra correspondente ao sinal de 8 s, independentemente da duração apresentada previamente. Isto foi interpretado pelos autores como indício de que, ao invés de utilizarem o intervalo de 5 s para reter a informação acerca da duração recém terminada, os ratos teriam se comportado de acordo com o tempo corrido desde o início do sinal temporal, somando os 5 s do intervalo de retenção à duração do sinal temporal. Ou seja, 2 s teriam passado a ser interpretados como 7 s, 4 s como 9 s, etc. O fato de a duração

mais curta ter sido interpretada como de 7 s, muito próxima da duração longa de 8 s, explicaria a tendência de os ratos pressionarem somente a barra correspondente aos 8 s após todas as durações intermediárias. Assim, neste resultado de Meck, Church e Olton (1984) não é possível, sequer, definir um ponto de bi-seção temporal, pois as probabilidades de pressionar a barra da duração longa foram maiores do que 50% para todas as durações intermediárias de teste. No caso do presente trabalho, em que também foi usado um intervalo de 5 s após o sinal temporal, isto não chegou a ocorrer, pois a diferença da curva de bi-seção temporal em relação às comumente encontradas na literatura é pequena. Além disto, o deslocamento foi oposto ao encontrado por Meck, Church e Olton (1984), pois um maior número de durações intermediárias (4,0 s, 5,0 s, 6,4 s e 8,0 s) ficou abaixo do limiar de bi-seção temporal. Este resultado mostra que a tendência de os ratos classificarem as durações intermediárias como curtas, escolhendo a barra A, foi maior. Isto não ocorreu nos trabalhos que encontraram ponto de bi-seção temporal sobre a média geométrica (MECK; CHURCH; OLTON, 1984; MORRISSEY et al., 1993; HO et al., 1995, 1996; AL-ZAHRANI et al., 1997), já que, dentre as sete unidades logarítmicas, a média geométrica ocupa posição central, entre três unidades abaixo do ponto de bi-seção temporal e três acima.

Diferentemente de Meck, Church e Olton (1984), os intervalos de 5 s após os sinais temporais não foram introduzidos somente no teste, pois eles também foram apresentados em todo o treino. Assim, poderia se argumentar sobre a possibilidade de os sujeitos do presente trabalho terem aprendido a somar os 5 s de intervalo vazio aos 4 e 16 s das luzes do treino e que essa mesma soma teria sido feita para cada duração intermediária de teste. Deste modo, o intervalo vazio teria sido inútil em servir como intervalo de retenção de informação temporal. No entanto, isto é improvável, pois a análise da evolução do comportamento operante em função da luz, intervalo vazio e tom

puro mostrou que o início do intervalo vazio desencadeava aumento do número de respostas, o que indica que, no presente experimento, o intervalo vazio funcionou, de fato, como intervalo de retenção de informação temporal. Sendo assim, o deslocamento do ponto de bi-seção temporal para a média aritmética, já reportado anteriormente por Bueno e Bueno Júnior (2007), parece ser característico do processo de bi-seção temporal em que o sinal temporal mantém relação condicional com um estímulo condicionado de outra modalidade sensorial.

#### **4.2. Efeitos da lesão seletiva do giro denteado**

A lesão citotóxica seletiva do giro denteado hipocampal foi capaz de produzir três resultados positivos. Um deles, no pré-treino de discriminação simples, mostrou que embora a porcentagem de respostas durante os tons puros tenha aumentado ao longo de três sessões para os dois grupos de ratos, os lesados apresentaram aquisição mais lenta por terem mantido porcentagens mais altas de respostas durante os intervalos entre tons. Isto pode ser explicado pelo fato de os ratos lesados terem emitido, regularmente, maior número de respostas do que os controle-operados durante todo o experimento, independentemente das barras A ou B e independentemente dos estímulos apresentados. A noção de que os ratos lesados tenderam a responder mais vezes é sustentada por outro resultado positivo produzido pela lesão: o maior número de respostas dos ratos lesados ao longo de todo o treino. Ainda no treino, foi encontrado mais um resultado positivo gerado pela lesão no giro denteado: apesar de a tendência de extinguir a pressão a qualquer barra durante tons sozinhos ter ocorrido nos dois grupos de ratos, nos ratos lesados esta tendência foi menos acentuada. Esta maior resistência à extinção por parte dos ratos lesados não chegou a impedir que eles adquirissem a discriminação

condicional, pois, no fim do treino, seu desempenho se igualou ao dos ratos controle-operados. De qualquer forma, trata-se de um resultado que também é coerente com a noção de maior atividade operante dos ratos lesados. Esta indução de hiperatividade por lesões hipocampais é amplamente conhecida (por exemplo, GRAY; McNAUGHTON, 1983; SHULL; HOLLOWAY, 1985; EMERICH; WALSH, 1990; BARONE et al., 1992; BRATT et al., 1995; HOFFERER et al., 1996; BANNERMAN et al., 1999, 2001; COUTUREAU et al., 2000; AL-AMIN; WEINBERGER; LIPSKA, 2000; AL-AMIN et al., 2001; SWERDLOW et al., 2001; DUCONSEILLE et al., 2001; MOREIRA; BUENO, 2003; FLORES et al., 2005; GODSIL; STEFANACCI; FANSELOW, 2005). Como os ratos lesados mantiveram-se regularmente mais responsivos até o final do treino, conclui-se que o efeito da lesão seletiva citotóxica foi permanente. Portanto, é improvável que os resultados negativos quanto à participação do hipocampo na aquisição da discriminação de durações e no teste de bi-seção temporal tenham sido devidos a um efeito apenas provisório da lesão. Esta constatação favorece o argumento de que as células granulares do giro denteado não são, de fato, importantes para a aquisição da discriminação de durações e para o teste de bi-seção temporal em procedimentos que envolvem relações condicionais entre estímulos. Resultados semelhantes já haviam sido encontrados por Bueno e Bueno Júnior (2007), que empregaram o mesmo procedimento de lesão hipocampal.

O primeiro experimento de Meck, Church e Olton (1984), que testou a bi-seção temporal entre as durações extremas de 2 e 8 s sem a utilização do intervalo de 5 s, mostrou que ratos lesados na fímbria, importante via de comunicação hipocampal com o septo (HARRY; D'HELLEN COURT, 2003), deslocam ligeiramente a função psicofísica de bi-seção para a esquerda. Dessa forma, os ratos lesados na fímbria possuem tendência um pouco maior de classificar as durações intermediárias como

longas. Este resultado foi interpretado pelos autores como indicativo de que uma lesão que interfere no fluxo de informações eferentes e aferentes do hipocampo não é capaz de destruir a discriminação de durações, mas de diminuir as durações lembradas. A hipótese dos autores foi a de que a diminuição das durações lembradas foi devida a um prejuízo da recuperação, por parte da memória de trabalho, de durações armazenadas na memória de referência, e não a um prejuízo no modelo SET (*scalar expectancy time*), o sistema de marcapasso-acumulador proposto inicialmente por Gibbon (1977) e expandido por Gibbon e Church (1984) e Gibbon, Church e Meck (1984). Afinal, o mecanismo temporal interno, ainda que deslocado em relação ao tempo ambiental, não chegou a ser destruído.

Meck, Church e Olton (1984) ainda compararam seus resultados de bi-seção temporal com trabalhos anteriores mostrando que o desempenho em DRL é prejudicado por lesões hipocampais de vários tipos (por exemplo, ELLEN; AITKEN, 1970; HADDAD; RABE, 1967; JOHNSON et al., 1977). Em DRL não há apresentação de sinais exteroceptivos, e uma resposta só é reforçada se separada da resposta anterior por, no mínimo, uma duração definida pelo experimentador. O fato de, em DRL, ser necessário estimar uma duração presente, adicionaria à tarefa a participação da memória de trabalho, o que explicaria os prejuízos mais evidentes no controle temporal provocados por lesões hipocampais. Após Meck, Church e Olton (1984) terem levantado esta questão, muitos outros trabalhos envolvendo DRL e hipocampo tornaram ainda mais consistente a noção de que o hipocampo é, realmente, necessário para o desempenho deste tipo de tarefa operante (por exemplo, ACSÁDI et al., 1986; SINDEN et al., 1986; WOODRUFF et al., 1987; JALDOW; OAKLEY, 1990; YOUNG; McNAUGHTON, 2000; ZHANG et al., 2001; COSTA; BUENO; XAVIER, 2005). O envolvimento do hipocampo no controle temporal também foi sugerido por trabalhos

que utilizaram o procedimento de pico, outro procedimento temporal que requer a estimação de uma duração presente (MECK; CHURCH; OLTON, 1984; OLTON; MECK; CHURCH, 1987; MECK, 1988).

Lesar seletivamente o giro denteado, ao invés da fímbria, é outra maneira de interferir na entrada de informações ao hipocampo; porém, afetando o fluxo de informações da via perfurante, que conecta o córtex entorrinal ao giro denteado (HARRY; D'HELLEN COURT, 2003). Estudando ratos, Costa, Bueno e Xavier (2005), mostraram que a lesão seletiva do giro denteado após treino em DRL faz com que os ratos lesados, previamente treinados a responderem de 20 em 20 s, aproximadamente, passem a responder de 16 em 16 s, aproximadamente. Por indicarem participação do giro denteado no controle temporal sobre o comportamento, estes dados são coerentes com os modelos de simulação computacional apresentados por Grossberg e Schmajuk (1989), Grossberg e Merrill (1992, 1996) e Gorchetchnikov e Grossberg (2007). No modelo do tempo espectral (GROSSBERG; MERRILL, 1992), as curvas de respostas em função do tempo, tipicamente obtidas em trabalhos com procedimento de pico, condicionamento clássico e DRL, foram reproduzidas por simulações computacionais compostas por uma série de equações. E estas curvas de respostas simuladas reproduzem a propriedade escalar Weberiana: quanto maior a duração treinada, maior a variação da curva de respostas em torno do pico de respostas. Assim, os autores destas simulações apresentaram uma explicação para a propriedade escalar que é diferente da explicação de Gibbon (1977), baseada no modelo do marcapasso-acumulador. Além disto, os diferentes modelos propõem diferentes sistemas neurobiológicos. Grossberg e Schmajuk (1989), Grossberg e Merrill (1992, 1996) e Gorchetchnikov e Grossberg (2007) defendem que existe uma participação central da comunicação entre o córtex entorrinal e a camada granular do giro denteado (através da via perfurante) e entre a

camada granular do giro denteado e as células piramidais do CA3 hipocampal (através das fibras musgosas). Por outro lado, o modelo psicológico de Gibbon (1977) forneceu as bases para outros trabalhos (por exemplo, MECK, 1996; MATELL; MECK, 2000; MATELL; MECK, 2004; BUHUSI; MECK, 2005; MECK, 2006) proporem um sistema neurobiológico que não passa pelo hipocampo, por ser baseado nas alças de retroalimentação dos núcleos da base, que incluem núcleos do tálamo, neurônios piramidais corticais e neurônios espinhosos médios do corpo estriado, que recebem modulação dopaminérgica pela *substantia nigra pars compacta*.

A neurobiologia baseada no hipocampo proposta por Grossberg e Merrill (1992) só é capaz de explicar dados obtidos em procedimento de pico, condicionamento clássico e DRL. Afinal, o presente trabalho, que investigou bi-seção temporal empregando o método de lesão outrora utilizado por Costa, Bueno e Xavier (2005), encontrou resultados negativos quanto à participação do giro denteado no controle temporal. Assim, diante da possibilidade destas duas tarefas temporais recrutarem processos neurobiológicos diferentes quanto à participação hipocampal, podem se levantar as seguintes hipóteses. (1) Como argumentado por Meck, Church e Olton (1984), tarefas como a bi-seção temporal, que apresentam sinais temporais exteroceptivos a serem discriminados, dispensam o uso de uma memória de trabalho hipocampal. Assim, a discriminação de durações seria baseada em um sistema que não inclui o hipocampo. Este raciocínio favoreceria os modelos neurobiológicos centralizados nos núcleos da base (revisões: MATELL; MECK, 2004; BUHUSI; MECK, 2005). (2) Se por um lado Grossberg e Schmajuk (1989), Grossberg e Merrill (1992, 1996) e Gorchetchnikov e Grossberg (2007) afirmam que o giro denteado é, de fato, parte integrante de um sistema que controla o comportamento em função do tempo, e por outro lado os dados do presente trabalho contrariam esta idéia, pode-se

afirmar que não existe um sistema único de controle temporal. Na realidade, existiria, pelo menos, um sistema neurobiológico envolvido em tarefas prospectivas, tanto sinalizadas exteroceptivamente (como procedimento de pico) quanto sem sinais exteroceptivos (como DRL), e outro sistema envolvido em tarefas retrospectivas sinalizadas exteroceptivamente (como bi-seção temporal). (3) O prejuízo de desempenho em DRL provocado por lesão hipocampal poderia, simplesmente, ser explicado pelo aumento da atividade operante nos sujeitos lesados, que é concorrente com a necessidade de inibir a resposta por determinado período para a obtenção do reforçador. Trata-se de uma idéia coerente com os dados de Zhang et al. (2001), que, sem o objetivo de investigar controle temporal, administraram isoproterenol (um agonista beta adrenérgico não seletivo) bilateralmente no hipocampo de ratos, o que produziu redução da taxa de respostas e, conseqüentemente, aumento da taxa de reforços. Desta forma, poderia se afirmar que, em DRL, a mediação do controle temporal por seqüências estereotipadas de comportamentos colaterais (RICHELLE; LEJEUNE, 1980; KILLEEN; FETTERMAN, 1988) é prejudicada pela lesão hipocampal, que induz hiperatividade (O'KEEFE; NADEL, 1978). No entanto, já que no presente experimento os ratos não eram punidos por responderem a taxas mais altas, um eventual prejuízo em um controle temporal que toma comportamentos colaterais como referências não teria sido capaz de impedir a aquisição e o desempenho normal no teste.

De qualquer forma, a possibilidade de procedimentos tradicionalmente categorizados como temporais serem processados de diferentes maneiras sugere que comparações mais minuciosas entre estes diferentes processos comportamentais poderá se tornar uma importante ferramenta na busca pela compreensão dos sistemas neurobiológicos subjacentes ao controle temporal do comportamento.





---

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

ACSÁDI, G; BUZSÁKI, G; KESZTHELYI, T; KIRÁLYFALVI, L; GAGE, F. H. Effects of confinement, previous experience and hippocampal damage on the DRL schedule. **Behavioral Brain Research**, v. 20, n. 2, p. 241-248, 1986.

AL-AMIN, H. A; SHANNON WEICKERT, C; WEINBERGER, D. R; LIPSKA, B. K. Delayed onset of enhanced MK-801-induced motor hyperactivity after neonatal lesions of the rat ventral hippocampus. **Biological Psychiatry**, v. 49, n. 6, p. 528-539, 2001.

AL-AMIN, H. A; WEINBERGER, D. R; LIPSKA, B. K. Exaggerated MK-801-induced motor hyperactivity in rats with the neonatal lesion of the ventral hippocampus. **Behavioural Pharmacology**, v. 11, n. 3-4, p. 269-278, 2000.

AL-ZAHRANI, S. S. A; HO, M. Y; AL-RUWAITEA, A. S. A; BRADSHAW, C. M; SZABADI, E. Effect of destruction of the 5-hydroxytryptaminergic pathways on temporal memory: quantitative analysis with a delayed interval bisection task. **Psychopharmacology**, v. 129, n. 1, p. 48-55, 1997.

BANNERMAN, D. M; GILMOUR, G; NORMAN, G; LEMAIRE, M; IVERSEN, S. D; RAWLINS, J. N. The time course of the hyperactivity that follows lesions or temporary inactivation of the fimbria-fornix. **Behavioural Brain Research**, v. 120, n. 1, p. 1-11, 2001.

BANNERMAN, D. M; YEE, B. K; GOOD, M. A; HEUPEL, M. J; IVERSEN, S. D; RAWLINS, J. N. Double dissociation of function within the hippocampus: a comparison of dorsal, ventral, and complete hippocampal cytotoxic lesions. **Behavioral Neuroscience**, v. 113, n. 6, p. 1170-1188, 1999.

BARONE, S; BONNER, M; TANDON, P; MCGINTY, J. F; TILSON, H. A. The neurobiological effects of colchicine: modulation by nerve growth factor. **Brain Research Bulletin**, v. 28, n. 2, p. 265-274, 1992.

BOSS, B. D; PETERSON, G. M; COWAN, W. M. On the numbers of neurons in the dentate gyrus of the rat. **Brain Research**, v. 338, n. 1, p. 144-150, 1985.

BOSS, B. D; TURLEJSKI, N; STANFIELD, B. B; COWAN, W. M. On the numbers of neurons in fields CA1 and CA3 of the hippocampus of Sprague-Dawley and Wistar rats. **Brain Research**, v. 406, n. 1-2, p. 280-287, 1987.

BRATT, A. M; CASSEL, J. C; NEFANG, B; GREENE, P. L; JACKISCH, R; HERTTING, G; WILL, B. E. Behavioural and neurochemical effects of superior cervical ganglionectomy in rats with septo-hippocampal lesions. **Experimental Brain Research**, v. 102, n. 3, p. 429-444, 1995.

BUENO, J. L. O. O imaginário animal. **Psicologia Universidade de São Paulo**, v. 8, n. 2, p. 165-180, 1997.

BUENO, J. L. O; BUENO JÚNIOR, L. S. Estimação temporal de ratos com lesão hipocampal em discriminação condicional operante. **Revista Interamericana de Psicologia**, v. 41, n. 3, p. 329-340, 2007.

BUENO, J. L. O; COSTA, V. C. I; XAVIER, G. F; DIMA, L. L. Aquisição de uma tarefa temporal (DRL) por ratos submetidos a lesão seletiva do giro denteado. **Psicologia: Reflexão & Crítica**, v. 19, n. 1, p. 159-165, 2006.

BUENO, J. L. O; WAGATSUMA, A; MARTINS, M. R. Estimação de tempo em ratos submetidos a um procedimento de discriminação condicional. **Psicologia: Reflexão & Crítica**, v. 20, n. 2, p. 238-245, 2007.

BUHUSI, C. V; MECK, W. H. What makes us tick? Functional and neural mechanisms of interval timing. **Nature Reviews: Neuroscience**, v. 6, n. 10, p. 755-765, 2005.

CARLSSON, A. On the neuronal circuitries and neurotransmitters involved in the control of locomotor activity. **Journal of Neural Transmission**, v. 40, p. 1-12, 1993.

CATANIA, A. C. **Aprendizagem: comportamento, linguagem e cognição**. 4<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Artmed, 1999. 470 p.

CHURCH, R. M; DELUTY, M. Z. Bisection of temporal intervals. **Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes**, v. 3, n. 3, p. 216-228, 1977.

COSTA, V. C. I; BUENO, J. L. O; XAVIER, G. F. Dentate gyrus-selective colchicine lesion and performance in temporal and spatial tasks. **Behavioural Brain Research**, v. 160, n. 2, p. 286-303, 2005.

COUTUREAU, E; GALANI, R; JARRARD, L. E; CASSEL, J. C. Selective lesions of the entorhinal cortex, the hippocampus, or the fimbria-fornix in rats: a comparison of effects on spontaneous and amphetamine-induced locomotion. **Experimental Brain Research**, v. 131, n. 3, p. 381-392, 2000.

DIETRICH, A; ALLEN, J. D. Functional dissociation of the prefrontal cortex and the hippocampus in timing behavior. **Behavioral Neuroscience**, v. 112, n. 5, p. 1043-1047, 1998.

DIETRICH, A; ALLEN, J. D; BUNNELL, B. N. Is the hippocampus involved in temporal discrimination and the memory of short intervals? **The International Journal of Neuroscience**, v. 90, n. 3-4, p. 255-269, 1997.

DUCONSEILLE, E; CARROT, S. N; WOERLY, S; KELCHE, C; WILL, B; CASSEL, J. C. Homotopic grafts of septal neurons combined to polymeric hydrogels placed into a fimbria-fornix lesion cavity attenuate locomotor hyperactivity but not mnemonic dysfunctions in rats. **Restorative Neurology and Neuroscience**, v. 18, n. 1, p. 39-51, 2001.

ELLEN, P; AITKEN Jr., W. C. Absence of overresponding on a DRL schedule by hippocampally-lesioned rats. **Physiology and Behavior**, v. 5, n. 4, p. 489-495, 1970.

EMERICH, D. F; WALSH, T. J. Hyperactivity following intradentate injection of colchicine: a role for dopamine systems in the nucleus accumbens. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 37, n. 1, p. 149-154, 1990.

FLORES, G; SILVA-GÓMEZ, A. B; IBÁÑEZ, O; QUIRION, R; SRIVASTAVA, L. K. Comparative behavioral changes in postpubertal rats after neonatal excitotoxic lesions of the ventral hippocampus and the prefrontal cortex. **Synapse**, v. 56, n. 3, p. 147-153, 2005.

GALLISTEL, C. R. **The organization of learning**. Cambridge, MA: MIT Press, 1990. 662 p.

GIBBON, J. Scalar expectancy-theory and Weber's Law in animal timing. **Psychological Review**, v. 84, n. 3, p. 279-325, 1977.

GIBBON, J; CHURCH, R. M. Sources of variance in an information processing theory of timing. In: ROITBLAT, H. L; BEVER, T. G; TERRACE, H. S. **Animal Cognition: proceedings of the Harry Frank Guggenheim Conference**. Hillsdale: Erlbaum, 1984. p. 465-484.

GIBBON, J; CHURCH, R. M; MECK, W. H. Scalar timing in memory. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 423, p. 52– 77, 1984.

GIBSON, J. J. The concept of stimulus in psychology. **American Psychologist**, v. 15, n. 11, p. 694-702, 1960.

GODSIL, B. P; STEFANACCI, L; FANSELOW, M. S. Bright light suppresses hyperactivity induced by excitotoxic dorsal hippocampus lesions in the rat. **Behavioral Neuroscience**, v. 119, n. 5, p. 1339-1352, 2005.

GOLDSCHMIDT, R. B; STEWARD, O. Neurotoxic effects of colchicine: differential susceptibility of CNS neuronal populations. **Neuroscience**, v. 7, n. 3, p. 695-714, 1982.

GOLDSCHMIDT, R. B; STEWARD, O. Preferential neurotoxicity of colchicine for granule cells of the dentate gyrus of the adult rat. **Proceedings of The National Academy of Sciences The United States of America: Biological Sciences**, v. 77, n. 5, p. 3047-3051, 1980.

GORCHETCHNIKOV, A; GROSSBERG, S. Space, time and learning in the hippocampus: How fine spatial and temporal scales are expanded into population codes for behavioral control. **Neural Networks**, v. 20, n. 2, p. 182-193, 2007.

GRAY, J. A; McNAUGHTON, N. Comparison between the behavioural effects of septal and hippocampal lesions: a review. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 7, n. 2, p. 119-188, 1983.

GRAYBIEL, A. M. The basal ganglia and cognitive pattern generators. **Schizophrenia Bulletin**, v. 23, n. 3, p. 459-469, 1997.

GRAYBIEL, A. M; AOSAKI, T; FLAHERTY, A. W; KIMURA, M. The basal ganglia and adaptive motor control. **Science**, v. 265, n. 5180, p. 1826-1831, 1994.

GROSSBERG, S; MERRILL, J. W. L. A neural network model of adaptively timed reinforcement learning and hippocampal dynamics. **Cognitive Brain Research**, v. 1, n. 1, p. 3-38, 1992.

GROSSBERG, S; MERRILL, J. W. L. The hippocampus and cerebellum in adaptively timed learning, recognition, and movement. **Journal of Cognitive Neuroscience**, v. 8, n. 3, p. 257-277, 1996.

GROSSBERG, S; SCHMAJUK, N. A. Neural dynamics of adaptive timing and temporal discrimination during associative learning. **Neural Networks**, v. 2, n. 2, p. 79-102, 1989.

HADDAD, R. K; RABE, A. Effect of selective hippocampal lesions in the rat on DRL 20 acquisition. **Journal of Psychological Studies**, v. 15, p. 106-121, 1967.

HANSON, M; ESTROM, A. Mitosis inhibitors and axonal transport. **International Reviews of Cytology Supplement**, v. 7, p. 373-402, 1978.

HARRY, J. G; D'HELLEN COURT, C. L. Dentate gyrus: alterations that occur with hippocampal injury. **Neurotoxicology**, v. 24, p. 343-356, 2003.

HO, M. Y; AL-ZAHRANI, S. S. A; MARTINEZ, D. N. V CABRERA, M. L; BRADSHAW, C. M; SZABADI, E. Effects of desipramine and fluvoxamine on timing behaviour investigated with the fixed interval peak procedure and the interval bisection task. **Psychopharmacology**, v. 125, n. 3, p. 274-284, 1996.

HO, M. Y; AL-ZAHRANI, S. S. A; MARTINEZ, D. N. V; CABRERA, M. L; BRADSHAW, C. M; SZABADI, E. The role of the ascending 5-hydroxytryptaminergic pathways in timing behavior – further observations with the interval bisection task. **Psychopharmacology**, v. 120, n. 2, p. 213-219, 1995.

HOFFERER, E; KELCHE, C; WILL B; CASSEL, J. C. A comparison of behavioural effects and morphological features of grafts rich in cholinergic neurons placed in two sites of the denervated rat hippocampus. **Experimental Brain Research**, v. 111, n. 2, p. 187-207, 1996.

HOLLAND, P. C. Differential effects of reinforcement of an inhibitory feature after serial and simultaneous feature negative discrimination training. **Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes**, v. 10, n. 4, p. 461-475, 1984.

HOLLAND, P. C. Temporal control in Pavlovian occasion setting. **Behavioural Processes**, v. 44, n. 2, p. 225-236, 1998.

HOLLAND, P. C. The nature of conditioned inhibition in serial and simultaneous feature-negative discriminations. In: MILLER, R. R; SPEAR, N. E. **Information processing in animals: conditioned inhibition**. Hillsdale: Erlbaun, 1985. p. 267-297.

- HOLLAND, P. C; LAMARRE, J. Transfer of inhibition after serial and simultaneous feature negative discrimination training. **Learning and Motivation**, v. 15, n. 3, p. 219-243, 1984.
- JALDOW, E. J; OAKLEY, D. A. Performance on a differential reinforcement of low-rate schedule in neocorticated rats and rats with hippocampal-lesions. **Psychobiology**, v. 18, n. 4, p. 394-403, 1990.
- JARRARD, L. E; BECKER, J. T. The effects of selective hippocampal lesions on DRL behavior in rats. **Behavioral Biology**, v. 21, n. 3, p. 393-404, 1977.
- JENKINS, H. M; SAINSBURY, R. S. The development of stimulus control through differential reinforcement. In: MACKINTOSH, N. J; HONIG, W. K. **Fundamental Issues in Associative Learning**. Halifax: Dalhousie University Press, 1969. p. 123-161.
- JOHNSON, C. T; OLTON, D. S; GAGE, F. H; JENKO, P. G. Damage to hippocampus and hippocampal connections: effects on DRL and spontaneous alternation. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 91, n. 3, 1977. p. 508-522.
- KILLEEN, P. R; FETTERMAN, J. G. A behavioral-theory of timing. **Psychological Review**, v. 95, n. 2, p. 274-295, 1988.
- KISHIMOTO, Y; NAKAZAWA, K; TONEGAWA, S; KIRINO, Y; KANO, M. Hippocampal CA3 NMDA receptors are crucial for adaptive timing of trace eyeblink conditioned response. **The Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 5, p. 1562-1570, 2006.
- LAWRENCE, A. D; SAHAKIAN, B. J; ROBBINS, T. W. Cognitive functions and corticostriatal circuits: insights from Huntington's disease. **Trends in Cognitive Sciences**, v. 2, p. 379-398, 1998.
- LAWRENCE, D. H. The nature of a stimulus: some relationships between learning and perception. In: KOCH, S. **Psychology: a study of a science**. New York: McGraw-Hill, 1963. p. 179-212.
- LJUNGBERG, T; APICELLA, P; SCHULTZ, W. Responses of monkey dopamine neurons during learning of behavioral reactions. **Journal of Neurophysiology**, v. 67, n. 1, p. 145-163, 1992.
- MARTINS, M. R. **Estimação de tempo em ratos submetidos a uma tarefa de discriminação condicional em um procedimento operante**. 2001. Monografia (Bacharelado em Psicologia) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2001.
- MATELL, M. S; MECK, W. H. Cortico-striatal circuits and interval timing: coincidence detection of oscillatory processes. **Cognitive Brain Research**, v. 21, n. 2, p. 139-170, 2004.
- MATELL, M. S; MECK, W. H. Neuropsychological mechanisms of interval timing behavior. **Bioessays**, v. 22, n. 1, p. 94-103, 2000.

MECK, W. H. Hippocampal function is required for feedback control of an internal clock's criterion. **Behavioral Neuroscience**, v. 102, n. 1, p. 54-60, 1988.

MECK, W. H. Neuroanatomical localization of an internal clock: a functional link between mesolimbic, nigrostriatal, and mesocortical dopaminergic systems. **Brain Research**, v. 1109, n. 1, p. 93-107, 2006.

MECK, W. H. Neuropharmacology of timing and time perception. **Brain Research: Cognitive Brain Research**, v. 3, n. 3-4, p. 227-242, 1996.

MECK, W. H; CHURCH, R. M. Abstraction of temporal attributes. **Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes**, v. 8, n. 3, p. 226-243, 1982.

MECK, W. H; CHURCH, R. M; OLTON, D. S. Hippocampus, time, and memory. **Behavioral Neuroscience**, v. 98, n. 1, p. 3-22, 1984.

MIDDLETON, F. A; STRICK, P. L. Anatomical evidence for cerebellar and basal ganglia involvement in higher cognitive function. **Science**, v. 266, n. 5184, p. 458-461, 1994.

MILLENSON, J. R. **Princípios da análise do comportamento**. Brasília: Coordenada, 1977.

MOREIRA, R. C. M; BUENO, J. L. O. Conditional discrimination learning and negative patterning in rats with neonatal hippocampal lesion induced by ionizing radiation. **Behavioural Brain Research**, v. 138, n. 1, p. 29-44, 2003.

MORRISSEY, G; WOGAR, M. A; BRADSHAW, C. M; SZABADI, E. Effect of lesions of the ascending 5-hydroxytryptaminergic pathways on timing behaviour investigated with an interval bisection task. **Psychopharmacology**, v. 112, n. 1, p. 80-85, 1993.

O'KEEFE, J; NADEL, L. **The hippocampus as a cognitive map**. Oxford: Oxford University Press, 1978. 584 p.

OLTON, D. S; MECK, W. H; CHURCH, R. M. Separation of hippocampal and amygdaloid involvement in temporal memory disfuncions. **Brain Research**, v. 404, n. 1-2, p. 180-188, 1987.

PARENT, A; HAZRATI, L. N. Functional anatomy of the basal ganglia: I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. **Brain Research: Brain Research Reviews**, v. 20, p. 91-127, 1995.

PARENT, A; HAZRATI, L. N. Functional anatomy of the basal ganglia: II. The place of subthalamic nucleus and external pallidum in basal ganglia circuitry. **Brain Research: Brain Research Reviews**, v. 20, p. 128-154, 1995.

PAXINOS, G; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. London: Academic Press, 2007. 456 p.

PHILLIPS, J. G; BRADSHAW, J. L; IANSEK, R; CHIU, E. Motor functions of the basal ganglia. **Psychological Research**, v. 55, n. 2, p. 175-181, 1993.

PEARCE, J. M; HALL, G. A model for pavlovian learning: variations in the effectiveness of conditioned but not of unconditioned stimuli. **Psychological Review**, v. 87, n. 6, p. 532-552, 1980.

PURVES, D; AUGUSTINE, G. J; FITZPATRICK, D; KATZ, L. C; LAMANTIA, A. S; McNAMARA, J. O; WILLIAMS, S. M. **Neurociências**. Trad. Dalmaz, C; Gonçalves, C. A. S; Zancan, D; Horn, F; Quillfeldt, J. A; Elena, M. A; Rosat, R. M. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 728 p.

RASLEAR, T. G. A test of the Pfanzagl bisection model in rats. **Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes**, v. 9, n. 1, p. 49-62, 1983.

RASLEAR, T. G. Perceptual bias and response bias in temporal bisection. **Perception & Psychophysics**, v. 38, n. 3, p. 261-268, 1985.

RESCORLA, R. A; HOLLAND, P. C. Associations in pavlovian conditioned inhibition. **Learning and Motivation**, v. 8, n. 4, p. 429-447, 1977.

RICHELLE, M; LEJEUNE, H. **Time in animal behaviour**. Oxford: Pergamon Press, 1980.

ROSS, R. T; HOLLAND, P. C. Conditioning of simultaneous and serial feature-positive discriminations. **Animal Learning & Behavior**, v. 9, n. 3, p. 293-303, 1981.

SHULL, R. N; HOLLOWAY, F. A. Behavioral effects of hippocampal system lesions on rats in an operant paradigm. **Brain Research Bulletin**, v. 14, n. 4, p. 315-322, 1985.

SIEGEL, S. F. A test of the similarity rule model of temporal bisection. **Learning and Motivation**, v. 17, n. 1, p. 59-75, 1986.

SINDEN, J. D; RAWLINS, J. N; GRAY, J. A; JARRARD, L. E. Selective cytotoxic lesions of the hippocampal formation and DRL performance in rats. **Behavioral Neuroscience**, v. 100, n. 3, p. 320-329, 1986.

STUBBS, D. A. Discrimination of stimulus duration by pigeons. **Journal of The Experimental Analysis of Behavior**, v. 11, n. 3, p. 223-238, 1968.

STUBBS, D. A. Scaling of stimulus duration by pigeons. **Journal of The Experimental Analysis of Behavior**, v. 26, n. 1, p. 15-25, 1976.

SWERDLOW, N. R; HALIM, N; HANLON, F. M; PLATTEN, A; AUERBACH, P. P. Lesion size and amphetamine hyperlocomotion after neonatal ventral hippocampal lesions: more is less. **Brain Research Bulletin**, v. 55, n. 1, p. 71-77, 2001.

VAUCLAIR, J. **Animal cognition**: an introduction to modern comparative psychology. Cambridge, MA: Harvard University Press, 1996. 222 p.

WAGNER, A. R; RESCORLA, R. A. Inhibition in pavlovian conditioning: applications of a theory. In: HALLIDAY, M. S; BOAKES, R. A. **Inhibition and learning**. London: Academic Press, 1972. p. 301-336.

WOODRUFF, M. L; BAISDEN, R. H; WHITINGTON, D. L; BENSON, A. E. Embryonic hippocampal grafts ameliorate the deficit in DRL acquisition produced by hippocampectomy. **Brain Research**, v. 408, n. 1-2, p. 97-117, 1987.

XAVIER, G. F; OLIVEIRA-FILHO, F. J. B; SANTOS, A. M. G. Dentate gyrus-selective colchicine lesion and disruption of performance in spatial tasks: difficulties in "place strategy" because of a lack of flexibility in the use of environmental cues? **Hippocampus**, v. 9, n. 6, p. 668-681, 1999.

YOUNG, B; McNAUGHTON, N. Common firing patterns of hippocampal cells in a differential reinforcement of low rates of response schedule. **The Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 18, p. 7043-7051, 2000.

ZHANG, H. T; FRITH, S. A; WILKINS, J; O'DONNELL, J. M. Comparison of the effects of isoproterenol administered into the hippocampus, frontal cortex, or amygdala on behavior of rats maintained by differential reinforcement of low response rate. **Psychopharmacology**, v. 159, n. 1, p. 89-97, 2001.

# 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](#)